



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

TESIS

REVISIÓN SOBRE EL RECEPTOR FLT3
(*FMS-like tyrosine kinase 3*)
Y SU ASOCIACIÓN CON LEUCEMIAS AGUDAS.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUIMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA.

PRESENTA:

ILDE MARISOL GUTIÉRREZ CORRALES.

ASESORAS: Dra. BRISEIDA MARTÍNEZ LÓPEZ.
M en C. GLORIA LETICIA ARELLANO MARTÍNEZ.

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Revisión sobre el receptor FLT3 (*FMS-like tyrosine kinase 3*) y su asociación con leucemias agudas

Que presenta la pasante: Ildé Marisol Gutiérrez Corrales
Con número de cuenta: 406051026 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 22 de Septiembre de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	
VOCAL	QFB. René Damián Santos	
SECRETARIO	M. en C. Gloria Leticia Arellano Martínez	
1er. SUPLENTE	QFB. Olimpia Roxana Ponce Crippa	
2do. SUPLENTE	M. en C. Heidi Johanna Amezcua Hempel	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HMI/iac

*Con un sólo objetivo, verte triunfar
Con un sólo deseo, que logres tu meta
Que salgas al mundo como una vencedora
Que voltees hacia atrás y veas lo que superaste
Que me dejes felicitarte por que yo sé
Que para ti, el triunfo es tu esfuerzo.*

Ilde Marisol Gutiérrez Corrales.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi madre Leticia Guadalupe Corrales Álvarez que me ha apoyado incondicionalmente a lo largo de mi vida, a quien le debo la educación y fortaleza que me ha brindado para siempre seguir adelante, a quien amo, respeto, admiro y quien ha sido siempre mi gran ejemplo.

A José Luis Camarena Flores quien ha sido un pilar fundamental para mi, y ha sabido guiarme y proporcionarme las herramientas que he necesitado.

A mis hermanas Ariadna, Brenda y Jazmín quienes han sido mis amigas, cómplices y compañeras de vida quienes han estado siempre para mí, como yo para ellas.

A mis amigos y compañeros quienes fueron un gran apoyo emocional durante el tiempo en que escribía esta tesis.

A mis maestros quienes nunca desistieron al enseñarme, a ellos que continuaron depositando sus grandes e invaluable enseñanzas en mí, sin esperar nada a cambio.

A la Dra. Briseida Martínez López, al Q.C. Israel Parra Ortega por abrirme las puertas para realizar esta investigación, a mi profesora y asesora M. en C. Gloria Leticia Arellano Martínez quien me dirigió para escribir y concluir esta tesis.

A los sinodales quienes estudiaron mi tesis y la aprobaron.

A mi alma máter que me abrió las puertas al conocimiento y me proporciono todo lo que necesite mientras estudie mi carrera, con la que estaré eternamente en deuda, y a la que siempre responderé con mi vocación como química y ser humano con la cabeza en alto, por mi raza hablara el espíritu.

Para ellos es esta dedicatoria de tesis, pues es a ellos a quienes les debo su apoyo incondicional y con quienes siempre estaré agradecida.

INDICE

	Página
ABREVIATURAS	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
3. JUSTIFICACIÓN	3
4. LEUCEMIAS	4
4.1 Etiología	5
4.2 Incidencia	6
4.3 Epidemiología	6
4.4 Hallazgos clínicos	7
4.5 Datos de laboratorio	7
4.6 Diagnóstico diferencial	8
4.7 Clasificación de leucemias	8
4.8 Análisis morfológico y citoquímico	9
4.9 Pronóstico	12
4.10 Terapia	13
4.11 Tratamiento	15
5. MIELOPOYESIS NORMAL: DIFERENCIACIÓN ANTIGÉNICA Y MADURACION MIELOIDE	16
5.1 Regulación de la transcripción	20
6. FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3)	23
6.1 Historia de FLT3	23
6.2 Función y estructura	25
6.3 FLT3 en la hematopoyesis	27
6.4 Expresión de FLT3 en las células hematopoyéticas	28
6.5 Vías descendentes de FLT3	29
6.6 Leucemia mieloide aguda con anomalías genéticas de FLT3	31

	Página
7 FLT3 EN LEUCEMIAS HUMANAS	34
7.1 Expresión de FLT3 en leucemias humanas	34
7.2 Importancia clínica de mutaciones en FLT3	34
8 INTRODUCCIÓN A MUTACIONES DE FLT3	35
8.1 Vías descendentes de FLT3 oncogénico	37
9 FLT3 DUPLICACIÓN INTERNA EN TÁNDEM (FLT3/DTI)	38
9.1 Ubicación estructural de Y597	42
9.2 Implicación pronóstica de la longitud FLT3/DTI	44
9.3 Significado pronóstico de FLT3/DTI	51
10.MECANISMOS GENERALES DE ACTIVACIÓN DE TKR	53
11 IMPORTANCIA DEL LIGANDO FLT3 EN LAS LEUCEMIAS	55
11.1 Ligando FLT3	55
11.2 Los niveles plasmáticos del ligando FLT3	59
11.3 Asociación del aumento de FL con la inhibición de FLT3 <i>in vivo</i>	66
12. PAPEL DE HCT EL FLT3/DTI+ EN AML	67
12.1 Mutaciones de FLT3 "activacion de bucle" en luecemias humanas	69
13 IMPORTANCIA CLINICA DE FLT3/ALM	70
14 MECANISMO SUBYACENTE DE LA VARIACIÓN ALÉLICA EN FLT3/DTI	71

	Página
15 INHIBIDORES DE FLT3	73
15.1 Experiencia clinica con FLT3-TKI´s como agentes únicos	74
16 ENSAYOS CLÍNICOS: TRATAMIENTO (QUIMIOTERAPIA Y TKI´s)	80
16.1 Experiencia preclínica con un enfoque dirigido a FLT3-anticuerpo	81
16.2 Mecanismos de resistencia a FLT3-TKI´s	82
a) Resistencia primaria	82
b) Resistencia secundaria	85
16.3 Lecciones aprendidas de ensayos clínicos FLT3-TKI	88
17 INHIBIDORES MOLECULARES PEQUEÑOS COMO OPCIONES TERAPÉUTICAS	91
18 PROMESAS Y DESAFÍOS PARA LA INHIBICIÓN DE FLT3 EN LMA	93
19 FUTURAS DIRECCIONES	96
20 FLT3 Y CÉLULAS INICIADORAS DE LEUCEMIA	96
21 FLT3 Y MICROAMBIENTE	98
22 CONCLUSIONES	101
23 REFERENCIAS	103

ABREVIATURAS.

1GF-1R	Receptor del factor de crecimiento insulínico
ADN	Acido desoxirribonucleico
ALM.	Mutación en el dominio de activación de bucle
AR	Relación alélica
ARFB-T	Anemia refractaria con exceso de blastos en transformación
ARN	Acido ribonucleico
Asp	Acido aspartico
ATP	Adenosina trifosfato
ATRA	Acido holo trans-retinoico
aUPD	Disomia uniparental adquirida
CAM-DR	Adhesión mediada por resistencia a fármacos
CD	Cúmulo de diferenciación
c-FMS	Receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos
CFs	Factor estimulante de colonias
CHM	Células madre hematopoyéticas
CID	Coagulación intravascular diseminada
CR	Respuesta completa
Dc	Células dendríticas
DHL	Deshidrogenasa láctica
DTI	Duplicación interna en tándem
EGF	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EGIL	European group of immunophenotyping ok leukemia
ERM	Enfermedad residual mínima
FAB	Francesa americana británica
FGFR1	Receptor del factor 1 de crecimiento de fibroblastos
FL	Ligando de FLT3
FLK-2	Fetal liver kinase-2
FLT3	Fms- like tirosina cinasa 3
GM	Granulocitos macrófagos

HSC	Célula madre hematopoyética
IL	Interleucina
JMD	Dominio yuxtamembrana
kDa	Kilodaltones
KI	Inserto cinasa
LCG	Leucemia granulocítica crónica
LIC	Células iniciadoras de leucemia
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LLC	Leucemia linfocítica crónica
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crónica
LMMJ	Leucemia mielomonocítica juvenil
LOH	Perdida de heterocigosidad
LPA	Leucemia promielocítica aguda
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MPD	Trastornos mieloproliferativos
MPO	Mieloperoxidasa
NK	Natural killer
OMS	Organización mundial de la salud
OS	Supervivencia global
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD	Farmacodinamia
PDGFR	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PEM	Progenitor eritroide/megacariocítico
PGM	Progenitor granulocítico/monocítico
PI3K	Fosfo-inositol-3-cinasa
PK	Farmacocinética
PLC	Progenitor linfocítico común
PMC	Progenitor mieloide común

PMP	Progenitor multipotencial
RC	Remisión completa
RP	Remisión parcial
RR	Recaída mayor
SD	Desviación estándar
SFD	Supervivencia libre de enfermedad
SFR	Supervivencia libre de recaída
SMD	Síndrome mielodisplásico
SNC	Sistema nervioso central
STK-1	Human stem cell kinase-1
TK	Tirosina cinasa
TKD	Dominio tirosina cinasa
TKI	Inhibidores de tirosina cinasa
TKR	Receptores tirosina cinasa
TMD	Dominio transmembranal
TPH	Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos
WT	Tipo nativo

1. INTRODUCCIÓN

La Tirosina cinasa (TK), es una enzima que cataliza la transferencia de fosfato desde el ATP a residuos de tirosina en polipéptidos. El genoma humano contiene diversos genes que en conjunto regulan la proliferación celular, la supervivencia, la diferenciación, la función y la motilidad en base al control de la producción de esta enzima.¹

Los receptores de tirosina cinasa (RTK) son un grupo heterogéneo de proteínas transmembranales, que se expresan en muchas células en crecimiento, en procesos de diferenciación y angiogénesis, por lo que la sobreexpresión y la alteración de estos receptores se relaciona con el cáncer. Los RTK se encuentran conformados estructuralmente por un dominio extracelular, una porción transmembranal y un dominio intracelular de la TK.² Un ejemplo de este tipo de receptores es el FLT3 (receptor de tipo fms-tirosina quinasa 3), que es una proteína glicosilada de 158 kDa expresada en la superficie celular. FLT3 tiene 5 dominios, así como subdominios que abarcan a los 531 aminoácidos de la parte amino-terminal de la molécula. El dominio transmembrana se constituye de 21 aminoácidos, seguido por el dominio intracelular, que posee secuencias que comienzan con un dominio yuxtamembranal, que participa en la leucemogénesis. El lado carboxilo-terminal de la yuxtamembrana es el dominio de la cinasa, que se divide en dos subdominios, TK1 y TK2.³

En presencia del ligando y al unirse este al dominio extracelular del receptor, provoca que FLT3 se dimerice, llevando a cabo la autofosforilación de la tirosina y la posterior activación de la TK, provocando a su vez: la activación de las vías de señalización, la activación de la membrana y la exposición de los sitios de unión para las proteínas de señalización involucradas.¹ El ligando para FLT3(FL), se encuentra expresado en la médula ósea, el bazo, el timo y fibroblastos. El receptor FLT3 se expresa en la superficie de las células totipotenciales, así como en células pro-T y células pro-B, lo que sugiere un papel en la hematopoyesis temprana relacionando su presencia con neoplasias hematológicas como la Leucemia Mieloide Aguda (LMA), la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), Síndrome Mielodisplásico y Leucemia Mieloide Crónica en crisis Blástica.^{3,4}

Existen en general dos tipos de mutaciones de FLT3 que han sido identificadas en pacientes con LMA: la duplicación interna en tándem dentro el dominio yuxtamembranal (ITD) y mutaciones puntuales en el sitio de activación del dominio tirosina cinasa (TKD), ambos tipos de mutación provocan que FLT3 se encuentre constitutivamente activado, lo que resulta en una descontrolada activación de las vías descendentes.

La detección de las mutaciones de FLT3 en el transcurso de la enfermedad es un factor pronóstico importante en la LMA.⁵ Estas mutaciones de FLT3 se pueden evaluar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya que esta técnica molecular tiene una sensibilidad analítica impresionante y se ha convertido en la base del diagnóstico molecular. Desde su llegada, la PCR ha permitido la identificación de las mutaciones que no se detectan en citogenética tradicional lo que permite conocer los tipos de mutaciones y establecer el panorama pronóstico del paciente.⁶ La detección precoz de la recidiva en pacientes con leucemia mediante PCR se ha utilizado para iniciar el tratamiento preventivo, por lo tanto, la detección de mutaciones de FLT3 mediante PCR podría ser un marcador útil para la detección de recidiva si se mantiene estable entre el diagnóstico y la recaída en el mismo paciente.³

La detección temprana de mutaciones en FLT3 se convirtió desde hace algunos años en un procedimiento estándar para el diagnóstico de pacientes con LMA en varios centros clínicos.⁴ Clínicamente, la presencia de mutaciones en FLT3 confiere un mal pronóstico en la LMA debido principalmente a un mayor riesgo de recaída de la enfermedad que resulta en una menor supervivencia.⁷ Igualmente debe considerarse que estas mutaciones son frecuentes a diferente grado dándose además en ciertos subtipos de LMA, variación que se da en menor proporción en la edad pediátrica.⁸ Sin embargo la implicación más importante de los pronósticos radica en la decisión de enviar a los pacientes para el trasplante alogénico para así poder obtener una remisión completa.⁹

Las características del receptor FLT3 lo convierten en un candidato muy atractivo para nuevas estrategias de tratamiento,¹⁰ porque la intervención terapéutica común está conformada por fármacos antagonistas como anticuerpos monoclonales o

moléculas pequeñas como el malato de sinitinib, que es una molécula pequeña capaz de bloquear el dominio extracelular del RTK teniendo actividad directa contra el cáncer.

2. OBJETIVOS

Objetivo General

Establecer el estado del arte del receptor FLT3 (*FMS-like tyrosine kinase 3*) a través de una revisión de la literatura para obtener información de su asociación con leucemias agudas, así como su utilidad diagnóstica y su valor pronóstico.

Objetivos específicos

- Realizar una investigación tanto exploratoria como descriptiva, que permita la profundización y comprensión del tema en cuestión.
- Revisar la importancia del receptor FLT3 como marcador bioquímico específico para el apoyo en el diagnóstico y tratamiento en pacientes con leucemias agudas.
- Señalarla frecuencia de mutaciones en elreceptor FLT3en pacientes con leucemias agudas.
- Describir la asociación del receptor FLT3 con el pronóstico de leucemias agudas.
- Analizar la prevalencia de mutaciones de FLT3 en leucemia mieloide aguda (LMA).

3. JUSTIFICACION

Esta recopilación de información sobre FLT3 (*FMS-like tyrosine kinase 3*) pretende que se implemente la detección de FLT3 de forma rutinaria para el diagnóstico, seguimiento y pronóstico de los pacientes con leucemias agudas, ya que se presenta en aproximadamente el 25% de esta población, y dependiendo el tipo de mutación que presente este receptor originara un mejor pronostico de supervivencia y un óptimo tratamiento para el paciente.

4. LEUCEMIAS

La leucemia es el cáncer infantil más común. En los niños, el subtipo más común, es la leucemia aguda linfoblástica (también denominada linfocítica) LLA y representa el 75-80% de todos los casos de leucemia infantil, mientras que la Leucemia mieloide aguda (mielocítica, mieloide o no linfoblástica) LMA compone aproximadamente el 20%.¹¹

La leucemia linfocítica aguda es una proliferación maligna y con la acumulación de células hematopoyéticas (linfocitos inmaduros). La leucemia mieloide aguda (LMA) es una proliferación neoplásica de células inmaduras de estirpe mieloide que se produce por una alteración en la regulación del crecimiento y la diferenciación de las células hematopoyéticas. Esta alteración provoca la acumulación de precursores inmaduros con capacidad de replicación, pero que han perdido su capacidad de diferenciación hacia células hematopoyéticas maduras. Por consiguiente, la médula ósea es ocupada por células tumorales que impiden una hematopoyesis normal y da lugar a la aparición de una insuficiencia medular.

Aunque las células leucémicas generalmente no proliferan tan activamente como sus homólogos normales hematopoyéticos, se acumulan inexorablemente y compiten con éxito con las células normales. Su incapacidad para diferenciarse y su relativa resistencia a la apoptosis puede explicar este fenómeno. Al momento del diagnóstico, las células leucémicas por lo general han sustituido a las células normales de la médula ósea y diseminadas a diversos sitios extra medulares. Por lo tanto, las características de presentación de la leucemia típicamente reflejan el grado de sustitución de la médula ósea y el grado de propagación extra medular.¹²

Hasta los años 70 el diagnóstico de esta enfermedad se basaba única y exclusivamente en el examen histológico y citológico de médula ósea y sangre periférica. La probabilidad de supervivencia a los 5 años en este período era menor al 15%. Durante las décadas de los 80 y 90 se produjo un avance muy importante en el diagnóstico de la leucemia aguda con la introducción de las técnicas inmunofenotípicas, citogenéticas y moleculares.

Este mayor refinamiento diagnóstico permitió un mejor conocimiento de la fisiopatología de la LMA que derivó en una clasificación de las LMA que valora tanto los aspectos morfológicos, como los fenotípicos, citogenéticos y moleculares.¹³

Tanto la LLA como la LMA son enfermedades heterogéneas que abarcan diferentes subtipos biológicos. Tienen como principal característica de diferenciación, la morfología y divisiones inmunofenotípicas basadas en asociación de linaje y el grado de maduración, se subclasifican por la identificación de anomalías cromosómicas y moleculares,^{11,14} así como sus patrones de expresión génica.^{15,16}

Esta nueva clasificación que integra los aspectos biológicos más significativos junto con la definición de nuevos factores pronósticos ha permitido el desarrollo de protocolos terapéuticos personalizados. Aproximadamente el 60-80% de los adultos con LMA consigue remisión completa (RC), pero sólo el 30-40% de estos pacientes está vivo y libre de enfermedad a los 5 años. Estos datos indican que, a pesar del avance conseguido en los últimos años en el diagnóstico y tratamiento de la LMA, es necesario continuar estudiando la fisiopatología de esta enfermedad tan heterogénea e investigando factores pronósticos que permitan individualizar los tratamientos y desarrollar nuevos fármacos.

4.1 Etiología

Entre los diferentes tipos de cáncer, la leucemia es la neoplasia que con más frecuencia se asocia a las radiaciones ionizantes y a algunos agentes químicos como el benceno.¹⁷ Asimismo, se ha observado un incremento del riesgo de desarrollar una leucemia secundaria en pacientes tratados con quimioterapia por diferentes tipos de cáncer, hematopoyéticos o no, debido a un aumento de la supervivencia de estos pacientes.

Entre los fármacos administrados a los pacientes con neoplasias destacan, por su asociación con un mayor riesgo de leucemia secundaria, los agentes alquilantes (ciclofosfamida, melfalán, clorambucilo o tiotepa), procarbazona, nitrosureas,

antibióticos antitumorales (antraciclinas) y epidofilotoxinas. Las leucemias que aparecen en asociación con estos fármacos suelen ir precedidas de un período de pancitopenia o displasia y se asocian con un mal pronóstico.^{18,19}

4.2 Incidencia

La leucemia es el cáncer infantil más común, aunque, la incidencia de LMA se incrementa de forma progresiva con la edad, siendo más evidente a partir de la quinta o sexta década de vida. La LMA causa el 1.2% de la mortalidad por cáncer. La asociación de la LMA con una serie de enfermedades que presentan anomalías cromosómicas o de conocido origen hereditario, sugiere la implicación genética en la leucemogénesis.²⁰

La leucemia granulocítica crónica (LGC), síndrome mielodisplásico (SMD), y los trastornos mieloproliferativos (MPD) se producen con menos frecuencia en tanto que la leucemia linfocítica crónica (LLC) es extremadamente rara.²¹

4.3 Epidemiología

La LMA tiene en los países occidentales una incidencia de 2,2 nuevos casos por 100.000 habitantes al año, los hombres son generalmente afectados por la leucemia ligeramente más a menudo que las mujeres en todos los grupos de edad, excepto en los niños y cabe mencionar que en los países desarrollados la incidencia de LLA es la más alta entre 2 y 5 años.

La incidencia de la LMA es relativamente constante durante la infancia, con picos leves en los 2 primeros años de vida y en la adolescencia tardía, aumentando de forma progresiva con la edad en cambio el SMD se produce normalmente después de 5 años de edad, y la leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ) ocurre casi siempre antes de los 5 años de edad.^{22,23}

4.4 Hallazgos clínicos

Entre los hallazgos clínicos mas frecuentes encontramos:

- Los signos y síntomas de la trombocitopenia y la anemia son comunes.
- La neutropenia puede predisponer a una infección grave.
- El dolor óseo y artralgia causada por la infiltración leucémica es más común en la LLA que en la LMA.
- Los sitios más comunes de afectación extramedular en la LLA incluyen el hígado, el bazo, el timo y los ganglios linfáticos.
- La piel, las encías, la cabeza y el cuello son los sitios típicos de la enfermedad extramedular en la LMA.
- La infiltración del sistema nervioso central se puede encontrar tanto en la LLA como en la LMA.

4.5 Datos de laboratorio

La presencia de anemia, neutropenia y trombocitopenia son hallazgos comunes, y su gravedad refleja el grado de reemplazo de la médula ósea por células leucémicas. Los rangos del recuento de leucocitos van de 0.1 a 1500×10^9 células / L (mediana, de 10 a 12×10^9 / L); la hiperleucocitosis se presenta con más de 100×10^9 células / L) se produce en el 15%-18% de los casos de LLA y LMA.¹¹

El 80% de los pacientes presenta anemia y el 60% leucocitosis. En aproximadamente un 10% de los pacientes no se observan blastos en sangre periférica (leucemias aleucémicas). La cifra de plaquetas es normal en la quinta parte de los enfermos e inferior a 10×10^9 /L en el 20%. En los casos con coagulación intravascular diseminada (CID) se aprecia un descenso de la concentración de protrombina, una disminución de fibrinógeno sérico y los productos de degradación del fibrinógeno (dímeros D) aumentados.²⁴

Las alteraciones bioquímicas son poco específicas siendo frecuente la elevación de la deshidrogenasa láctica (DHL) como consecuencia del incremento del recambio celular.

La nefropatía urémica es frecuente si no se adoptan las medidas preventivas adecuadas. En las LMA con componente monocítico se puede observar lesión tubular causada por la eliminación renal de grandes cantidades de lisozima.

El aspirado medular es hipercelular en el 80% de los casos. En ocasiones no se obtiene grumo medular debido a que la médula está empaquetada o a que existe fibrosis (habitual en la panmielosis aguda con mielofibrosis o en la leucemia aguda megacarioblástica).

4.6 Diagnóstico diferencial

El inicio agudo con la presentación de petequias, equimosis y sangrado puede sugerir púrpura trombocitopénica idiopática.

Tanto la leucemia aguda y anemia aplásica pueden presentarse con pancitopenia y complicaciones asociadas a la insuficiencia de la médula ósea, se debe tener en cuenta que la mononucleosis infecciosa y otras infecciones virales pueden ser confundidas con LLA, se pueden presentar dolores óseos, artralgias, y, en ocasiones artritis que pueden confundirse con la artritis reumatoide juvenil, la fiebre reumática, otras enfermedades del colágeno u osteomielitis.²⁵

A continuación se describen los diferentes tipos de leucemia, detallando a la LMA, que es en la que existen los problemas con el receptor FLT3.

4.7 Clasificación de leucemias

El diagnóstico de la LMA se basa en los criterios de la nueva clasificación de la OMS que tiene en cuenta datos citológicos, citoquímicos, inmunofenotípicos y genéticos (Tabla 1).

Los criterios citológicos y citoquímicos que se utilizan para distinguir los distintos tipos de LMA los enunció el grupo cooperativo FAB en el año 1985²⁶ y, después de

varias revisiones, han sido incorporados en las recientes clasificaciones de la OMS.^{27,28}

El porcentaje de blastos requerido para el diagnóstico de LMA ha de ser igual o superior al 20% de la celularidad de la médula ósea, excepto en el caso de las leucemias con translocaciones específicas, en las que se acepta una proporción inferior, y en la leucemia eritroide aguda que se define por la presencia de más de un 50% de precursores eritroides en la médula ósea asociada a más de un 20% de mieloblastos entre las células no eritroides.

Los estudios moleculares mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con transcriptasa reversa o el método de Southern Blot permiten detectar también alteraciones con significado pronóstico, como son los reordenamientos de genes, como, por ejemplo, el del gen MLL o la FLT3-DTI.

4.8 Análisis morfológico y citoquímico

El análisis morfológico de las células leucémicas en frotis teñidos con la tinción de Romanowsky o con Wright-Giemsa o May-Grünwald-Giemsa son las ideales para realizar la diferenciación de los tres subtipos de LLA (L1, L2 y L3) y ocho subtipos de leucemia mieloide aguda (M0-M7) según la clasificación Británico Americana Francesa (FAB) (Fig. 1)²⁹

El término "leucemia mieloide aguda" se utiliza para designar incluso leucemias en las que algunas o todas las células tienen la morfología de los monocitos (M4, M5), eritroblastos (M6), o megacarioblastos (M7).

Debido a la rareza y la naturaleza heterogénea del SMD infantil, su clasificación ha sido inconsistente, aunque se logró el consenso internacional.²³

El análisis de un frotis teñido con Romanowsky no puede distinguir exactamente entre LLA y LMA ya que no se tiñe adecuadamente y limita la diferenciación entre ambas.

Hay tinciones que pueden ayudar a esta distinción, como la Mieloperoxidasa, Sudán negro, y esterases no específicas, incluyendo alfa naftil butirato y acetato esterasa, reaccionan con las células blásticas mieloides, mientras que el reactivo ácido peryódico de Schiff reacciona de manera positiva en más del 70% de todos los casos.

Sin embargo, a pesar del uso tradicional de morfología y citoquímica, la clasificación contemporánea de las leucemias agudas se basan en subtipos que pueden ser identificadas únicamente por inmunología y análisis moleculares.¹¹

El European Group for Immunophenotyping of Leukemia (EGIL) formuló las directrices para una correcta evaluación inmunofenotípica de las leucemias agudas.

El estudio inmunofenotípico permite clasificar el tipo de leucemia aguda según la estirpe celular en mieloides y linfoides. Existen una serie de marcadores útiles para la asignación de línea entre los que destacan los de citoplasma CD79a, CD3 y MPO que son altamente específicos de línea linfoide B, linfoide T y mieloides, respectivamente. Estos marcadores intracitoplasmáticos junto con otros de superficie permiten la aplicación de un panel útil para la subclasificación de las leucemias agudas y para la detección de aberraciones fenotípicas que serán útiles en el seguimiento de la enfermedad residual mínima (ERM).³⁰

Tabla 1. Clasificación de la OMS de las leucemias mieloides agudas y neoplasias mieloides (2008)

LMA con alteraciones citogenéticas recurrentes

LMA con t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1Ta
LMA con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11
LPA con t(15;17)(q22;q12); PML-RARA
LMA con t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL
LMA con t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214
LMA con inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1
LMA (megacarioblástica) con t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1
Entidad provisional: LMA con NPM mutado
Entidad provisional: LMA con CEBPA mutado

LMA con mielodisplasia

Neoplasias mieloides relacionadas con tratamiento quimioterápico previo

LMA sin otras especificaciones

LMA mínimamente diferenciada
LMA sin maduración
LMA con maduración
LMA mielomonocítica
LMA monocítica
LMA eritroide
 Leucemia eritroide pura
 Eritroleucemia (mieloide/eritroide)
LMA megacariocítica
LMA basofílica
Panmielosis aguda con mielofibrosis

Sarcoma mieloide

Proliferaciones mieloides relacionadas con el síndrome de Down

Mielopoyesis anormal transitoria
Leucemia mieloide asociada con síndrome de Down

Neoplasia de células dendríticas plasmocitoide blástico

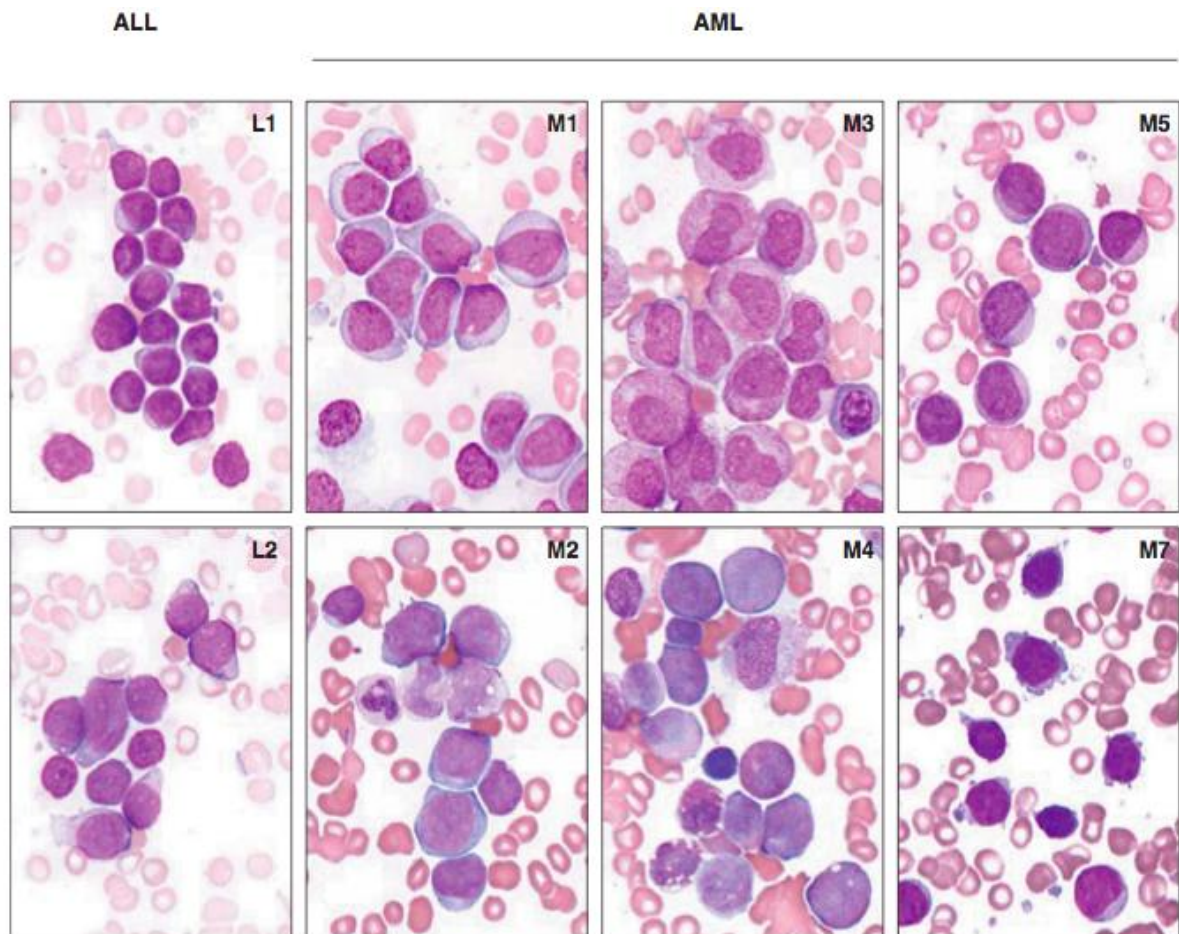


Figura 1. Morfología de las células leucémicas. Frotis de médula ósea obtenidos en el diagnóstico de los niños con LLA o LMA fueron teñidas con Wright-Giemsa. Se muestra la clasificación morfológica de acuerdo con los criterios franco-americano-británica. (Las fotografías fueron proporcionadas por el Dr. FG Behm, Hospital de Investigación St. Jude Children.) Tomada y modificada de Pui CH, Campana D, Evans WE: Childhood acute lymphoblastic leukemia current status and future perspectives. *Lancet Oncology* 2001;2:597– 607.

4.9 Pronóstico

Los principales factores pronósticos pueden dividirse entre los relacionados con características del paciente y los relacionados con características biológicas de la leucemia (Tabla 2).

Cinco años libre de eventos estimaciones de supervivencia de los niños con LLA recién diagnosticada son ahora más del 80%.

Cromosoma Filadelfia es un indicador de pronóstico desfavorable, mientras que la hiperdiploidia con más de 50 cromosomas y la fusión del gen TEL-AML1 están asociados con un resultado favorable.³¹

Supervivencia libre de eventos para la LLA infantil con reordenamiento 11q23/MLL sigue siendo sólo el 20% al 35% y no ha sido mejorado por el trasplante alogénico.

En la LMA, los pacientes con leucemia aguda megacarioblástica que presentan síndrome de Down (trisomía 21) tienen un pronóstico favorable con el tratamiento óptimo, mientras que aquellos con leucemia aguda megacarioblástica que no presentan la trisomía 21 tienen resultados significativamente desfavorables.³²

La recaída de menos de 18 meses después del final de la terapia y la LMA relacionada con el tratamiento, tienen un pronóstico sombrío, los pacientes con síndrome mielodisplásico, que posteriormente evolucionan a LMA con monosomía 7 o LMA con duplicación interna en tándem del gen FLT3 tienen a menudo enfermedad resistente.

Respuesta lenta a la terapia de inducción para remisión y persistente enfermedad mínima residual se asocian con un mayor riesgo de recaída en LLA y LMA.

FLT3-DTI se han asociado con un mal pronóstico en niños y adultos con LMA.^{33,34}

4.10 Terapia

Los pacientes con LLA deben someterse a una relativamente breve fase de remisión-inducción seguida por la intensificación (consolidación) y la terapia de continuación del tratamiento, posteriormente prolongada.

Todos los pacientes requieren tratamiento subclínico para el sistema nervioso central (SNC), que debe iniciarse temprano en la forma de quimioterapia intratecal.

La mayoría de los protocolos de tratamiento para la LMA incluyen la inducción de la remisión y la terapia de consolidación; otra terapia recomendada posterior a la remisión difiere ampliamente.

El trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas no se recomienda habitualmente.

En la actualidad, LA con el cromosoma Filadelfia o la recaída hematológica temprana, y las células T-LLA con mala respuesta temprana o la recaída hematológica, son indicaciones claras para el trasplante alogénico.

El trasplante alogénico parece mejorar la supervivencia global en la LMA, aunque las indicaciones de este procedimiento durante la primera remisión, se debaten.³⁵

Tabla 2. Factores pronósticos en la leucemia mieloide aguda

Favorable	Desfavorable
<p><i>Factores clínicos</i> LMA de novo Niños y adultos jóvenes Cifra de leucocitos normal</p>	<p><i>Factores clínicos</i> LMA secundaria Adultos de edad avanzada (>60 años) Leucocitosis intensa (>50-100x10⁹/L)</p>
<p><i>Clasificación FAB</i> LMA promielocítica, LMA con eosinofilia</p>	<p><i>Clasificación FAB</i> LMA indiferenciada, monocítica, eritroide, megacarioblástica</p>
<p><i>Citogenética</i> t(8;21), t(15;17), inv(16)/t(16;16) (incluso con alteraciones adicionales)</p>	<p><i>Citogenética</i> Alt 3q, -5 o 5q-, -7, alt 11q23[#], alt múltiples*</p>
<p><i>Molecular</i> Mutaciones NPM1 Mutaciones CEBPA</p>	<p><i>Molecular</i> Mutaciones FLT3 (FLT3-ITD) Reordenamientos MLL</p>
<p><i>Respuesta al tratamiento</i> RC tras un ciclo de QT</p>	<p><i>Respuesta al tratamiento</i> RC con ≥2 ciclos de QT</p>
<p>≤20% blastos en MO tras 1 ciclo de QT</p>	<p>>20% blastos en MO tras 1 ciclo de QT</p>
<p>RC inmunofenotípica tras QT</p>	<p>Persistencia de ERM por inmunofenotipo tras la inducción y/o consolidación</p>

Abreviaturas: alt, alteraciones; ERM, enfermedad residual mínima; MO, médula ósea; QT, quimioterapia; RC, remisión completa; [#]la t(9;11) que afecta al 11q23 tiene pronóstico intermedio; *≥4 alteraciones (según la última actualización del grupo MRC (Grimwade D, Blood 2010)

4.11 Tratamiento

El tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA) y los síndromes mielodisplásicos (SMD) está sufriendo cambios dramáticos en su comprensión debido al crecimiento exponencial del conocimiento de los mecanismos de leucemogénesis.

Tras casi tres décadas de tratamiento estándar de inducción en la leucemia aguda mieloblástica, es decir, una antraciclina (daunorrubicina, la primera disponible) durante 3 días y arabinósido de citosina (Ara-C) (100-200 mg/m²) durante 7 días³⁶, se sabe que la tasa esperable de remisión completa (RC) en adultos se sitúa entre 60- 70%³⁷, siendo más pobre en casos de LMA secundaria a síndrome mielodisplásico³⁸, aunque se han obtenido avances con otros regímenes³⁹. Si esta terapia es acompañada de una terapia post-remisión efectiva estas respuestas no son sostenidas en el tiempo (mediana 4-5 meses)⁴⁰

Llegar a alcanzar una RC se ha convertido en una condición necesaria para una supervivencia libre de enfermedad prolongada. En las últimas dos décadas se ha intentado, a través de múltiples ensayos clínicos, introducir regímenes terapéuticos más agresivos que mejoran las tasas de RC.

La mejor estrategia anti leucémica, una vez alcanzada la RC, es el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (TPH) particularmente en aquellos pacientes con resultados citogenéticos que confieren mal pronóstico⁴¹. Sin embargo ni la introducción de nuevos fármacos, ni cambios en dosis y frecuencia de los esquemas quimioterapéuticos, ni la adopción de estrategias de intensificación seguidas de trasplante de progenitores hematopoyéticos ha permitido alcanzar los límites de la ansiada curación de estas entidades y los pacientes terminan falleciendo debido a su neoplasia mieloide en un número aún importante. Esta situación es especialmente dramática en los pacientes de edad avanzada, los cuales son los más incidentes⁴².

Los estudios deben ser encaminados a mejorar esos resultados. El camino se llama “terapia adaptada al riesgo”⁴³ y “tratamiento contra dianas moleculares”⁴⁴.

Estos dos conceptos nacen en las dos últimas décadas y hacen referencia, en el primer caso, a la definición de estrategias terapéuticas individualizadas en base a conocidos marcadores clínico-biológicos pronósticos, y en el segundo caso, y muy intrincado con el anterior, al desarrollo de fármacos específicos frente a alteraciones moleculares caracterizadas e identificadas en el desarrollo de la enfermedad. La aplicación de estos conceptos en la clínica ya ha dado exitosos ejemplos como el desarrollo del Índice Pronóstico Internacional (IPSS) para el manejo de los SMD⁴⁵ o el tratamiento diferenciador con ácido holo-trans-retinoico (ATRA) de la LMA promielocítica (LPA) o FAB-M3.⁴⁶

Tratamiento post-remisión

En los pacientes menores de 60 años que alcanzan RC existen diferentes estrategias terapéuticas post-remisión que incluyen: Citarabina a altas dosis: el estudio realizado por el CALGB, demostró que 4 ciclos de citarabina a dosis altas (3g/m²/12 horas) eran superiores a las dosis intermedias (400 mg/m²) o a las dosis estándares (100 mg/m²).⁴⁷ Los pacientes que se benefician de este tratamiento padecen una LMA con t(8;21)/inv(16) o pacientes con citogenética normal sin mutaciones de FLT3 y con mutación de NPM1 o CEBPA.⁴⁸

5. MIELOPOYESIS NORMAL: DIFERENCIACIÓN ANTIGÉNICA Y MADURACIÓN MIELOIDE

Los precursores hematopoyéticos más inmaduros o células totipotenciales tienen la capacidad de auto-regeneración, proliferación y diferenciación en las distintas líneas celulares. Son células con capacidad de división simétrica (generación de dos células idénticas al progenitor) y asimétrica (generación de una célula idéntica al progenitor y una célula progenitora con menor capacidad de replicación pero con habilidad de expansión clonal y diferenciación para mantener la circulación de células maduras en sangre periférica).⁴⁹

Estas células se caracterizan por la ausencia de marcadores de línea (Lin-) y por expresar CD34+/CD38- /+débil. Además, pueden expresar otros marcadores de inmadurez como CD90 o CD117 (KIT). Por el contrario, a diferencia de la stem cell leucémica, no expresa CD123.

Durante el proceso de diferenciación, los progenitores hematopoyéticos se comprometen en ciertas líneas celulares, con la aparición de marcadores específicos (Lin+), y pérdida de la capacidad de auto-regeneración. Cuando la célula pasa a un progenitor comprometido (progenitor multipotencial, PMP) pierde la capacidad de autorreplicación pero mantiene la capacidad de diferenciación en todas las líneas celulares hematopoyéticas.

Este progenitor se irá comprometiendo en una línea celular específica: progenitor linfóide común (PLC) ó progenitor mieloide común (PMC). El PMC dará lugar a progenitores más específicos como son los progenitores granulocíticos/monocíticos (PGM) y los progenitores eritroides/megacariocíticos (PEM).

Todos estos procesos están regulados por factores de transcripción y citocinas.⁵⁰ Hay un equilibrio entre la autorreplicación y la diferenciación. Si este equilibrio se pierde por una alteración en la regulación de autorreplicación se bloquea la diferenciación.

La aparición de una leucemia puede ser consecuencia de una alteración en alguno de estos procesos (Fig. 2).

La línea granulopoyética representa aproximadamente el 60% de la celularidad global de la médula ósea y se caracteriza por la presencia de mieloperoxidasa (MPO) desde los estadios más iniciales de la diferenciación.

Desde el punto de vista fenotípico los primeros precursores mieloides (estadio I) se caracterizan por coexpresar los antígenos CD34, CD38, HLA-DR y CD33. Los precursores mieloides y los monocíticos son indistinguibles antigénicamente en este estadio. En su progresión al estadio II las células mieloides pierden CD34 y HLA-DR, ganan CD15 sin presentar todavía CD11b.

Este estadio corresponde al promielocito. Posteriormente, la célula mieloide adquiere una expresión moderada de CD11b, disminuye su expresión de CD33, pierde el antígeno CD13 (estadio III). En su proceso de diferenciación la célula mieloide vuelve a ganar CD13 mientras que disminuye CD33 y aparece el antígeno CD16 (estadio IV).

El estadio más maduro en la diferenciación granulocítica corresponde al del neutrófilo maduro que se encuentra en sangre periférica (estadio V). Estas células expresan CD16, CD13, CD10 y CD45 (Fig. 3).⁵¹.

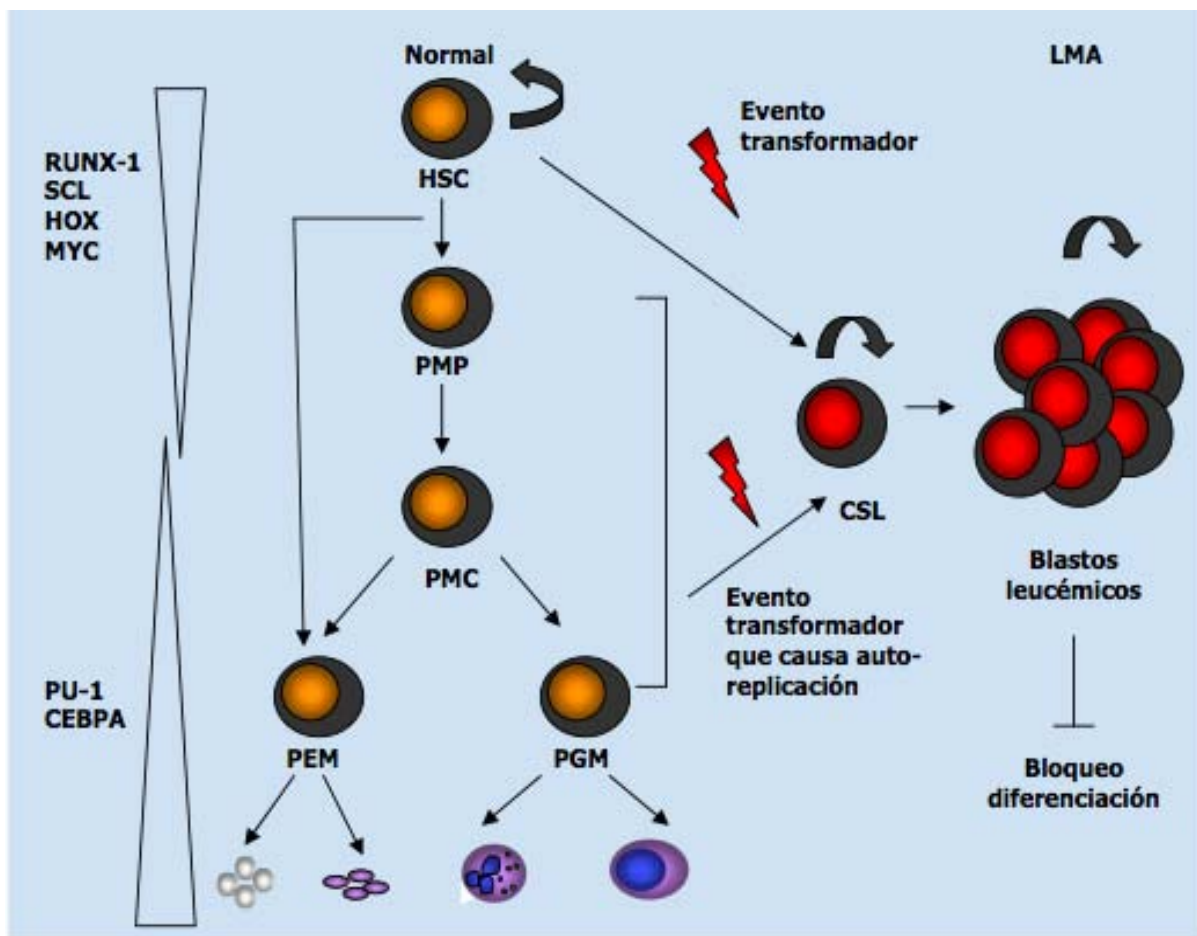


Figura 2. Transformación de progenitores hematopoyéticos normales en stem cells leucémicas. En la izquierda de la imagen se muestra la ontogenia mieloide normal con los factores de transcripción críticos en el control del programa transcripcional. En la derecha de la imagen se muestran los eventos transformadores que pueden tener lugar a nivel de la stem cell totipotencial o de un progenitor ya comprometido y generar una célula progenitora leucémica que evolucionará a LMA. HSC: stem cell hematopoyética normal; PMP: progenitor multipotencial; PMC: progenitor mieloide común; PGM: progenitores granulocíticos, PEM: progenitores eritroides/megacariocíticos; CSL: stem cell leucémica. Tomada y modificada de Gudgin E. in Hematology Education, the education program for the annual congress of the European Hematology Association 2009.

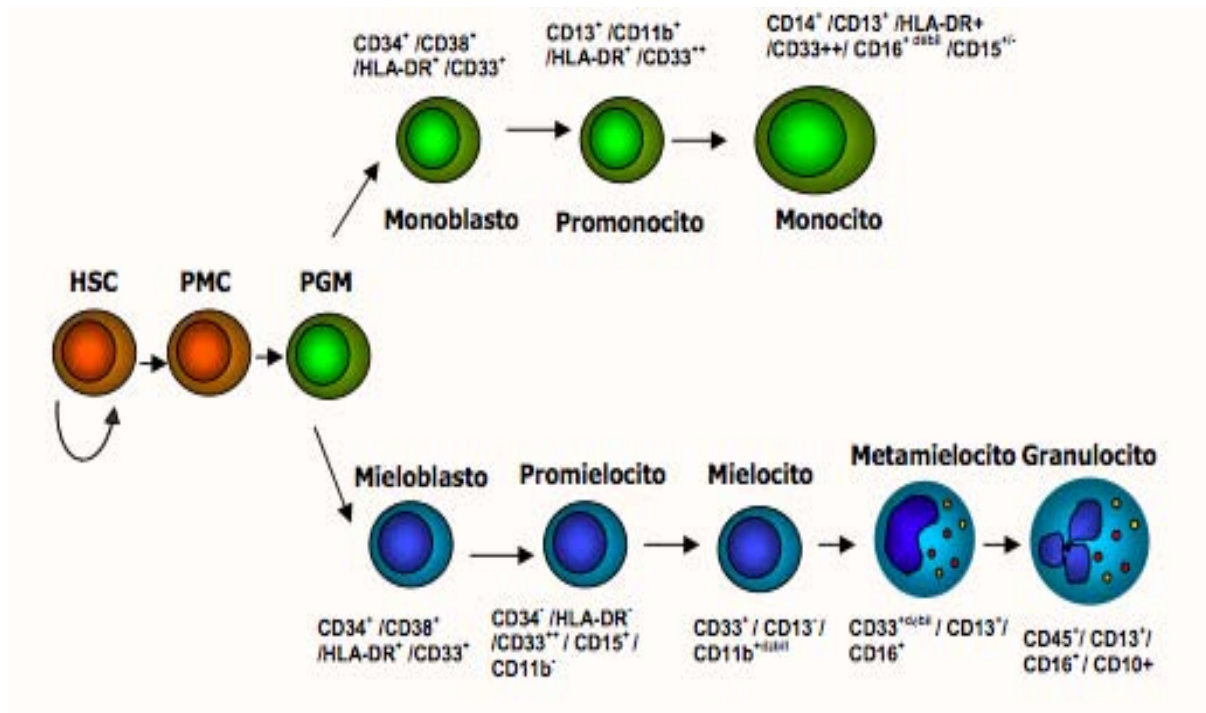


Figura 3. Expresión antigénica de las células mieloides y monocíticas en los diferentes estadios madurativos. HSC: stem cell hematopoyética; PMC: progenitor mioide común; PGM: progenitores granulocíticos/monocíticos. Tomada y modificada de Terstappen LW, Safford M, Loken MR. Flow cytometric analysis of human bone marrow. III. Neutrophil maturation. Leukemia 1990.

En cuanto a la línea monocítica, desde un punto de vista fenotípico/antigénico, el precursor es indistinguible del precursor mioide o mieloblasto (CD34+HLA-DR+CD38+CD33+). A diferencia de lo que ocurre en otras líneas hematopoyéticas, los conocimientos fenotípicos sobre la diferenciación monocítica siguen siendo todavía relativamente escasos. Se ha sugerido que la adquisición de positividad intensa para CD33 en las células CD34+ indicaría diferenciación hacia la línea monocítica. Asimismo, durante su diferenciación inicial la célula monocítica ganaría intensidad de CD33 antes de empezar a perder CD34, al contrario que ocurriría en la célula mioide.⁵²

La célula monocítica, a diferencia de la mioide, expresa HLA-DR durante toda su diferenciación. En el estadio II la célula monocítica se caracteriza por un aumento importante en la expresión de CD11b, CD13 y CD33. En el estadio III la célula monocítica gana el antígeno CD14, que va aumentando de intensidad a medida que el monocito madura, al igual que el CD45. Los antígenos CD15 y CD16 también se expresan en el monocito maduro, pero más débilmente que en la línea mioide (Fig. 3).

La intensidad de expresión de CD33 y CD13 se mantiene fuerte durante toda la diferenciación monocítica. Comparado con los neutrófilos, en los monocitos maduros la expresión de CD13 es más heterogénea y la de CD33, más homogénea.⁵¹

5.1 Regulación de la transcripción

Del mismo modo que en la diferenciación y maduración celular, existe una jerarquía en el orden de actuación de los factores de transcripción que controlan la mielopoyesis. La hematopoyesis se inicia con la generación de células pluripotenciales hematopoyéticas a partir del mesodermo. RUNX1 (AML1) y SCL (TAL1) son los factores de transcripción críticos en este proceso.⁵³ Los genes Homeobox (Hox), MYC, la vía de señalización WNT/Beta catenina, NOTCH y Bmi-1 tienen un importante papel en la autorreplicación de las células pluripotenciales y en el inicio de la diferenciación mieloide.^{54,55}

Las fases iniciales de la diferenciación mieloide están reguladas por dos genes principales PU.1 y GATA-1. PU.1 dirige las células pluripotenciales hematopoyéticas hacia el progenitor linfoide-mieloide e interacciona con GATA-1 para inhibir el compromiso de las células pluripotenciales hacia el progenitor eritroide/megacariocítico.⁵⁶

PU.1 se expresa en diferentes niveles de la diferenciación hematopoyética, se detecta en las células pluripotenciales, en los progenitores mieloides y linfoides comunes y en las células mieloides y linfoides B maduras.

PU.1 tiene un papel crucial para determinar el destino celular tanto en los progenitores mieloides como en los linfoides. En la línea mieloide, los niveles altos de PU.1 se asocian con la producción de macrófagos y los niveles bajos, con la producción de granulocitos.

En un siguiente paso, la producción de progenitores granulocíticos/monocíticos (PGM), el factor de transcripción más importante es CEBPA. CEBPA se expresa en las células pluripotenciales hematopoyéticas, en los progenitores mieloides y en los

granulocitos, pero no en los macrófagos. CEBPA también regula las propiedades de autorreplicación de la stem cell hematopoyética. Y por último en la diferenciación hacia granulocito o hacia monocito/macrófago intervienen PU.1 e IRF8.⁵⁷

En la línea mieloide, IRF8 (ICSBP) se expresa en progenitores y en macrófagos, pero no en granulocitos. IRF8 tiene un papel fundamental en los estadios finales de la diferenciación monocítica. C-Jun también coopera con PU.1 en la diferenciación monocítica.⁵⁸ La fase terminal de diferenciación neutrofílica está regulada especialmente por CEBPE y GFI1 (Fig. 4).

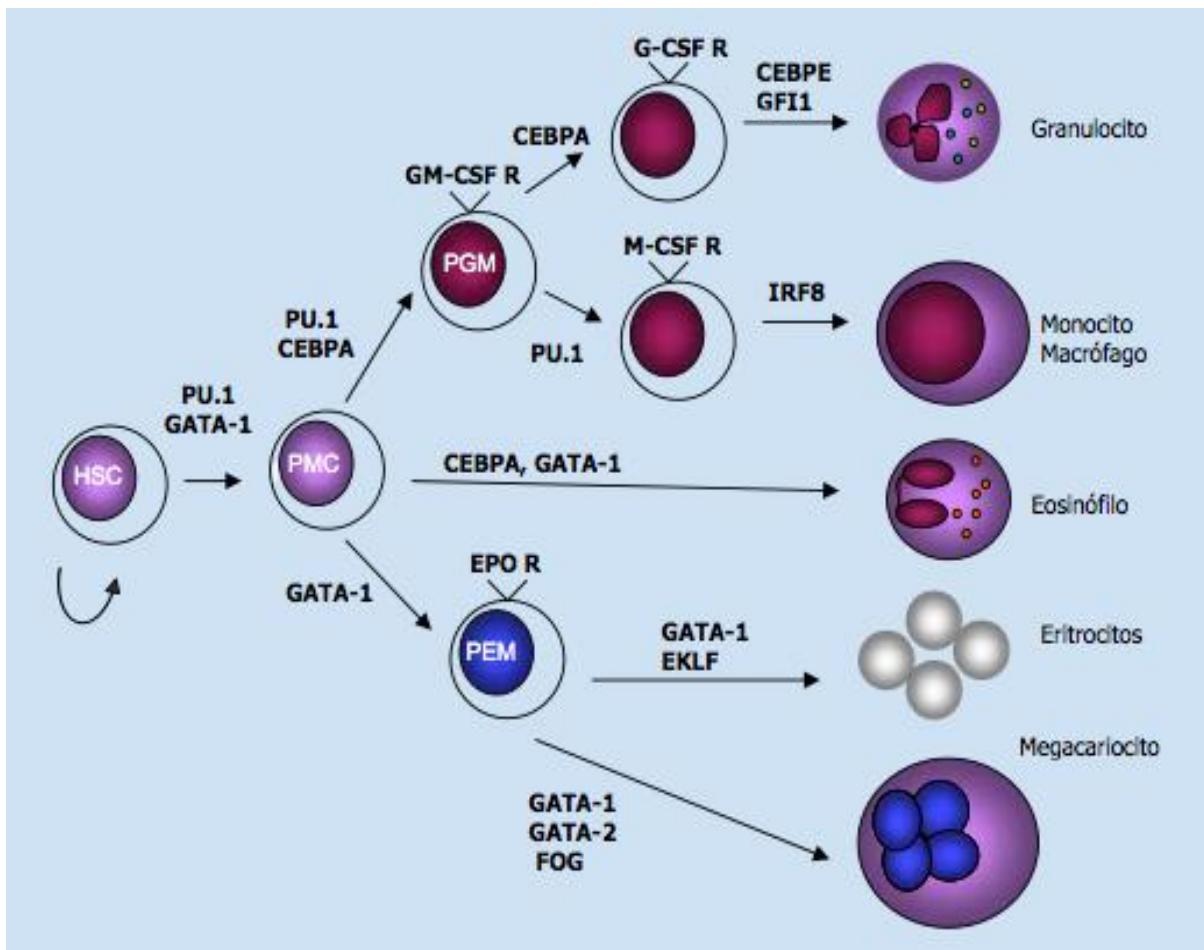


Figura 4. Factores de transcripción críticos en la diferenciación mieloide normal.

PU.1 dirige la stem cell hematopoyética (HSC) hacia el progenitor mieloide común (PMC) e interacciona con GATA-1 para inhibir el compromiso de la stem cell hacia el progenitor eritroide/megacariocítico (PEM). CEBPA tiene un papel indispensable en la transición del PMC a progenitores granulocíticos/monocíticos (PGM). De forma similar, CEBPE y GFI1 son cruciales en los estadios finales de la maduración neutrofílica. La producción de macrófagos depende de PU.1 e IRF8. PU.1 es esencial en los estadios intermedios mientras que IRF8 desempeña su papel en los estadios finales de la diferenciación monocítica. Imagen tomada y modificada de Rosmarin AG, Yang Z, Resendes KK. Transcriptional regulation in myelopoiesis: Hematopoietic fate choice, myeloid differentiation, and leukemogenesis. *Experimental Hematology* 2005.

La acción de los factores de transcripción sobre los progenitores hematopoyéticos está modulada por citocinas.³⁵⁴ Las citocinas, muchas de ellas factores de crecimiento, actúan en general mediante la unión a sus receptores celulares. Esta unión provocará una serie de eventos intracelulares que finalmente afectarán a la síntesis de ADN produciendo una activación o inhibición de la proliferación y diferenciación celular, o bien regulando la viabilidad celular a través de la inducción o bloqueo de la apoptosis.³⁵⁵

Existe una larga lista de citocinas que modulan la hematopoyesis. Unas tienen acción en estadios más iniciales como SCF o FLT3, otras estimulan colonias formadoras de líneas celulares específicas como la eritropoyetina o trombopoyetina y otras estimulan el crecimiento de varias líneas celulares como GM-CSF, o las interleucinas (IL-3, IL-4, IL.6, etc).^{50,56}

La activación de proteínas tirosín-cinasas intracelulares y de sus receptores estimula la fosforilación de proteínas y provoca diferentes eventos a nivel intracelular que darán lugar a la actividad transcripcional en el núcleo y a la estimulación del ciclo celular.

En las células normales la proliferación celular está regulada por factores de crecimiento y señales de adhesión, pero estos mecanismos pueden estar activados de manera autónoma en las células leucémicas. Esta proliferación anormal a menudo es el resultado de mutaciones que afectan a las vías de señalización de la proliferación. Al igual que ocurre con la tirosín-cinasa BCR-ABL en la leucemia mieloide crónica (LMC), se ha observado la implicación de cinasas activadas en la patogénesis de la LMA.

Las mutaciones en los receptores tirosín-cinasa (RTK) se han documentado en aproximadamente el 50% de los pacientes con LMA. FLT3 es una tirosín-cinasa que se expresa en casi todos los pacientes con LMA y que se encuentra activada de forma constitutiva por una duplicación interna en tándem del dominio yuxtamembrana (FLT3- ITD) o por mutaciones dentro del bucle de activación de la cinasa en aproximadamente el 30% de las LMA).⁵⁹

Se ha observado que estas mutaciones tienen un importante valor pronóstico.^{60,61} Las células leucémicas pierden la capacidad limitada de replicación. A diferencia de las células progenitoras normales que están comprometidas a una línea hematopoyética, las células leucémicas mantienen la capacidad de replicación a pesar de estar comprometidas a una línea celular específica. Algunas mutaciones recurrentes en la LMA confieren la propiedad de autorreplicación a las células CD34+, como es el caso de la FLT3-ITD o las mutaciones de NPM1.⁶²

6. FLT3 (*FMS-like tyrosine kinase 3*)

6.1 Historia de FLT3

En 1996, Nakao et al.⁶³ encontraron por primera vez una mutación única de FLT3 en células de LMA.

FLT3 (*FMS-like tyrosine kinase 3*)^{64,65}, también denominado FLK-2 (*fetal liver kinase-2*)⁶⁶ o STK-1 (*human stem cell kinase-1*)⁶⁷ es un receptor de transmembrana perteneciente a la familia de receptores tirosina-cinasa Clase III; también pertenecen a esta familia el Receptor del Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos (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 yuxtamembrana (JM), una región intracelular con dos dominios tirosina-cinasa (TKD) interrumpidos por un inserto cinasa y, una cola intracelular en el extremo C- terminal.^{68,69}(Fig. 5)

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.^{64,65,70,71} Existen dos isoformas del receptor: una asociada a membrana (158- 160 KDa) y otra forma citoplasmática (130-143 KDa).^{72,73}

FLT3 es expresado principalmente en células madres hematopoyéticas CD34(+) ⁷⁴ y, su ligando fisiológico (FL) se expresa en células del estroma medular.⁷⁵ La interacción FL-FLT3 involucra diferentes vías de señalización (MAPK, STAT, PI3K/AKT) que intervienen en la regulación de la diferenciación, proliferación, apoptosis y sobrevida celular.⁷⁶

Existen evidencias clínicas y experimentales que indican que FLT3 es un proto-oncogén con capacidad de prolongar la sobrevida y aumentar la capacidad proliferativa de blastos leucémicos.^{74,77,78}

FLT3 es expresado por las células hematopoyéticas inmaduras y es importante para el desarrollo normal de las células madre y el sistema inmunológico. El gen FLT3 codifica una proteína 1000 y 993 aminoácidos en el ratón y el humano, respectivamente,^{79,80} y se expresa en las células hematopoyéticas inmaduras, la placenta, las gónadas y el cerebro.^{81,82} estudios de inmunoprecipitación de FLT3 expresado en células COS-7, y en otros tipos celulares, demuestran una banda principal con alrededor de 140 kDa, y una menos abundante, la banda más difusa de aproximadamente 160 kDa.

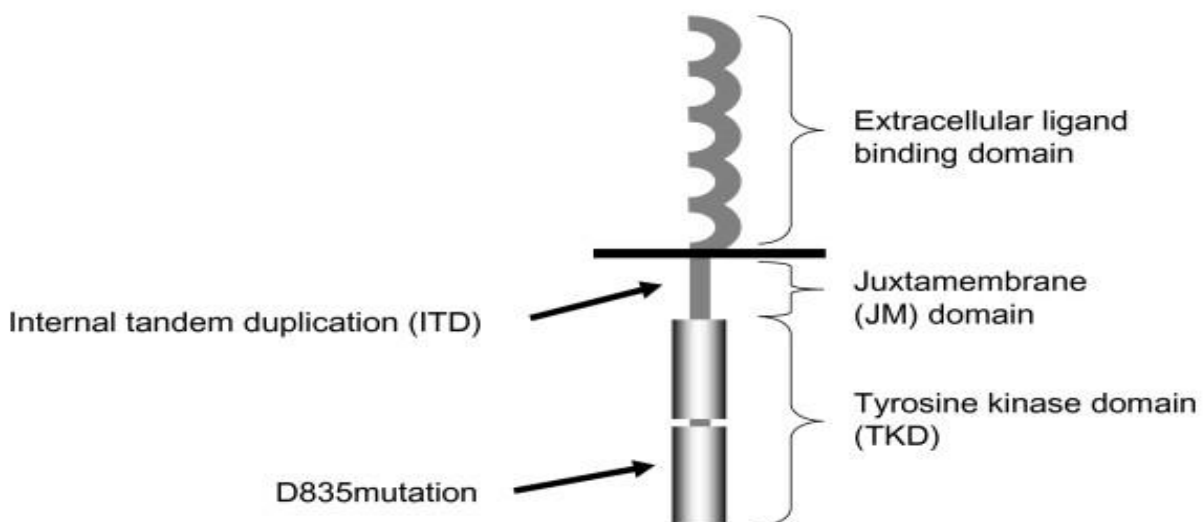


Figura 5. Representación esquemática del receptor FLT3. Tomada y modificada de Downstream molecular pathways of FLT3 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia: biology and therapeutic implications; Takahashi Journal of Hematology & Oncology 2011 4:13 doi:10.1186/1756-8722-4-13 NCBI4.

Experimentos de marcaje y seguimiento demuestran que la banda más grande se deriva de la banda más pequeña por N-glicosilación postraduccional y se localiza en la membrana.^{82,83}

Los pacientes con mutaciones FLT3 tienden a tener un mal pronóstico. Las mutaciones más a menudo implican pequeñas duplicaciones en tándem de aminoácidos dentro del dominio yuxtamembranal del receptor y resulta en la actividad constitutiva de la tirosina cinasa. El FLT3 mutante es detectable en la LLA y en la LMA. Las mutaciones de FLT3 se han detectado en aproximadamente el 30% de los pacientes con leucemia mieloide aguda y un pequeño número de pacientes con leucemia linfocítica aguda o síndrome mielodisplásico.⁸⁴

6.2 Función y estructura

Tras la interacción del receptor con el ligando FLT (FL), el receptor experimenta un cambio conformacional, que resulta en el desarrollo del receptor y la exposición del dominio de dimerización, lo que permite al receptor tomar lugar con el receptor de dimerización. Esta dimerización del receptor es el preludio de la activación de la enzima tirosina cinasa, que conduce a la fosforilación de diferentes sitios en el dominio intracelular.

El receptor activado recluta a un número de proteínas en el citoplasma para formar un complejo de interacciones proteína-proteína en el dominio intracelular.

Las proteínas Shc, GRB2, GRB2 asociada a aglutinante 2 (Gab2), SHIP, CBL, y CBLB (proteína relacionada CBLB) son algunas de las muchas proteínas adaptadoras que interaccionan con el receptor FLT3 activado.^{85,86}

Como cada proteína se une al complejo, que se activa a su vez, resulta en una cascada de reacciones de fosforilación que culmina en la activación de una serie de mediadores secundarios, incluyendo la MAP cinasa y vías de transducción de señal de cinasa STAT y AKT/PI3.

Activados, estos mediadores son chaperones a la interfase nuclear por HSP90, donde el mensaje se transloca al núcleo. En el núcleo, estos mediadores transcripcionales desencadenan una serie de eventos que culminan en la regulación de la diferenciación celular, la proliferación de la apoptosis y la supervivencia celular (Fig.6).

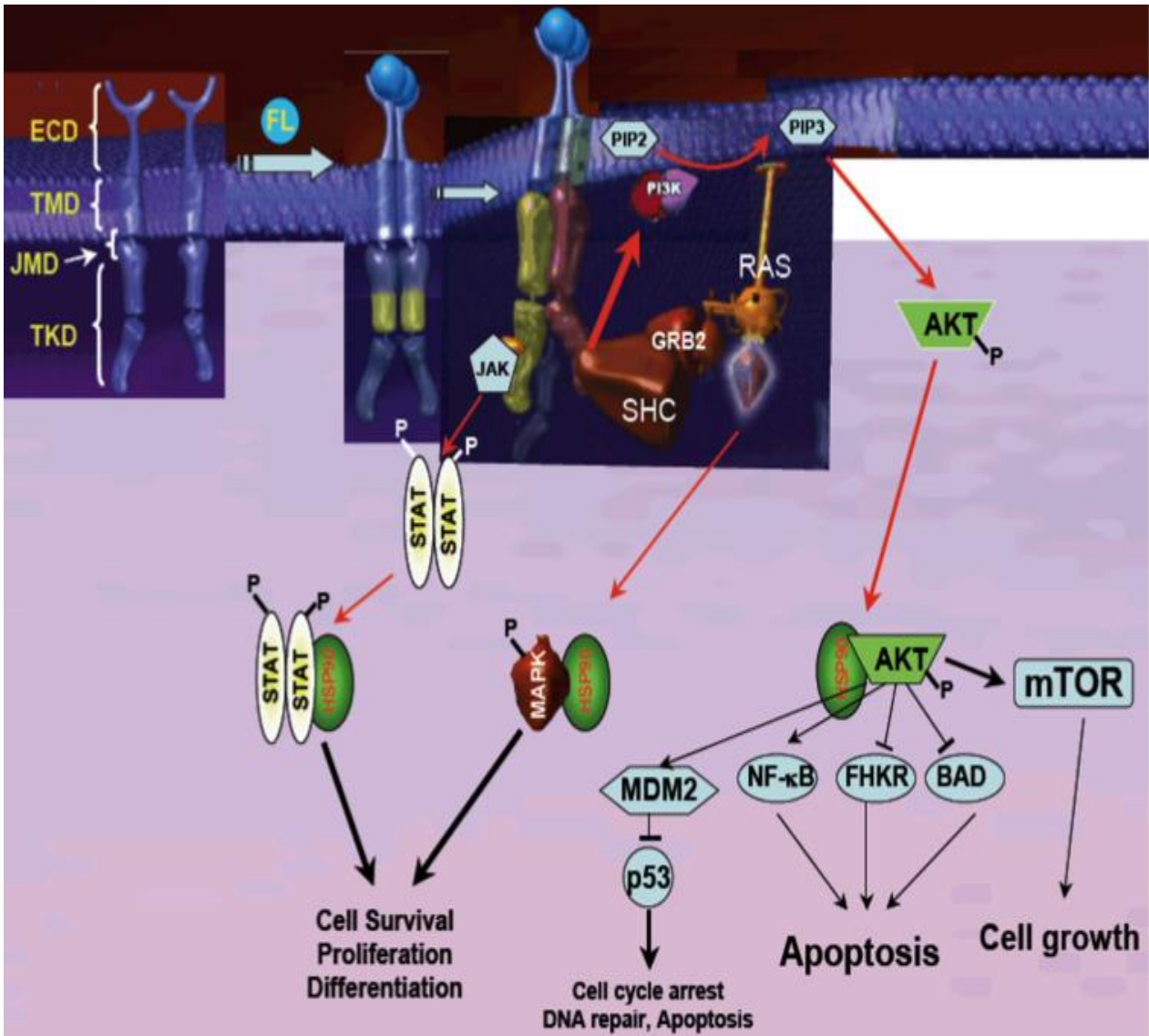


Figura 6.- FLT3 vía de transducción de señal. El receptor monómero FLT3 se compone de un dominio extracelular (ECD), un dominio transmembranaral (TMD), un dominio yuxtamembrana (JMD) y un dominio de tirosina cinasa (TKD) interrumpido por una inserción de cinasa corto. La unión a ligando FLT3 (FL) conduce a la dimerización del receptor y la activación de la cinasa intracelular. La activación de la tirosina cinasa conduce a la fosforilación de múltiples sitios en la fracción de la cinasa intracelular. El receptor activado recluta a un número de proteínas en el citoplasma incluyendo SHC y GRB2 para formar un complejo de interacciones proteína-proteína, conduciendo a la activación de un número de mediadores intracelulares incluyendo AKT, MAPK y STAT. Mediadores activados que interactúan con HSP90 que los protege de la inactivación y los chaperones mediadores activos a la interfase nuclear, donde son liberados en el núcleo y actúan para mediar las funciones celulares vitales, incluyendo el crecimiento celular, la diferenciación, la apoptosis, la reparación del ADN y la proliferación. Figura tomada y modificada de Structural and functional Alterations of FLT3 in Acute Myeloid Leukemia; Soheil Meshinchi and Frederick R. Appelbaum Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA; Clin Cancer Res. 2009 July 1; 15(13): 4263–4269. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1123.

6.3 Función de FLT3 en la hematopoyesis

La activación de FLT3 regula una serie de procesos celulares (por ejemplo, el metabolismo de fosfolípidos, la transcripción, la proliferación y la apoptosis), y a través de estos procesos, la activación de FLT3 desempeña un papel crítico en el gobierno de la hematopoyesis normal y el crecimiento celular.^{87,88}

La función óptima de FLT3 requiere el esfuerzo coordinado de otros factores de crecimiento tales como SCF, e IL3.^{88,89} En la hematopoyesis humana normal, la expresión de FLT3 está restringida a la inmadurez de progenitores hematopoyéticos, incluyendo células madre CD34⁺ hematopoyéticas (HSCs).⁹⁰ La estimulación de FL de progenitores hematopoyéticos sin otros factores de crecimiento solicitara diferenciación monocítica, mientras que las combinaciones de factor de células madre, interleucina 3, y FL inducirán la proliferación y el mantenimiento de células progenitoras CD34⁺ / CD38⁻.^{91,92}

Se han encontrado combinaciones de FL y otros factores de crecimiento para promover la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas primitivas, así como más comprometidas con los primeros precursores mieloides y linfoides.^{87,88,93,94} la estimulación de FL parece mediar en la diferenciación de los progenitores tempranos, cuando los progenitores hematopoyéticos se exponen a FL, conducen a la diferenciación monocítica, sin proliferación significativa.⁸⁸ Aunque los ratones knock-out de FLT3 tienen un fenotipo sutil,⁹⁵ los ratones trasplantados con células FLT3 knock out muestran una interrupción más global de la hematopoyesis.⁹⁵ Además, si ambos KIT y FLT3 fueron eliminados, los ratones desarrollaron severas deficiencias, que limitan la vida hematopoyética.

Por lo tanto, los datos *in vitro* y los modelos de animales knock-out confirman un papel importante de FLT3 en la hematopoyesis normal, sobre todo en momentos de estrés hematopoyético. La expresión de FLT3 se ha evaluado en tumores malignos hematológicos.

La mayoría de las células B en LLA y blastocitos de la LMA (> 90%) expresan FLT3 en diferentes niveles.⁹⁶ Aunque con menos frecuencia y con más niveles de expresión variables, los receptores de FLT3 se expresan también en otras neoplasias malignas hematopoyéticas, incluyendo mielodisplasia (MDS), leucemia mieloide crónica (LMC), células T de LLA y leucemia crónica linfocítica (LLC).⁹⁶

Los datos recientes sugieren que los niveles muy altos de receptores FLT3-WT pueden promover la activación constitutiva del receptor nativo en células malignas,⁹⁷ y otros estudios han encontrado que el aumento de la expresión de FLT3-WT en los blastos leucémicos puede estar asociada con un peor pronóstico.⁹⁸ En las neoplasias hematológicas, los altos niveles de expresión de FLT3 se han detectado en blastos de LMA (70% -100%) y leucemia linfoblástica aguda.^{99,100}

6.4 Expresión de FLT3 en las células hematopoyéticas

FLT3 se expresa en una variedad de líneas celulares humanas y murinas tanto de linaje mieloide como de Beta-linfoide.^{101,102} En la médula ósea normal, la expresión parece estar restringida a los primeros progenitores, incluyendo células CD34⁺ con altos niveles de expresión de CD117 (c-KIT).^{103,104}

FLT3 también se expresa en altos niveles en un espectro de enfermedades hematológicas malignas, incluyendo el 70% a 100% de la leucemia mielógena aguda (LMA) de todos los subtipos de la clasificación (FAB), células precursoras B de leucemia aguda linfoblástica (LAL), una fracción de células T LLA, y en la leucemia mieloide crónica (LMC) en crisis linfoide blastica.^{103,105}

La interrupción del blanco del gen FLT3 da como resultado ratones adultos sanos con niveles normales de las poblaciones hematopoyéticas maduras.¹⁰⁶ Sin embargo, existen deficiencias en progenitores linfoides B primitivos, y trasplantes de médula ósea (BTM), los experimentos muestran una disminución de la capacidad de las células madre que carecen de FLT3 para reconstituir las células T y células mieloides.¹⁰⁷

Estos datos demuestran un papel importante para FLT3 en el desarrollo de las células troncales hematopoyéticas y células B.

6.5 Vías descendentes de FLT3

La activación de FLT3 medida por su ligando induce la autofosforilación en residuos de tirosina, creando de este modo sitios de acoplamiento para moléculas de transducción de señales efectoras y la activación de diversas vías de señalización.

La cascada de señalización corriente abajo implica la fosforilación de tirosina y la activación de múltiples moléculas citoplasmáticas. (Fig.7) El dominio citoplásmico de FLT3 se asocia físicamente con la subunidad p85 de la fosfo-inositol-3-cinasa (PI3K), Ras GTPasa, fosfolipasa C- γ , Shc, el crecimiento de la proteína unida a el receptor del factor de crecimiento b2 (Grb2) y de la familia Src de tirosina cinasa, resulta en la fosforilación de estas proteínas.¹⁰⁸

Estas acciones afectan a la activación de las vías de señalización descendentes de PI3K/protein cinasa B (Akt) y la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK).^{109,110} El FL exógeno aumenta la proliferación de blastos no sólo para los pacientes con el tipo salvaje de FLT3, sino también para los pacientes con FLT3-DTI, así como en pacientes con mutaciones FLT3-TKD.

Por lo tanto, la activación de FLT3 mediada por parece ser importante para ambos tipos de señalización tanto para FLT3 nativo así como para el de tipo mutado FLT3.¹¹¹

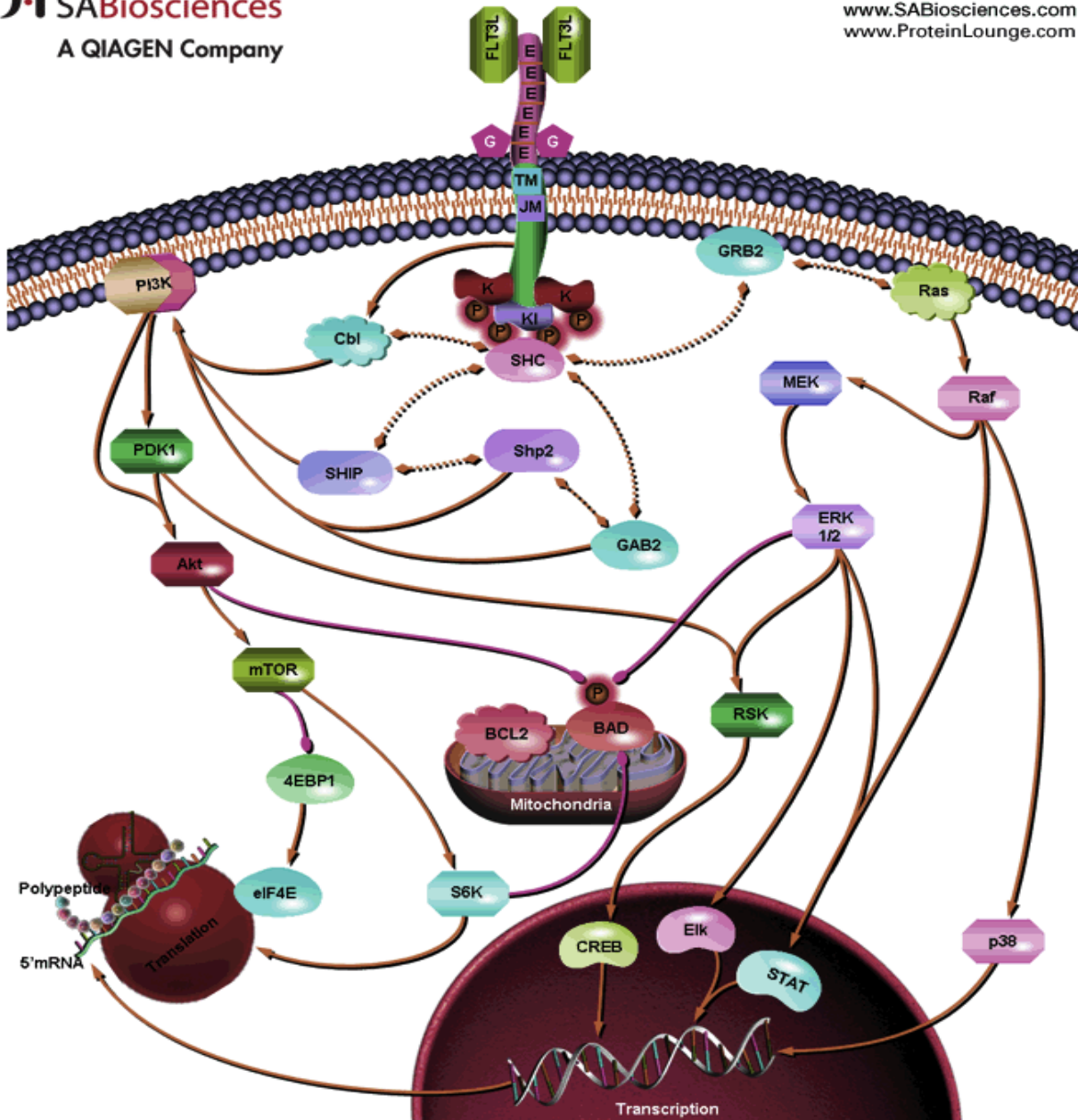


Figura 7. Cascada de señalización de FLT3. Aunque la cascada de señalización de FLT3 no ha sido caracterizada definitivamente, aquí se muestran algunas asociaciones y efectos intracelulares que probablemente suceden después de la activación de FLT3. La unión de FL a FLT3 desencadena las rutas de PI3K y RAS, lo que lleva a la proliferación celular incrementada y a la inhibición de la apoptosis. La actividad de PI3K probablemente es regulada a través de varias interacciones entre FLT3, intermediarios SHC y una o algunas otras proteínas, tal como SHIP, SHP2, CBL y GAB2. La PI3K activada, estimula a otras proteínas como PDK1, PKB/AKT y al receptor mTOR, que inducen la transcripción y traducción de genes reguladores cruciales, mediante la activación de la cinasa p70 s6 (SK6) y la inhibición de 4E-BP1 (factor de iniciación de unión-4E). Además, la activación de PI3K, bloquea la apoptosis a través de la fosforilación de la proteína BAD. El FLT3 activado también se asocia con GRB2 mediante SHC, activando a RAS. La activación de RAS estimula efectores como RAF, MPK, ERK y la proteína cinasa S6 ribosomal de 90 kDa. Estos efectores activan a CREB, ELK y a STAT, que llevan a la transcripción de genes involucrados en la proliferación. Ambas rutas probablemente interactúan con muchas otras proteínas antiapoptóticas y del ciclo celular, como WAF1, KIP1 y BRCA1 (imagen tomada y modificada de SABiosciences.com)

6.6 Leucemia mieloide aguda con anomalías genéticas de FLT3

La tirosina cinasa 3 (FLT3) es un receptor tirosina quinasa, que regula el crecimiento de las células hematopoyéticas mediante la interacción con su ligando.¹¹² las duplicaciones internas en tándem (DTI) del gen FLT3 se han reportado en aproximadamente el 20% de los adultos con LMA y 10% a 12% de los casos de LMA infantil.^{113,114}

La DTI de FLT3 resulta en un ligando-independiente del crecimiento de células hematopoyéticas e induce un síndrome mieloproliferativo en modelos murinos¹¹⁵ y se asocia con una mala respuesta a la quimioterapia y un triste pronóstico.^{113,114}

La incorporación de inhibidores de la cinasa FLT3 en los protocolos de tratamiento actuales podrían ofrecer oportunidades para mejorar los resultados.^{116,117} Un anticuerpo monoclonal contra FLT3 con actividad anti leucémica también ha sido recientemente desarrollado.¹¹⁸

A diferencia de la LMC, hay abundantes evidencias de que son necesarias mutaciones en 2 ó más genes para causar una LMA.^{119,120} La mayoría de los oncogenes de fusión resultantes de una translocación balanceada, como es PML-RARA o AML1-ETO, no son suficientes por sí mismos de inducir una LMA en modelos murinos. Los oncogenes de fusión más comunes afectan a genes que codifican factores de transcripción.²⁸⁶ Estas proteínas de fusión inhiben la diferenciación de las células mieloides, a menudo interfiriendo con la función del factor de transcripción, como es el caso del complejo CBF (AML1-ETO, CBFβ-MYH11), PML-RARA y las anomalías de MLL.

Por otro lado, existen otros oncogenes que tienen menos habilidad de inhibir la diferenciación, pero que provocan una alteración en la regulación del ciclo celular, en la proliferación y/o inhibición de la apoptosis. Las mutaciones en tirosín-cinasas como FLT3 o KIT o mutaciones de N-RAS o K-RAS son ejemplos de este tipo de oncogenes. Estos dos tipos de oncogenes, denominados de clase II (cuando bloquean la diferenciación) y de clase I (cuando inducen proliferación) (Fig.8), cooperan dando lugar al desarrollo de una LMA en modelos animales.¹¹⁹

Este modelo sugiere que para el desarrollo de la LMA se requiere un oncogén de cada clase. Por tanto, para comprender la base genética de las LMA y el impacto pronóstico de las diferentes alteraciones moleculares, es necesario analizar las diferentes anomalías genéticas de forma conjunta.⁷⁰

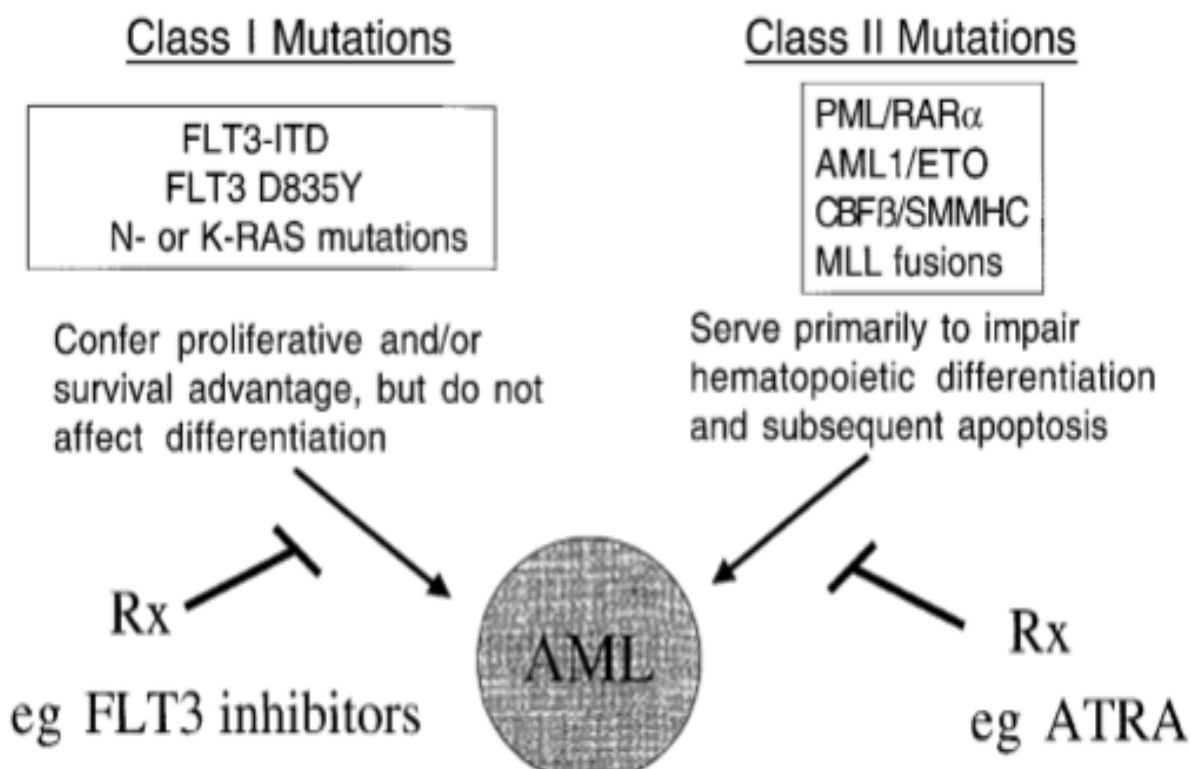


Figura 8. Modelo de cooperatividad de la activación de mutaciones en el gen FLT3 y reordenamientos que implican factores de transcripción hematopoyéticos. El modelo de cooperatividad se basa en la observación de que las mutaciones DTI de FLT3 se han asociado con todos los subtipos FAB de la LMA, y con la mayoría de los desplazamientos cromosómicos conocidos asociados con LMA, incluyendo la t(8; 21), inv(16), t(15; 17), y el reordenamiento del gen MLL. Hay 2 amplias clases de mutaciones que contribuyen a la LMA: mutaciones de clase I y de clase II. FLT3-ITD sería un ejemplo de una de mutaciones de clase I que, solo, confiere una ventaja proliferativa y la supervivencia de progenitores hematopoyéticos, pero no afecta a la diferenciación. Otro ejemplo de las mutaciones de clase I sería la activación de mutaciones en el N-RAS o K-RAS en la LMA. En contraste, las mutaciones de clase II se ejemplifican por AML1/ETO, CBF β / SMMHC, PML / RAR α , y los genes de fusión MLL-relacionadas parecen dañar la diferenciación hematopoyética, pero no son suficientes para causar leucemia cuando se expresan solos. Se postula que la expresión de ambas clases de mutaciones resulta en el fenotipo LMA caracterizada por un aumento de la proliferación y la capacidad de supervivencia de las células progenitoras, y por alteración de la diferenciación. La hipótesis tiene implicaciones importantes en el enfoque a nuevas terapias de LMA, en que la orientación molecular de ambas proteínas DTI de FLT3 y la fusión que implican factores de transcripción pueden mejorar el resultado en la LMA. Imagen tomada y modificada de Gilliland.

Se ha descrito que el 62% de las mutaciones presentes en la LMA están solapadas con otras mutaciones (Fig 9).¹²¹

Las mutaciones de AML1, FLT3-TKD, FLT3-ITD, N- RAS y NPM1 son las que con mayor frecuencia se solapan con otras mutaciones. Por el contrario, PML-RARA y AML1-ETO se asocian con otras mutaciones de forma menos habitual. La asociación observada con mayor frecuencia es la de las mutaciones de FLT3/NPM1, seguida por FLT3/MLL-PTD, FLT3/CEBPA, FLT3/PML-RARA, KIT/AML1-ETO y mutación de p53/MLL-PTD.

No se han identificado mutaciones de FLT3 y KIT en un mismo paciente. Tampoco se ha detectado asociación de PML-RARA, AML1-ETO, CBFβ- MYH11 y anomalías de MLL con mutaciones de CEBPA ni de AML1. Habitualmente suele existir la combinación de una mutación de clase I con una mutación de clase II. Se ha descrito la asociación entre mutaciones de una misma clase (generalmente suelen ser N- RAS, p53, MLL-PTD y NPM1). En estos casos se suelen identificar más de 2 mutaciones y generalmente suele coexistir una mutación de clase I y una de clase II.¹²¹

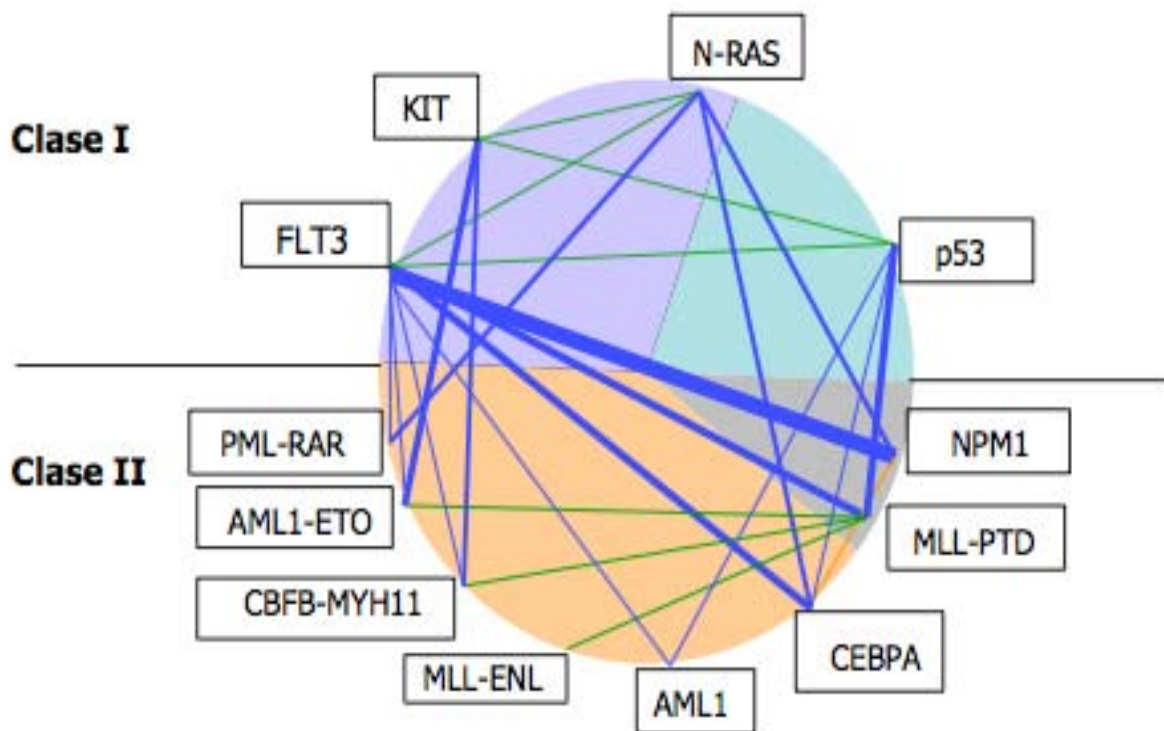


Figura 9. Modelo cooperativo de leucemogénesis. Patrón de asociación de las diferentes mutaciones. Las líneas verdes indican asociación entre mutaciones de una misma clase. El grosor de las líneas representa la prevalencia de la combinación de mutaciones. Tomada y modificada de Ishikawa Y, Kiyoi H, Tsujimura A, Miyawaki S, Miyazaki Y, Kuriyama K, Tomonaga M, Naoe T. Comprehensive analysis of cooperative gene mutations between class I and class II in de novo acute myeloid leukemia. Eur J Haematology 2009; 83: 90-98.

7. FLT3 EN LEUCEMIAS HUMANAS

7.1 La expresión de FLT3 en leucemias humanas

FLT3 se expresa a niveles elevados en 70% a 100% de los casos de LMA y en un alto porcentaje de los casos de LLA.^{108,109} Se ha reportado que la expresión del gen FLT3 en blastos de leucemia en 18 de 22 casos de LMA y 3 de cada 5 casos de LLA.¹⁰³ Se ha encontrado ARN expresado en niveles más altos que en la médula ósea normal en 33 de 33 del linaje B en LLA, 11 de 12 de LMA, y 3 de 11 células T en casos de LLA. Por medio de Western Blot no se detectó la expresión de FLT3 en la médula ósea normal, pero identificó la expresión de la proteína FLT3 en 14 de 14 pacientes con LLA de células B en 36 de 41 de pacientes con LMA, y 1 de 4 pacientes con LLA de células T.¹²⁴

Estos datos indican que la expresión de FLT3 puede jugar un papel en la supervivencia o la proliferación de blastos leucémicos. FL indujo la proliferación de blastos leucémicos dependientes de la dosis en 36 de 45 pacientes con LMA y es sinérgico cuando se utiliza en combinación con G-CSF, GM-CSF, IL-3.¹²⁵

FLT3 se expresa también en niveles elevados en la leucemia y líneas celulares de linfoma,^{126,127} incluyendo pre-B, mieloide, y líneas celulares monocíticas, y la expresión de FL puede ser detectada en la mayoría de líneas celulares. En una serie, 40 de 110 líneas de células examinadas expresaron ambas FL y FLT3, lo que sugiere que la estimulación autocrina puede también jugar un papel en la proliferación de los blastos de leucemia.¹²⁷

7.2 Importancia clínica de mutaciones FLT3

La identificación de mutaciones FLT3 en la LMA ha dado nuevos enfoques para el manejo de esta enfermedad. Ya sea a través de su utilidad como factores pronósticos o de su uso como un objetivo para las terapias dirigidas, las mutaciones de FLT3 han proporcionado a los médicos nuevas opciones terapéuticas para un subconjunto de pacientes con LMA.¹²⁸

8. INTRODUCCIÓN A MUTACIONES DE FLT3

Las alteraciones genómicas del gen FLT3 conducen a la activación del receptor autónomo, desregulación de las vías de señales transducción de FLT3, contribuye a la patogénesis mieloide, y se han relacionado con la respuesta al tratamiento y el resultado clínico. La exploración de los mecanismos por los cuales estas alteraciones de FLT3 conducen a la proliferación desregulada proporcionaría una mejor comprensión de la patogénesis molecular de la LMA y puede proporcionar conocimientos sobre las posibles intervenciones terapéuticas.¹²⁹

Las mutaciones de FLT3 se han detectado en aproximadamente el 30% de los pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) y en un pequeño número de pacientes con leucemia linfocítica aguda o síndrome mielodisplásico.¹³⁰

Desde el descubrimiento de las mutaciones de FLT3 en 1996, ha habido un interés significativo en el examen de la biología molecular y la importancia clínica de estas mutaciones. Los datos actuales sugieren que las mutaciones de FLT3 no son suficientes para la transformación leucémica y requieren la cooperación de otras alteraciones genómicas para la evolución del fenotipo leucémico.²⁸³ Además, la biología de estas mutaciones es bastante compleja, con una heterogeneidad significativa del tipo de mutación (DTI vs ALM), nivel de expresión, tamaño y relación alélica, lo que afecta su biología y la respuesta clínica.

Con la evolución de los datos de adquisición de LOH en pacientes con FLT3/DTI²⁵², parece que la evolución clonal de células con FLT3/DTI puede llevar al estado homocigótico (aUPD), impactar la biología de la enfermedad y el resultado clínico. De hecho, hay datos de que aUPD puede ser un evento más común de lo que se reconoce en la evolución de la LMA. El conocimiento en la variabilidad genética de FLT3 ha hecho hincapié en la magnitud de la complejidad en la LMA. Una mayor comprensión de cómo impactan las complejidades genómicas en las señales de transducción permitirían la orientación más adecuada de la vía de transducción de señales.¹²⁹

Las mutaciones de FMS-like tirosina cinasa 3 (FLT3) están entre las aberraciones moleculares frecuentemente reportadas en pacientes con LMA.²⁷⁹

Han sido identificados dos tipos principales: las mutaciones de duplicación interna en tándem (DTI) detectados en el 20-25% de los pacientes con LMA, y mutaciones puntuales en el dominio de la tirosina cinasa (TKD) que ocurren en 5-10% .^{131,132}

A pesar de que las inserciones DTI varían en longitud, siempre mantienen una orientación de cabeza a cola y preserva el marco de lectura. Se ha sugerido que un cambio conformacional en el dominio JM es responsable de la dimerización y activación del receptor.^{133,287}

El segundo tipo más común de las mutaciones de FLT3 en la LMA son las mutaciones en el bucle de activación del dominio de tirosina cinasa (TKD). Casi la totalidad de estas mutaciones implican una sustitución de aspartato-a-tirosina en el codón 835, aunque otras sustituciones también se han identificado.^{134,135} Estas mutaciones causan un cambio conformacional de la molécula y perturban su función autoinhibitoria, haciendo así el receptor constitutivamente activo.^{136,137,138}

Estudios recientes han sugerido que la alta carga alélica de FLT3-DTI se asocia con una mayor tasa de recaída precoz y una supervivencia global inferior (OS) en pacientes con cariotipo normal.^{140,141} Sin embargo, el impacto pronóstico de la mutación FLT3-TKD sigue siendo controversial.¹⁴¹

Ambos tipos de mutaciones causan la activación constitutiva de la actividad cinasa de FLT3, lo que convierte a las proteínas de señalización corriente abajo, dando lugar a la proliferación incontrolada de células.^{142,143}

Las mutaciones FLT3 son las mutaciones somáticas más comúnmente observadas en la leucemia mieloide aguda (LMA) y su presencia puede ser un factor pronóstico de mala evolución. En estudios con adultos han mostrado una prevalencia del 20% a más del 35% para la duplicación de FLT3 / interna en tándem (DTI) y un 7% adicional de FLT3 / de mutación puntual en el dominio de activación de FLT3^{144,145}

La prevalencia de FLT3/DTI en LMA pediátrica es aproximadamente un 15%, menor que en adultos,^{146,147} y la prevalencia de FLT3/ALM es del 7%, similar a la de adultos.¹⁴⁸

Los primeros estudios mostraron un peor pronóstico en los pacientes portadores de FLT3/DTI¹⁴⁹ Sin embargo, estudios más grandes que utilizan, quimioterapias intensivas más contemporáneas han mostrado un efecto más modesto en el pronóstico.^{150,151}

Además, diversas proporciones alélicas de FLT3/ITD han demostrado tener un significado pronóstico, aunque no ha sido establecido un umbral clínicamente útil para la relación alélica de FLT3-DTI (DTI-AR). Por otra parte, la importancia clínica de FLT3/ALM no ha sido bien establecida, aunque los primeros estudios para adultos sugieren que tales mutaciones pueden llevar a la significación clínica.^{152,153}

No se han realizado estudios pediátricos a gran escala diseñados para evaluar la importancia pronóstica de las mutaciones FLT3 en la LMA infantil, y dada la baja prevalencia de mutaciones FLT3 en niños, la subclasificación para definir los grupos de riesgo clínicamente significativos en los pacientes con mutaciones FLT3 no ha sido posible.

8.1 Vías descendentes de FLT3 oncogénico

Las mutaciones DTI de FLT3, así como las mutaciones de TKD, resultan en la activación constitutiva de la cinasa de FLT3. Las mutaciones en el dominio JM de FLT3 y bucle de activación pueden resultar en la pérdida de la función autoinhibitoria, con la posterior activación constitutiva de la cinasa de FLT3 y sus vías de señalización proliferativas corriente abajo, incluyendo la Ras/MAPK cinasa (MEK)/señal extracelular-vía cinasa regulada (ERK) y la vía PI3K/Akt¹³⁶.

Además, y en contraste con la señalización de FLT3 nativo, FLT3-DTI activa potentemente la vía STAT5.^{154,155} STAT5 induce sus genes diana, tales como la ciclina D1, c-myc y el gen p21 anti-apoptótico, los cuales son importantes para el crecimiento celular.^{156,157} Estos efectos pueden indicar un papel de FLT3-DTI en el crecimiento celular aberrante de las células leucemicas.^{110,158}

Otro grupo informó que otra cinasa serina treonina, Pim-1, se regula por FLT3-DTI y es importante para el crecimiento de células mediada por FLT3-DTI y efectos anti-apoptoticos.¹⁵⁹

En conjunto, FLT3-DTI induce constitutivamente STAT5 y Pim serina treonina cinasas y sus mecanismos pueden acelerar el crecimiento de células de LMA.

Es de destacar que más de dos tercios de los pacientes con LMA muestran fosforilación de FLT3, incluso en ausencia de la activación de mutaciones.^{160,161} El aumento de los niveles de transcripción de FLT3 se observan en un gran número de muestras de LMA, y este aumento de la expresión también puede contribuir a la fosforilación de FLT3 y a la activación de sus vías.¹⁶¹

Dado que varios receptores de tirosina cinasas son dimerizados y se activan incluso sin la unión del ligando al receptor¹⁶², la regulación al alza de FLT3 puede facilitar su dimerización y de ese modo mejorar la fosforilación. Mientras tanto, se ha demostrado que hay un aumento en la autofosforilación de FLT3 cuando se incubaron blastos leucémicos en el medio durante un tiempo después de ser descongelado, en comparación con las células blásticas recién descongeladas y lavadas, estos resultados indican que la forma soluble secretada de FL juega un papel en las células con la activación constitutiva de FLT3 de tipo salvaje.¹⁶⁰

9. FLT3 DUPLICACIÓN INTERNA EN TÁNDEM (FLT3/DTI)

Estas mutaciones son el resultado de una duplicación segmental de un fragmento dentro de la región de codificación de dominio yuxtamembrana (codificado por los exones 14 y 15) de FLT3, y son el tipo más común de mutación en neoplasias malignas hematológicas, que se producen en pacientes con LMC (% 5-10), MDS (5-10%), y LMA (15 - 35%).^{163,164,165}

La prevalencia de FLT3/DTI es altamente dependiente de la edad, donde es rara en lactantes con LMA, y la prevalencia aumenta a un paso de manera prudente a 5-10% en edad de 5-10 años, 20% en adultos jóvenes y > 35% en los pacientes con LMA mayores de 55 años¹⁶⁶.

También existe una considerable variabilidad en el tamaño, y la región de la participación de DTI (que van de 3 a 400 pares de bases).^{163,167,168}

Nakao y sus colegas reportaron por primera vez la presencia de duplicaciones internas en tándem (DTIs) en el dominio yuxtamembranal (JM) de FLT3 en la LMA en 1996.¹⁶⁹ señalaron que el 17% (5 de 30) de los pacientes con LMA tuvieron polimorfismos de longitud en el dominio yuxtamembranal. El análisis de secuencias de ADN demostró que cada uno de los 5 pacientes albergaba dentro del marco DTI, mutaciones en el dominio de JM. Cada paciente tenía un alelo normal FLT3 residual, y cada una de las duplicaciones mutantes se prevé produzca proteína mutante FLT3 (Fig.10). Nakao et al sugiere que estas mutaciones podrían desempeñar un papel importante en la patogénesis de la LMA.

Estas observaciones han sido posteriormente confirmadas por muchos grupos^{170,171} Con combinación de datos de todos los estudios reportados hasta la fecha, la frecuencia global de FLT3-DTI en adultos con LMA es de 385 de los 1595 (24%) de los pacientes (Tabla 3). También se han detectado FLT3-DTI con una frecuencia menor en el síndrome mielodisplásico (MDS82)^{172,173,174}, pero rara vez se detecta en LLA.^{169,172,173,175} La frecuencia de FLT3-ITD en LMA pediátrica parece ser algo más baja que en los adultos con LMA, se presenta en aproximadamente 10% a 15% de los pacientes pediátricos.^{175,176,177,178} Además, la frecuencia de FLT3-DTI parece ser mayor en pacientes ancianos con LMA.¹⁷⁹ FLT3-DTI se ha detectado en todos los subtipos FAB de la LMA, con una mayor frecuencia en el subtipo M3, y con menor frecuencia en el subtipo M2.^{169,172,177,180,181,182,183}

La Duplicación Interna en Tandem (DTI) de FLT3 también se ha reportado con una frecuencia de 15% en LMA secundaria¹⁷⁰ y puede estar asociada con la progresión de la enfermedad o recaída de LMA.^{170,184} FLT3-DTI, se ha detectado en un número limitado de pacientes con LMC,¹⁷² de crisis blástica LMC,¹⁸⁵ LMMJ¹⁷⁵ linfoma no Hodgkin, de células T en LLA, leucemia linfocítica crónica o mieloma.¹⁷²

Datos recientes presentados en forma de resumen indican que las mutaciones FLT3-DTI no están presentes en la enfermedad sistémica de los mastocitos¹⁸⁶ ni en tumores sólidos.¹⁸⁷

Internal Tandem Duplications or Activating Loop Mutations in FLT3: May Result in Activation due to Loss of Autoinhibition

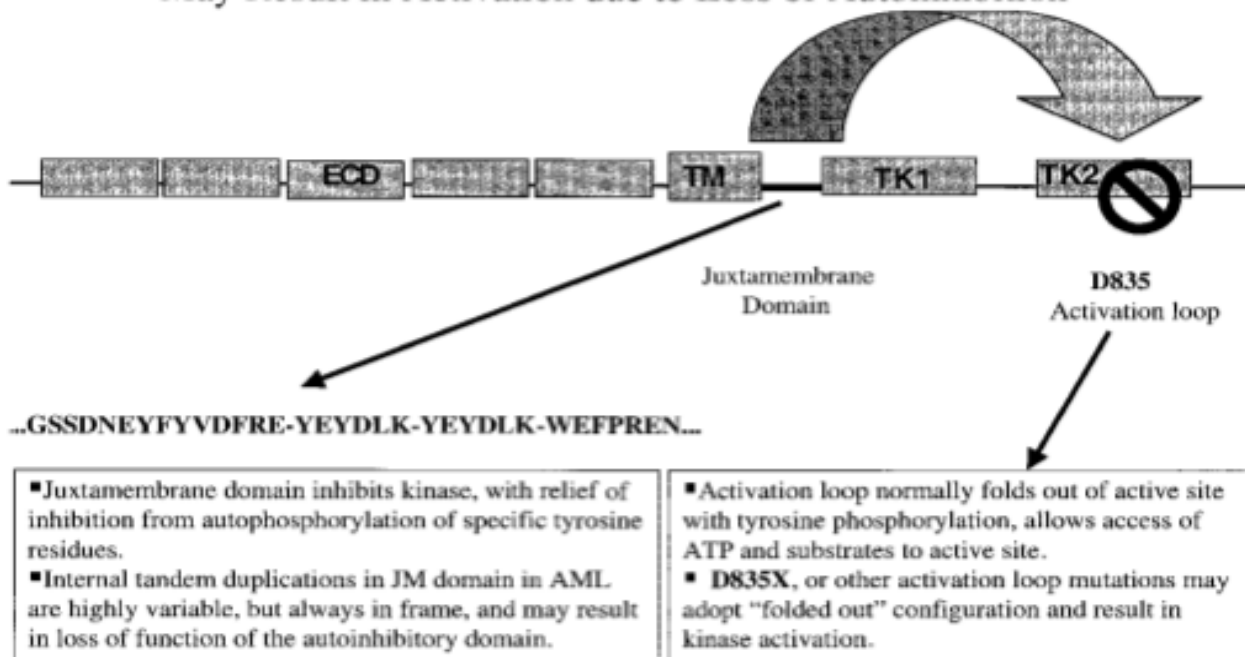


Figura 10. Dos tipos de activación de mutaciones en FLT3 se asociaron con LMA. El primer tipo consiste en DIT de aminoácidos en el dominio JM. Estos son de longitud variable de paciente a paciente, pero siempre están dentro del marco. Estas secuencias de repetición pueden servir para interrumpir la actividad autoinhibitoria del dominio JM que resulta en la activación constitutiva de la tirosina cinasa. El segundo tipo de mutaciones son mutaciones puntuales en el denominado bucle de activación del segundo dominio de la tirosina cinasa. La mutación en un residuo específico de ácido aspártico, Asp835, que está altamente conservado entre las tirosina cinasas, también resulta en la activación constitutiva de FLT3. En el contexto de otras tirosina cinasas, se cree que los bucles de activación también pueden ejercer una función autoinhibitoria por el acceso limitado de ATP y sustrato para el dominio catalítico. Las mutaciones en este sitio se cree que alteran la configuración del bucle de activación de una manera similar a la de los cambios conformacionales inducidos por el ligando, lo que resulta en un mayor acceso de ATP y sustrato. ECD indica dominio extracelular; TM, dominio transmembrana, JM, dominio yuxtamembrana, TK, el dominio tirosina cinasa; y KI, inserción de la cinasa. Figura tomada y modificada de The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia; D. Gary Gilliland and James D. Griffin; 2002 100: 1532-1542; Prepublished online May 24, 2002; doi:10.1182/blood-2002-02-0492.

FLT3-DITs no se han detectado en las células hematopoyéticas normales, incluyendo la sangre del cordón umbilical y células de médula ósea en donde hay altos niveles de expresión del gen FLT3.¹⁸⁸ Además de las mutaciones de longitud en un alelo del gen FLT3, varios estudios han demostrado mutaciones bialelicas en el gen FLT3,¹⁸⁹ así como pacientes en los que el alelo de tipo salvaje no se encuentra.^{189,190}

Los estudios *in vitro* han demostrado que FLT3/DITs promueven la dimerización del receptor independiente de ligando, lo que lleva a la fosforilación autónoma y activación constitutiva del receptor, culminando en la proliferación celular independiente de citocinas.^{164,191,192}

Adult AML Phenotype	Cases	Mutations (%)	Prognosis (P)	Reference
1 AML	81	18/81 (22) ITD	Lower CR (.03) Higher relapse (.01) Lower EFS > 60 (.003) Lower EFS < 60 (.03)	Rombouts et al 2000 ¹²¹
2 Elderly AML	140	47/140 (34) ITD	Not worse prognosis in > 60	Stirewalt et al 2001 ⁸⁶
3 AML, de novo	160	14/103 (13.2) ITD	Lower OS (.0002)	Abu-Duhier et al 2000 ⁹⁴
4 AML	854	231/854 (27)	Lower RI (.05) Lower DFS (< .001) Lower EFS (< .001) Lower OS (< .001)	Kottaridis et al 2001 ¹⁰⁰
5 AML lower than 60 De novo Normal cytogenetics	82	23/82 (28) ITD 8/23 (35) LOH of other FLT3 allele	Lower DFS (.0017) Lower OS (.0014) Lower OS c/w no loss (0.008)	Whitman et al 2001 ¹⁰¹
6 AML	188	49/188 (26) ITD	No difference in DFS or OS (Used double induction and intensive consolidation)	Frohling et al 2001 ¹²³
7 AML	713	202/713 (25.3) ITD or activation loop	Lower DFS Lower OS	Thiede et al 2001 ¹²²

Tabla 3. El pronóstico de las mutaciones de FLT3 en adultos con LMA. CR indica la remisión completa, RI, la inducción de la remisión; LOH, pérdida de heterocigocidad, y c/w, en comparación con. Tabla tomada y modificada de The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia; D. Gary Gilliland and James D. Griffin; 2002 100: 1532-1542; Prepublished online May 24, 2002; doi:10.1182/blood-2002-02-0492.

El mecanismo específico mediante el cual FLT3/DITs conduce a la auto-dimerización aun no es ampliamente conocida, sin embargo, se cree que el dominio JM actúa como un dominio regulador negativo mediante la prevención de la activación de bucle para adoptar una conformación activa, manteniendo así el receptor en un auto-estado inhibido.

Tres análisis de la estructura tridimensional del receptor FLT3 sugieren que la duplicación segmental del dominio JM puede interferir con el impedimento estérico que normalmente evita la auto-dimerización, lo que permite al receptor interactuar con su ligando. "Similares" fuerzas repulsivas se han descrito en dominios JM de otros receptores (por ejemplo KIT), y la interrupción del dominio JM en otros receptores también promueven la activación constitutiva.^{193,194} Lo más probable es que provoca la dimerización de los receptores FLT3/DIT otros cambios estructurales adicionales en el receptor para una confirmación más relajada, dejando al descubierto los sitios aceptores fosforilo dentro de los TKDs y la promoción de la autofosforilación. La longitud de los DTI varia desde 15 hasta 174 pares de bases (pb) con una mediana de 52 pb.¹⁹⁵

9.1 Ubicación estructural de Y597

La localización genómica de la duplicación puede variar de paciente en paciente y en general abarca toda la longitud del exón 14. La duplicación de al menos 1 de 7 residuos de aminoácidos del codón 591 al 597 ocurrió en todos los pacientes, y el codón 597 se duplicó en 86% de los pacientes. En 5 casos, la duplicación abarcó el intrón 14 e implicó el exón 15 y los codones 613 al 631. Se han informado resultados similares en una cohorte de pacientes adultos y han demostrado que la R595 es crítica en la función de DTI.¹⁹⁶

La estructura cristalina de FLT3 autoinhibido ha revelado regiones distintas dentro del dominio JM, el motivo de unión JM (JM-B, Y572-M578), el motivo interruptor JM (JM-S, V579-V592), y el "zipper" JM (JM-Z, D593-W603, PDB clave 1RJB).¹⁹⁷

Los residuos de aminoácidos que se observaron en las DTI en todos los pacientes en este estudio (Y591-Y597) caen dentro de las regiones JM-S y JM-Z. La tirosina-597 está expuesta en la superficie de la proteína y no parece ser crítica para el mantenimiento de la conformación autoinhibida de FLT3. El residuo frecuentemente observado dentro de un DTI es Y597, sin embargo, otros residuos de la región del "zipper" del dominio JM (JM-Z) también se duplican con frecuencia.

Estas duplicaciones están fuertemente transformando y dan como resultado la activación constitutiva de FLT3. Los mecanismos estructurales de la activación de FLT3 por estas duplicaciones aún no han sido esclarecidos, sin embargo, la estructura cristalina de FLT3 autoinhibido arrojan algo de luz sobre los posibles mecanismos de activación.

En la estructura cristalina la región JM-Z parece jugar un papel importante en la dirección de una orientación óptima de los residuos de autofosforilación "switch" Y589 y Y591 y el mantenimiento de la conformación autoinhibida. Se espera que las inserciones JM-Z DTI interrumpan la conformación autoinhibida del interruptor JM en la región JM-S, por lo que se debe prevenir la inhibición por la región JM-B.^{196,197,198}

Se espera que la orientación óptima de Y589 y Y591 sea interrumpida para permitir su fosforilación constitutiva. La razón de la prevalencia de mutaciones DTI en la región JM-Z del dominio JM, en comparación con las regiones de JM-B y JM-S , todavía no se ha dilucidado. (Fig. 11)

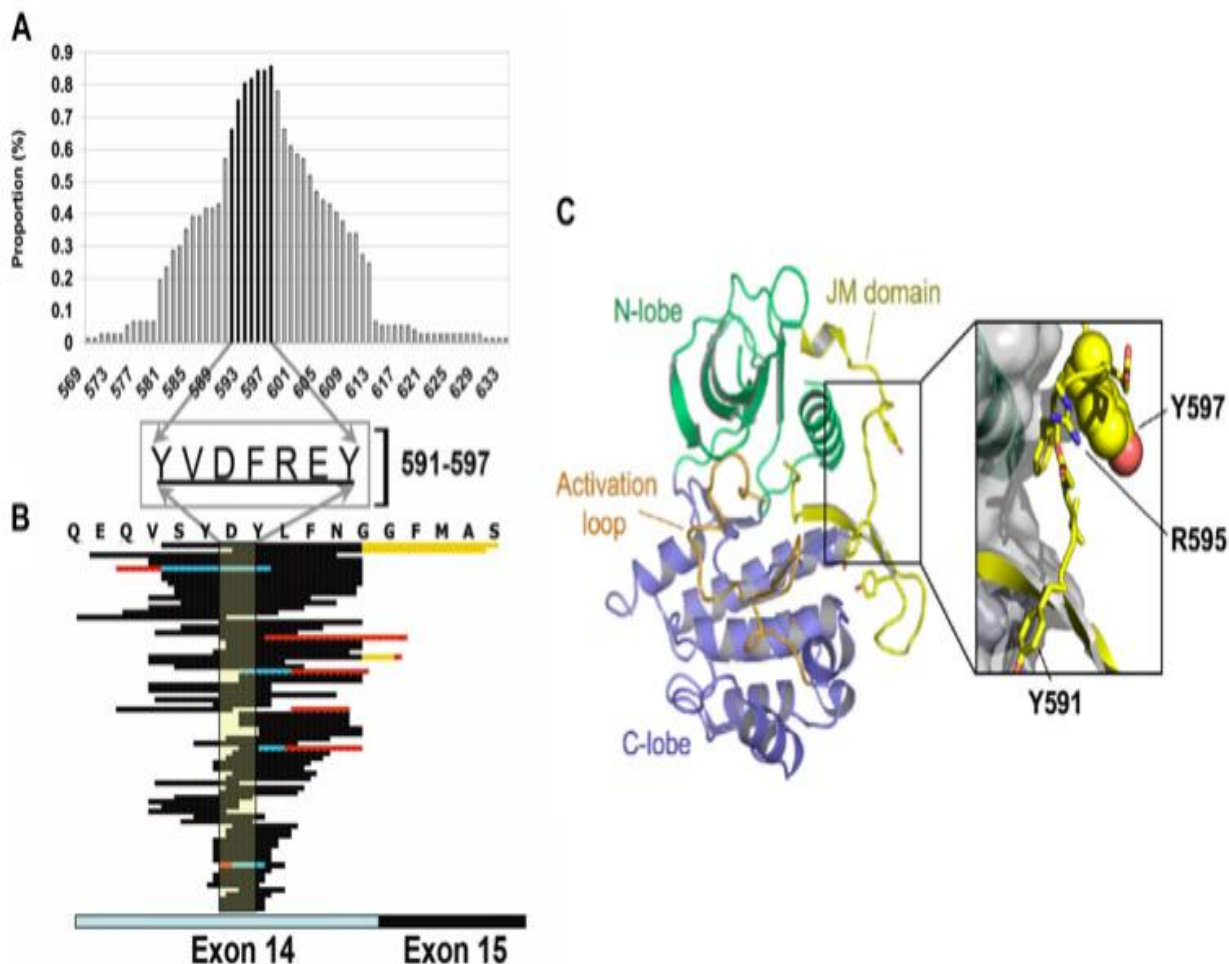


Figura 11. Región de la duplicación en FLT3/DTI. (A) Proporción de pacientes con afectación de los residuos de aa específicos en la región duplicada. Los codones 591 a 597 se muestran en barras más oscuras, y los residuos de aa específicos en esta región se muestran en el centro de inserción. (B) La región de la duplicación en los 77 pacientes están ordenadas según la longitud de ITD (de la más larga a la más corta) de arriba a abajo. El área de la duplicación del pico principal DTI se muestra en la zona resaltada mas oscura. En pacientes con DTI adicionales, la región duplicada se muestra en rojo con el área de superposición en azul. Los codones 591 a 597 se muestran en la caja sombreada. (C) la estructura de FLT3 muestra la localización del dominio JM y Y597. La representación de la estructura cristalina de FLT3 fue previamente resuelta por Griffith et al.¹⁴ El dominio de la cinasa N-lóbulo esta de color verde y el C-lóbulo, azul. El bucle de activación es de color naranja y el dominio JM, amarillo. Las tirosinas 597, 591, y 589 se muestran en formato de palo. La vista en partes muestra la superficie molecular del dominio cinasa y el dominio JM con residuos de la cadena lateral Y591 a Y597. La tirosina 597 se representa con las esferas de compilación. Esta figura se realizó utilizando el programa Pymol (www.pymol.org). Figura tomada y modificada de Structural and numerical variation of FLT3/ITD in pediatric AML; Soheil Meshinchi, Derek L. Stirewalt, Todd A. Alonzo, Titus J. Boggon, Robert B. Gerbing, Jennifer L. Rocnik, Beverly J. Lange, D. Gary Gilliland and Jerald P. Radich; 2008 111: 4930-4933; Prepublished online February 27, 2008; doi:10.1182/blood-2008-01-117770.

Lo que se ha hecho es observar si la longitud del DTI puede afectar el resultado clínico. Se evaluaron todos los umbrales de longitud de DTI para diferenciar el resultado clínico entre los que tienen longitud más corta o más larga que la longitud particular de DTI. (Fig.12)

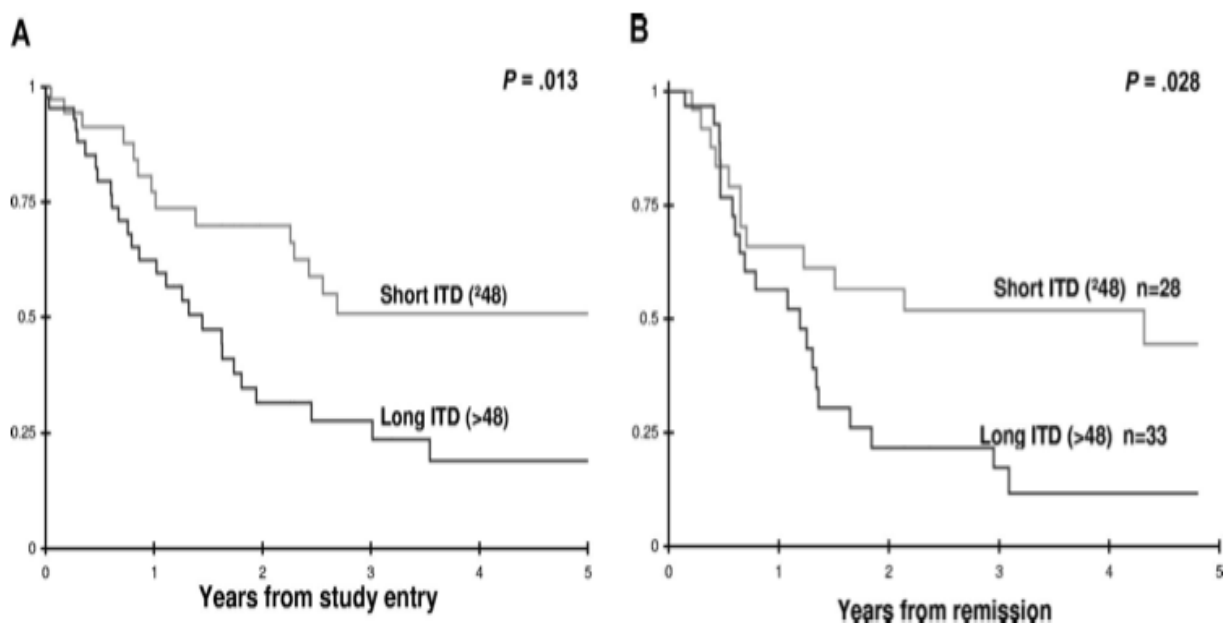


Figura 12. El resultado clínico de los pacientes con FLT3/DIT-positivo con longitud alta versus baja de DTI basado en el umbral de longitud de 48 pb de DTI. (A) Supervivencia global desde el ingreso al estudio. (B) Supervivencia libre de recaída a la remisión completa. Figura tomada y modificada de Structural and numerical variation of FLT3/ITD in pediatric AML; Soheil Meshinchi, Derek L. Stirewalt, Todd A. Alonzo, Titus J. Boggon, Robert B. Gerbing, Jennifer L. Rocnik, Beverly J. Lange, D. Gary Gilliland and Jerald P. Radich; 2008 111: 4930-4933; Prepublished online February 27, 2008; doi:10.1182/blood-2008-01-117770.

9.2 Implicación pronóstica de la longitud FLT3/ITD

En un estudio, mediante análisis de regresión cox, se comparo la supervivencia de los pacientes con la longitud de DTI y se observó que una longitud de 48 pb tenía un riesgo de 2.3 comparada con las otras longitudes.¹⁹⁹

La SO actual a los 4 años de entrar en el estudio para las personas con menor DTI ($48 \leq$ pb) fue del 51% ($\pm 19\%$) en comparación con el 17% ($\pm 15\%$) para aquellos con longitud-DTI de más de 48 pb ($P = 0.011$). La SO actual a los 4 años desde la RC para aquellos con una DTI más corta fue de 67% ($\pm 21\%$) versus 21% ($\pm 19\%$) que para aquellos con DTI largos ($P = 0.006$).

La supervivencia libre de recaída a los 4 años desde la RC para aquellos con DTI cortos y largos fue de 51% (\pm 23%) y 19% (\pm 16%), respectivamente (P =0.035).²⁰⁰

La supervivencia global (SO) y la supervivencia libre de recaída (SFR) correspondiente para los pacientes sin FLT3/DTI era de 54% y 57%, respectivamente, similares a aquellos con los DTI más cortos. Así, en pacientes positivos FLT3/DTI, aquellos con DTI cortos tienen una menor tasa de recaídas y el desenlace más favorable que aquellos con DTI más largos. Aunque se ha demostrado la importancia que tiene la longitud de DTI en adultos y en la LMA pediátrica, otros estudios no han demostrado tales diferencias en los resultados sobre la base de la longitud DTI,²⁰⁰ lo que sugiere que los factores adicionales (por ejemplo, la naturaleza de restos de duplicados) pueden modificar el significado de la longitud del DTI.²⁰¹

Se cree que FLT3/DTI promueve la proliferación a través de la activación de múltiples vías de señalización incluyendo RAS / MAPK, STAT y las vías de la cinasa AKT/PI3. Se ha demostrado que la proliferación celular independiente de citocinas de células transducidas FLT3/DTI fue mediada por RAS y las vías de STAT5²⁰² (Fig.13).

La demostración de la activación de STAT5 en FLT3/DTI resalta que algunos de los efectos de FLT3/DTIs son únicos para el receptor mutado, en contraste con FLT3/DTI inducida por la activación de ligando FLT3-WT no conduce a la activación de STAT5 y ningún ADN vinculante STAT5.²⁰³ Estudios posteriores han determinado que los codones T589 y T591 en el JM del receptor mutante de FLT3 puede dar cuenta de alguna activación de STAT5 en células que albergan FLT3/DTIs.²⁰⁴

Otros estudios han demostrado que, además de las vías RAS y STAT, FLT3/DTIs constitutivamente fosforila y activa AKT, y que el crecimiento independiente del ligando requiere esta activación aberrante de AKT por FLT3/DTIs, de tal manera que el crecimiento independiente del ligando se invierte si AKT está bloqueado o inactivado.²⁰⁵

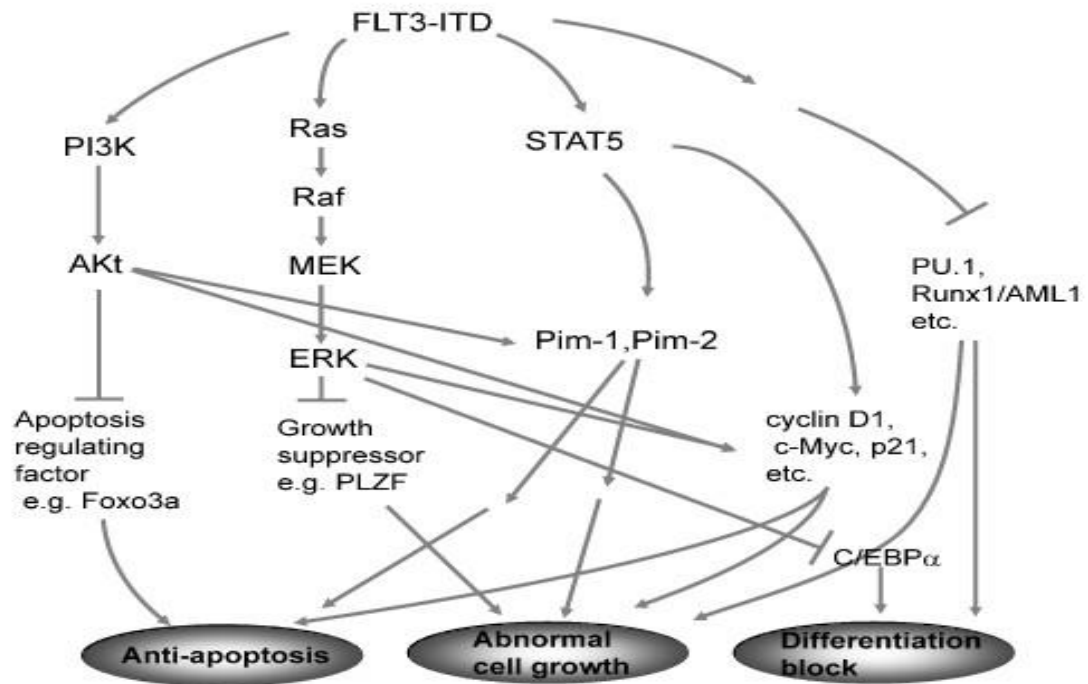


Figura 13. Mecanismos de leucemogénesis inducidos por FLT3. Esquema que representa las vías descendentes de FLT3-ITD. Figura tomada y modificada de Takahashi *Journal of Hematology & Oncology* 2011 4:13 doi:10.1186/1756-8722-4-13.

La leucemia mieloide aguda con mutación de FLT3 duplicación interna en tándem (FLT3/ITD) es una neoplasia hematológica agresiva con un mal pronóstico. Se puede tratar con éxito en remisión con quimioterapia intensiva, pero recae de forma rutinaria. En la recaída, los blastos tienden a tener mayores proporciones alélicas mutadas e, *in vitro*, son más adictos a la señalización aberrante desde la oncoproteína FLT3/DIT.²⁰⁶ Se mantienen muy sensibles a FLT3 ligando, los niveles de que se elevan varias veces durante el curso de la quimioterapia.

Estas mutaciones, que desequilibran la función de auto inhibición del receptor del dominio yuxtamembranal, dan como resultado la autofosforilación constitutiva de FLT3 dentro de los blastos que lo albergan.^{207,208} Quince años después de este descubrimiento inicial, FLT3/DIT LMA ahora se erige como una clara entidad clínica, un subtipo, a menudo letal de la LMA que ha sido un considerable desafío para aquellos que dan un tratamiento.²⁰⁹ Algunos hallazgos clínicos recientes y de laboratorio acerca de esta enfermedad pueden dar una idea de por qué estos pacientes recaen tan rápidamente, y la forma en que podrían mejorar sus resultados.

Las mutaciones de FLT3/DTI están presentes en aproximadamente un cuarto de los casos adultos de LMA.²¹⁰ En una minoría de los casos representan supuestamente una mutación tardía en LMA tardía, evolucionando a partir de un antecedente de síndrome mielodisplásico. Sin embargo, la presentación más característica es la enfermedad de novo, presentando un recuento alto de leucocitos y citogenética normal.²¹¹

Numerosos análisis retrospectivos de los resultados de los ensayos clínicos han establecido que los pacientes con LMA FLT3/DTI logran una remisión completa o cerca de los pacientes con LMA que carecen de estas mutaciones. Sin embargo, igualmente establecido ²¹² es el hecho de que los pacientes con FLT3/DTI son mucho más propensos a la recaída y lo hacen más rápidamente que sus homólogos FLT3 nativos.²¹³

Se ha reportado que la supervivencia mediana de la LMA con mutación de FLT3 después de la primera recaída es mayor a cinco meses.^{214,215} Coincidiendo con el reconocimiento de FLT3/DTI en LMA como una enfermedad, esta entidad fue el nacimiento de una nueva terapia importante contra el cáncer: inhibidores de la tirosina cinasa (TKIs). La actividad clínica notable del mesilato de imatinib para la leucemia mieloide crónica con crisis blástica y leucemia linfocítica aguda con cromosoma Filadelfia positivo (2 enfermedades con similitudes a FLT3/DTI LMA) estimuló el desarrollo de FLT3- TKIs.^{216,217}

Hay diferencias importantes entre el FLT3/DTI y las oncoproteínas BCR-ABL sin embargo, podría parecer que causan enfermedades similares. A diferencia de BCR-ABL, FLT3 es una proteína transmembranal localizada principalmente en la membrana plasmática, donde se une a su ligando afín, FL de citocinas. ¿Por qué el ligando no tiene ningún efecto sobre el receptor tirosina cinasa que se supone debe estar constitutivamente activado? La evidencia reciente sugiere que el receptor DTI mutado es, de hecho, muy influenciado por FL. FL está co expresado con FLT3 en las células de la leucemia y es regulada en respuesta a la inhibición de FLT3. Cuando el receptor FLT3/DTI se expresa en las células que carecen por completo de FL, únicamente muestra la autofosforilación débil.²¹⁸

Este hallazgo arroja la oncoproteína FLT3/DTI bajo una luz totalmente diferente: no como un receptor de forma autónoma activa, sino más bien como uno que es simplemente hipersensible a su ligando. Para complicar más las cosas, FL interfiere notablemente con la capacidad de TKIs para inhibir la señalización de FLT3.²¹⁹ En efecto, el aumento de FL después de la quimioterapia pudo haber sido responsable del nivel deficiente de la inhibición de FLT3 *in vivo* observado en un ensayo reciente de lestaurtinib después de la quimioterapia.²¹⁵

La influencia de FL en la señalización de FLT3/DTI probablemente es un problema para los esfuerzos encaminados a la incorporación de la inhibición de FLT3 en los regímenes de quimioterapia convencionales contra LMA. La radiación o la quimioterapia induce aplasia y ha sido bien establecido para inducir aumentos significativos en los niveles de FL,^{120,221} que a su vez bloquean los efectos de los inhibidores de FLT3.

La inhibición del gen FLT3 no es suficiente para inducir la apoptosis en una fracción significativa de FLT3 / DTI en muestras de LMA primarias recogidas en el momento del diagnóstico inicial.²²² Sin embargo, las muestras recogidas en la recaída y pruebas *in vitro* son mucho más propensas a sufrir apoptosis en respuesta a la inhibición de FLT3 en comparación con las muestras de diagnóstico.²²²

El mejor predictor de una muestra de LMA para tener una respuesta citotóxica de la inhibición de FLT3 es una alta carga de FLT3/DTI alélica mutante. Quizás no por casualidad, la proporción alélica mutante del FLT3/DTI tiende a ser mayor en la recaída en comparación con el diagnóstico (aunque en una minoría de los casos, la mutación puede ser perdida por completo).²²³ LA recaída y una mayor proporción de alelos mutantes, así como la adicción a la señalización FLT3/DTI aparecen siempre en LMA con mutación DTI.²²⁴

Para resumir, entonces, FLT3/DTI LMA es una enfermedad que parece evolucionar entre el diagnóstico y la recaída, con las células de la leucemia cada vez más apegadas a la señalización de FLT3 después de la quimioterapia.

El tratamiento de un paciente con quimioterapia conduce a altos niveles de FL en el plasma durante todo el período de recuperación y durante la consolidación FL es una citocina que actúa directamente sobre el receptor mutante de FLT3/DTI, maximizando su actividad y promoción de la supervivencia de los blastos. A pesar de que estos hallazgos tienen prácticas implicaciones, estas propiedades se podrían utilizar para predecir la respuesta clínica y el diseño de regímenes de tratamiento, que descubren un problema potencialmente mayor.²²⁴

Los pacientes con LMA FLT3/DTI a menudo tienen una recaída durante la consolidación. Es concebible, dadas las conclusiones antes mencionadas, que se este haciendo más daño que bien mediante la administración de altas dosis de citarabina en ciclos repetidos, o cualquiera que sea el régimen de consolidación que se está utilizando. De hecho, en un ensayo aleatorizado reciente de quimioterapia inducida con uso más intensivo de antraciclinas, los pacientes con LMA FLT3/DTI no parecen beneficiarse de la intensificación de la terapia, a diferencia de los pacientes con FLT3 nativo.²²⁵

Como alternativa, la población de blastos en el diagnóstico puede no ser uniforme, con algunas células que carecen de la completa mutación FLT3/DTI y otros portadores de mutantes homocigotos o heterocigotos. Los pacientes que se presentan con baja proporción de alelos mutantes en el diagnóstico presentan un interesante argumento al concepto de que FL promueve o influye en las recaídas.²²⁶

Los relativamente pocos pacientes con LMA FLT3/DTI que tienen bajas proporciones alélicas en la presentación a menudo (pero no siempre) pierden por completo la mutación en la recaída.²²⁷ FL claramente no se selecciona para la expansión de estos subclones aparentes.²²⁸

Sin embargo, los pacientes con carga alélica baja parecen tener un pronóstico que es similar al de los pacientes con FLT3 de tipo salvaje en LMA.²¹³ Es posible que en estos casos la mutación DTI se produjo relativamente tarde en la leucemogénesis, quizás en una célula madre de la leucemia con un menor potencial de renovación a largo plazo.

En los pacientes con nuevo diagnóstico de LMA FLT3/DTI de inducción sometida y consolidación, existe variabilidad significativa en el grado en que FL se eleva desde el inicio. Se puede predecir que será más probable que ocurran las recaídas, y ocurrirá primero, en pacientes con niveles altos FL en comparación con niveles bajos de FL. La hipótesis podría ser refutada no encontrando efectos de FL, en el riesgo de recaída o encontrando que altos niveles predigan realmente mejores resultados.²¹⁹

De hecho, los altos niveles de FL después de la quimioterapia podría ser un sustituto de la intensidad de la aplasia, que desde una perspectiva tradicional se cree que es beneficioso. Se está examinando esta cuestión de forma prospectiva mediante mediciones seriadas de niveles FL durante la inducción y la consolidación en los pacientes con LMA FLT3/DTI.²²⁹

Muchos abogan por el uso del trasplante alogénico como la consolidación más efectiva de FLT3/DTI LMA.²³⁰ Este es un tema que sigue siendo muy controvertido. Ciertamente, hay numerosas variables que podrían haber influido en los resultados de ensayos con trasplantes alogénicos (cualquiera de ellos podría enturbiar la interpretación de los resultados), incluyendo el tiempo para el trasplante, los regímenes de preparación, la mortalidad relacionada con el trasplante, y del injerto contra la profilaxis.²³¹

Si los niveles de FL contribuyen a la recaída, y si el "injerto contra leucemia" es real, entonces el mejor enfoque para el paciente sería proceder lo más rápidamente posible a un trasplante alogénico una vez alcanzada la remisión.

El trasplante alogénico, por supuesto, también implica la quimioterapia, por lo general más intensiva que un solo curso de consolidación.²³²

En sustitución de 4 ciclos de dosis altas de citarabina, que probablemente de como resultado una elevación global no tan prolongada de FL (aunque esto se debe confirmar prospectivamente), y también introduce un tipo diferente de efecto terapéutico, que la inmunoterapia.

Curiosamente, en un reciente informe del Grupo de Estudio de la LMA en Ulm, Alemania, donde realizan una estrategia similar a la usada desde el año 2006, se observó que los pacientes con FLT3/DTI que recibieron un trasplante lo más pronto posible después de alcanzar la remisión tuvieron mejores resultados.²³³

Normalmente, en los análisis históricos de la LMA en los estudios de trasplante, más tiempo para el trasplante se asocia con mejores resultados, probablemente porque los pacientes que están lo suficientemente bien como para el trasplante después de varios meses representan un grupo de riesgo en general favorable. Sin embargo, más tiempo para el trasplante, lo que haría necesaria cursos adicionales de consolidación, se asoció con una peor supervivencia global en su análisis. Esto es exactamente lo que se predijo si estos cursos recurrentes de la consolidación eran en realidad la promoción de la recaída.²³³

Sobre la base de estos resultados, se puede proponer que el enfoque terapéutico óptimo para un paciente con LMA FLT3/DTI sería un solo curso de la terapia de inducción seguida con la mayor rapidez como sea posible del trasplante alogénico, incluyendo el uso de donantes alternativos (no emparentado compatible, haploidéntico, o de la médula derivados de la sangre) en caso necesario. Los nuevos agentes terapéuticos pueden ser introducidos en este paradigma.²³³

Los inhibidores de FLT3 se pueden utilizar al inicio del tratamiento (antes de la subida de los niveles de FL, antes de que su eficacia sea limitada) para mejorar la tasa de remisión y, si los niveles de FL vuelven a su nivel, mantener al paciente en remisión hasta el trasplante.

9.3 Significado pronóstico de FLT3/DTI

Se ha descrito que FLT3/DTIs en la LMA, se encuentra en aproximadamente el 25% de los pacientes con LMA que albergan estas mutaciones.²²⁸ En su estudio, los FLT3/DTIs se asociaron con citogenética normal. Aunque no hubo una diferencia significativa en la respuesta completa (CR) entre las tasas de pacientes con y sin FLT3/DTI, aquellos pacientes con FLT3/DTI tenía una tasa de recaída significativamente mayor (RR) y peor supervivencia global (OS).²²⁸

Específicamente, en pacientes adultos más jóvenes (<60 años), FLT3/DITs fueron el mayor índice predictor de resultados.²²⁸ estudios posteriores han confirmado que la presencia de FLT3/DIT es un factor pronóstico independiente de recaída y un peor pronóstico en la LMA.^{229,230,231}

Han examinado la prevalencia y el significado pronóstico de FLT3/DIT en una cohorte de más de 850 pacientes adultos²³¹. Estos investigadores encontraron una prevalencia de FLT3/DIT del 27%. Su estudio confirmó que FLT3/DIT se asocio con leucocitosis y citogenética normal. En su estudio, los pacientes con LMA con FLT3/DIT tuvieron una tasa de remisión más baja, una mayor tasa de recaída y peor supervivencia. Un análisis multivariante controlando otros factores pronósticos encontró que FLT3/DIT fue el factor pronóstico más significativo con respecto a la RR y a la supervivencia libre de enfermedad (SFD).²³¹

Otros estudios han confirmado la importancia pronóstica de FLT3/DIT en grandes ensayos con adultos y pediátricos de LMA.^{229,232,233}

En estos estudios la supervivencia para los pacientes con FLT3/DIT fue de 20% a 30% frente al 50% para los que no tienen FLT3/DIT. También hicieron una observación que la variación alélica (mutante al de tipo salvaje) observada en pacientes con FLT3/DIT parecía influir en el resultado.^{232,233}

La evaluación de diferentes umbrales de relación alélica (DIT-AR) de FLT3/DIT estableció que los pacientes con FLT3/DIT se encontraban en alto riesgo de recaída de los que se espera tener un resultado más favorable, lo que demuestra que no es más que la presencia de FLT3/DIT, pero la variación alélica es la que determina el resultado clínico.²³²

Un trabajo similar en otros estudios han demostrado diferencias en el resultado clínico para las personas con diferentes relaciones alélicas.^{233,234}

10. MECANISMOS GENERALES DE ACTIVACIÓN DE RTK: LA RELEVANCIA DE MUTACIONES FLT3 EN LA LEUCEMIA HUMANA

Los polimorfismos de FLT3, longitud de JM y sustituciones de activación de bucle en FLT3 son frecuentes en la LMA, superando la incidencia de las translocaciones cromosómicas conocidas o mutaciones puntuales. ¿Cuáles son las consecuencias de estas mutaciones sobre la función del gen FLT3 y la fisiopatología de la LMA? Aunque el mecanismo de la activación del gen FLT3 no ha sido ampliamente estudiado, existen algunas ideas sobre el papel de estas mutaciones que se extrajeron del análisis de otros que no son receptores de TK y de receptores de TK incluyendo el Eph Ef,^{236,237} ERBB2,^{237,238} receptor del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1R),²³⁹ receptor del factor 1 de crecimiento de fibroblastos (FGFR1),^{240,241} y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF).²⁴²

Los RTKs tienen dominios de auto inhibición que mantienen a la cinasa en una conformación inactiva. En la mayoría de las tirosina cinasas, una llamada activación de bucle en los pliegues del dominio de la cinasa en el sitio activo, bloquea el acceso de ATP y sustratos.²⁴⁰

La Fosforilación o mutación de sustitución de residuos críticos en la activación de bucle permite que el bucle se doble hacia fuera del sitio activo, permitiendo el acceso. Por ejemplo, la autofosforilación intermolecular de 3 residuos especificados en el bucle de activación de IGF-1R estabiliza el bucle en una conformación que facilita la catálisis.²³⁹

Además, las mutaciones de sustitución en un residuo crítico conservado de ácido aspártico en la activación del receptor de insulina resulta de ayuda a la auto inhibición y aumenta la capacidad de la cinasa no fosforilada de enlazar el ATP.²⁴³ La estructura FGFR1 indica que los residuos en el bucle de activación parecen interferir con la unión del sustrato peptídico pero no con el ATP, lo que sugiere un segundo mecanismo de auto inhibición y quizás más general para RTKs.²⁴⁰

Otro dominio de auto inhibición es el dominio JM de un subconjunto de RTKs, tal como el receptor Eph. Este grupo de RTKs ha conservado dominios JM, e incluye a miembros de FLT3 y otros miembros de la familia RTK de tipo III.²⁴⁴

Los datos bioquímicos han indicado que, además de la actividad auto inhibitoria de la activación de bucle de Eph, hubo un segundo dominio auto inhibitorio en el dominio de JM de Eph que estaba regulado por la fosforilación de tirosina.²⁴⁴

El análisis estructural de una forma no fosforilada de auto inhibición de EphB2, compuesto por la JM y dominios cinasa ha proporcionado información sobre los mecanismos de auto inhibición.²³⁵

El dominio JM adopta una conformación helicoidal que distorsiona el lóbulo pequeño de los dominios quinasa y bloquea el segmento de activación para lograr una conformación activa. La fosforilación de los residuos de tirosina conservados JM ayuda esta represión alterando la asociación del segmento de JM con el dominio quinasa y libera sitios de fosfotirosina para unir dominios SH2 de las proteínas diana.²³⁵

La represión de dominios de auto inhibición se consigue en parte por la unión de RTKs a sus ligandos afines, tales como FL. Muchos ligandos RTK, incluyendo FL, existen como homodímeros, y se cree que activan a sus respectivos destinatarios RTKs través de la inducción de la dimerización u oligomerización.²⁴²

Además, la activación de las mutaciones puntuales se han identificado en los dominios extracelulares y dominios TM de RTKs que pueden servir para formar dímeros o inducir cambios conformacionales.²³⁷

El ligando también puede servir para inducir cambios conformacionales que resultan de ayuda de auto inhibición, en el que la dimerización es necesaria pero no suficiente para activar los receptores RTK.²³⁸

Hasta la fecha, no hay estudios publicados que expliquen cómo las mutaciones en los dominios JM conducen a la activación constitutiva del receptor.

Sin embargo, basándose en el modelo de las estructuras cristalinas de rayos X de EphR2, es muy posible que las mutaciones en el dominio JM en un RTK como FLT3 puede causar que el dominio de JM caiga lejos de el dominio cinasa, lo que facilita la activación de la quinasa, transfosforilación, y el inicio de la señalización.²⁴⁵

Este modelo es atractivo para explicar cómo un conjunto tan diverso de mutaciones en los dominios de JM de múltiples RTKs conducen a la activación de la cinasa. Específicamente, las mutaciones que se prevé puedan interferir con la función normal inhibidora del dominio JM hacia la cinasa, llevando a la activación de la cinasa independiente del ligado. Tomados estos datos en conjunto, indican que varias clases de mutaciones podrían dar lugar a la activación constitutiva de la cinasa FLT3.²⁴⁵

En particular, las mutaciones en el dominio JM de FLT3 la activación de bucle podrían predecir en resultado la pérdida de la función auto inhibitoria y la posterior activación constitutiva de la cinasa FLT3 y sus señales de proliferación corriente abajo.²⁸⁰⁻²⁸⁴

11. IMPORTANCIA DEL LIGANDO FLT3 EN LAS LEUCEMIAS

La hematopoyesis es altamente regulada a través de citoquinas inducida por la estimulación de múltiples vías de transducción de señales con el fin de mediar una diferenciación apropiada y la proliferación de poblaciones progenitoras específicas. La estimulación inducida del ligando de FLT3, conduce a la activación de múltiples vías efectoras aguas abajo resultantes en la diferenciación y proliferación de poblaciones específicas de células progenitoras.²⁴⁶

11.1 Ligando FLT3

El ligando para FLT3 se expresa en las células estromales de médula y otras células y sinergiza con otros factores de crecimiento para estimular la proliferación de las células madre, células progenitoras, las células dendríticas y las células NK. Así la activación de mutaciones en los receptores de tirosina cinasa para los factores de crecimiento pueden conferir una ventaja de crecimiento a las células leucémicas.²⁴⁷

El ligando para FLT3 (FLT3 ligando o FL) se clonó en 1993, FL es una proteína de transmembrana (TM) del tipo I que puede ser liberado como una proteína homodimérica soluble,^{248,249} y se expresa en las células del microambiente hematopoyético de la médula ósea, incluyendo fibroblastos de médula ósea,²⁵⁰ así como en las líneas celulares hematopoyéticas, líneas mieloides, linajes de células T y B.²⁵¹

Tanto la forma unida a la membrana como la soluble puede activar la actividad tirosina quinasa del receptor y estimular el crecimiento de las células progenitoras de la médula ósea y sangre. Sin embargo, FL no induce de manera eficiente la proliferación de los progenitores normales mieloides y linfoides por sí solo, pero sinergiza con otros factores de crecimiento hematopoyéticos e interleucinas.^{252,253}

FL es un factor de crecimiento para las células inmaduras mieloides y células madre y puede expandir células CD34⁺ *in vitro* e *in vivo*.^{254,255} La capacidad de FL, en combinación con otros factores de crecimiento, para estimular la expansión de progenitores hematopoyéticos de CD34⁺ puede ser útil en la recuperación de la médula después de la quimioterapia citotóxica y en expansiones de progenitores hematopoyéticos para diversas aplicaciones clínicas.²⁵⁶

El ligando FLT3 también juega un papel importante en la respuesta inmune. La interrupción del blanco del gen FL en ratones se asocia con un deterioro significativo del sistema inmune, así como una reducción en las células progenitoras mieloides. El número de progenitores de células B, células dendríticas (DCs), y las células natural killer (NK) se reduce significativamente *in vivo*.²⁵⁷

La base de la aparente disparidad en el fenotipo hematopoyético entre el FL y FLT3knock-outs (bloqueo de genes) no se conoce, pero puede ser debido al método experimental, las diferencias de tensión, o un segundo ligando o receptores en este sistema. DCs son las células más eficientes presentadoras de antígeno para células T y se han investigado como agentes celulares inmunoterapéuticos en el cáncer.²⁵⁷

La inyección diaria de FL en ratones resulta en un aumento dramático en las células que expresan los marcadores característicos de DC como el de clase II del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC), CD11c y CD86.²⁵⁸

FL sinergiza con el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) o interleucina 4 (IL-4) en la inducción de diferenciación DC *in vitro* e *in vivo*. También se ha demostrado que FL también promueve la expansión de un CD34⁺ progenitor de células NK que responde a la IL-15 mediante la inducción de la expresión IL-2/15R beta, lo que indica FL en el desarrollo temprano de las células NK.²⁵⁹

La estimulación del ligando FLT3 da la proliferación de células dendríticas y NK, por lo tanto se ha sugerido que FL podría ser potencialmente útil como un agente antitumoral de amplio espectro.^{260,261} En apoyo a esta hipótesis, se ha reportado que FL induce la regresión del tumor y la respuesta antitumoral *in vivo* en un modelo de fibrosarcoma inducida en ratones.²⁶²

FL también inhibe el crecimiento tumoral en el melanoma murino (B16 y CL8-1) y modelos linfoma (EL-4). Además, La actividad atileucémica de FL fue demostrada en un modelo murino en el que se indujo leucemia con células FDCP1 transfectadas con BCR/ABL.²⁶³

En la leucemia aguda, sin embargo, la administración de FL puede ser desventajosa, abundantes datos indican que la estimulación de FL-FLT3 aumenta la proliferación y la supervivencia de los blastos en la leucemia.²⁶⁴

FL estimula la proliferación de FLT3 expresando células primarias de LMA y líneas celulares leucémicas mieloides y monocitoides, y sinérgiza con otros factores de crecimiento para estimular la proliferación de LMA primaria y células LLA.^{265,266,267}

La mayoría de líneas celulares de leucemia mieloides muestran la expresión ya sea de FL o FLT3, o en algunos casos ambos. Por otra parte, FL tiene importantes efectos promotores anti-apoptóticos y de supervivencia en ambas células primarias de LMA y en líneas de células mieloides.²⁶⁸

FL puede ejercer su señal de proliferación y antiapoptótica en las células de la leucemia, mediante la regulación de BCL2 y BAX.²⁶⁹

En conjunto, estos datos sugieren que la inhibición o el aumento del sistema de ligando FL-receptor FLT3 en la terapia de la leucemia tendrá que llevarse a cabo con cautela y circunspección.

La administración de FL puede mejorar la inmunidad antitumoral, pero también puede aumentar la proliferación y la supervivencia de los blastos en la leucemia. Además, la expresión crónica de FL en un modelo de transducción retroviral murino indujo leucocitosis, anemia severa, esplenomegalia marcada, y la fibrosis, además de la expansión de los DCs y los linfocitos T activados.²⁷⁰

La inhibición de FLT3 también puede ser un método terapéutico válido para la LMA, pero la inhibición del gen FLT3 también puede afectar a la inmunidad endógena anti leucémica.²⁷¹

El ligando activado FLT3 se somete a la autofosforilación y, a través de una serie de cascadas de cinasa, transduce las señales promoviendo el crecimiento celular y la inhibición de la apoptosis a través de proteínas como la proteína activadora de Ras-GTPasa, la fosfolipasa C beta, STAT5, y ERK1 / 2.^{271,272}

FL, se expresa en prácticamente todos los tipos de células hasta ahora examinados, incluyendo células leucemicas.^{273,274} FL se expresa en la mayoría de los tejidos, incluyendo órganos hematopoyéticos (bazo, el timo, la sangre periférica y la médula ósea) y la próstata, ovario, riñón, pulmón, colon, intestino delgado, testículos, corazón y la placenta, con el mayor nivel de expresión en las células mononucleares en sangre periférica.²⁷⁵

El cerebro es uno de los pocos tejidos sin expresión demostrable de FL. En contraste, el receptor, FLT3, tiene un margen bastante estrecho de expresión de células, siendo localizada principalmente en tejidos hematopoyéticos y neuronales, lo que presumiblemente limita sus funciones a estos tipos de células.²⁷⁶

FL actúa en sinergia con otras citocinas para promover la expansión de precursores hematopoyéticos; FLT3 o FL en ratones, conduce a una reducción en precursores hematopoyéticos aunque no embrionariamente letal.^{277,278}

11.2 Los niveles plasmáticos de ligando FLT3

Se ha demostrado que FL influye en los efectos in vitro de lestaurtinib. Además, se ha demostrado previamente que los niveles plasmáticos de FL aumentan durante los períodos de aplasia de la médula ósea inducida por quimioterapia o radiación.²⁸⁵

Dado que en ambos ensayos se administró lestaurtinib después de la quimioterapia intensiva, decidieron examinar los niveles de FL en las muestras de plasma a su disposición. Para obtener una estimación de los niveles de FL en pacientes recién diagnosticados con LMA, probaron el plasma de 7 pacientes consecutivos con LMA. Los niveles de FL para estos 7 pacientes fue de 2 a 6 pg/ml, con una media de 3 pg/mL y una SD de 2 pg/ml.²⁴⁷

Para los pacientes con LMA en primera recaída, se probaron 72 muestras de plasma de referencia del ensayo Cephalon 204. En estos pacientes, hubo una variación considerable en los niveles de FL, que van desde 2 pg/ml hasta 2953 pg/ml (media +- SD, 57 +- 348 pg/ml).

Lo que se muestra en la Figura 14 A son los niveles individuales y la media de FL para el día 15 del curso 1 de la terapia de inducción para los pacientes recién diagnosticados AML15 en comparación con el día 15 de quimioterapia de recuperación para las recaídas en pacientes del ensayo Cephalon 204. Aunque existe una gran variación individual en los niveles de FL en ambos ensayos, como grupo, los pacientes recidivantes o en recaída tienen niveles significativamente más altos.

También se tenían muestras de plasma disponibles en los siguientes ciclos de quimioterapia del estudio AML15 (todos del día 15 de cada curso), y la media de los niveles FL se elevaron con cada curso posterior (fig. 14 B). El nivel de FL en el día 15 del segundo curso de la quimioterapia para los pacientes AML15 fue comparable en magnitud con la observada en los pacientes que recaen sobre el día 15 de su terapia de rescate.

Estudios anteriores han demostrado que los niveles de FL se elevan y luego caen después de la terapia de inducción de aplasia. Desde el ensayo Cephalon 204, también se analizaron muestras de plasma recogidas en o alrededor del día 42, con la que hemos sido capaces de examinar los niveles de FL individuales de los pacientes durante la recuperación de un único ciclo de quimioterapia. Los resultados de estas muestras (Fig.14C) indican que en muchos casos los niveles de FL se mantienen elevados durante varias semanas después del inicio de la terapia.

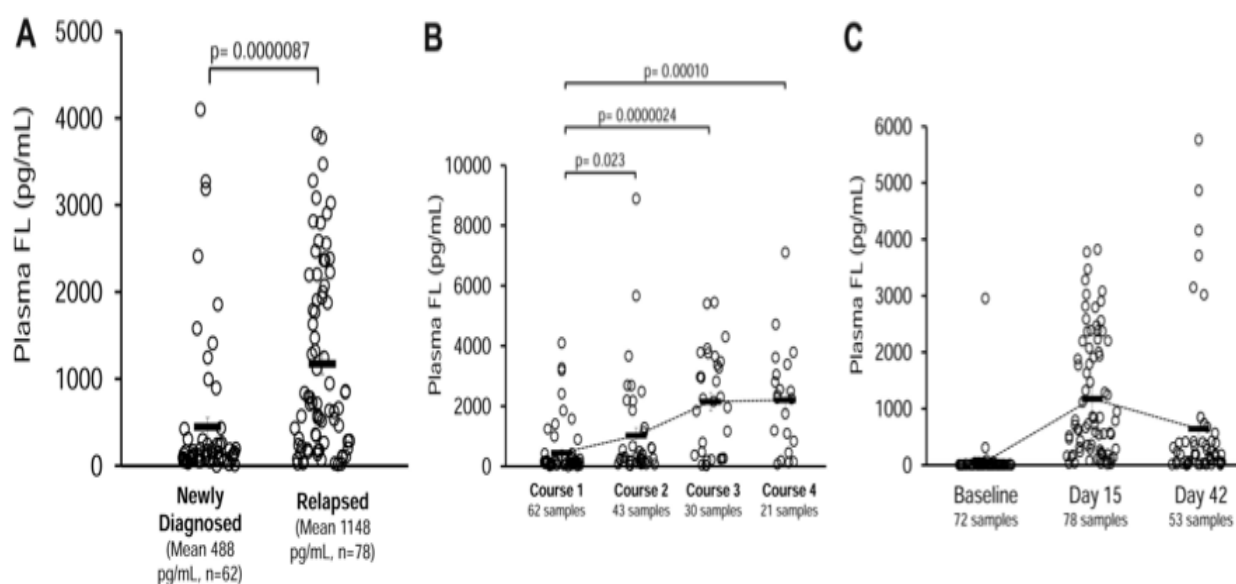


Figura 14. Las concentraciones plasmáticas de FL de pacientes incluidos en ensayos clínicos.(A) Las muestras de plasma obtenidas en el día 15 del tratamiento de inducción para los recién diagnosticados (izquierda) frente a una recaída (derecha) pacientes con LMA con FLT3 mutante se analizaron para FL mediante ensayo inmunoenzimático. (B) Los niveles de FL de las muestras de plasma obtenidas de pacientes recién diagnosticados con LMA con FLT3 mutante. El curso 1 fue de inducción, y los cursos 2-4 fueron de consolidación. Las muestras del curso 1 corresponden a las de la izquierda en el panel A. Para el curso 1, la concentración media de FL fue de 488 pg / ml (rango de 3-4099 pg/ml), para el curso 2, la media fue de 1196 pg / ml (rango de 34 a 8889 pg / ml), para el curso 3, la media fue de 2298 pg/ml (rango, de 30 a 5451 pg/ml), para el curso 4, la media fue de 2145 pg / ml (rango de 76 a 7108 pg/ml). (C) los niveles plasmáticos de FL de pacientes individuales en el ensayo Cephalon 204 en 3 momentos diferentes durante el tratamiento. Para las muestras de línea de base, hubo una sola muestra de medición de 2953 pg/ml. Veintidós muestras de línea de base tenían niveles de FL por debajo del límite de detección para el ensayo (por ejemplo, <2 pg/ml). Estas muestras fueron enlistadas como que tenían 2 pg/ml. Para las muestras de línea de base, la mediana fue de 5 pg/ml, la media fue de 57 pg/ml, y el rango fue desde el indetectable hasta 2298 pg/ml. Para las muestras del día 15, la media fue de 1173 pg/ml, la mediana fue de 721 pg/ml, y el rango fue de 19 a 3818 pg/ml. Para las muestras del día 42, la mediana fue de 187 pg/ml, la media fue de 642 pg/ml, y el rango fue de 4 a 5767 pg/ml. Figura tomada y modificada de FLT3 ligand impedes the efficacy of FLT3 inhibitors in vitro and in vivo; Takashi Sato, Xiaochuan Yang, Steven Knapper, Paul White, B. Douglas Smith, Steven Galkin, Donald Small, Alan Burnett and Mark Levis; 2011 117: 3286-3293 Prepublished online January 24, 2011; doi:10.1182/blood-2010-01-266742.

Otros han informado que la inhibición de FLT3 puede resultar en la regulación de la expresión de FL. ²⁸⁵

Debido a que todos los pacientes en este estudio fueron tratados con lestaurtinib, era posible que la inhibición de FLT3 estaba aumentando los niveles de FL en la quimioterapia inducida. Para determinar el efecto de la inhibición de FLT3 *in vivo* sobre los niveles plasmáticos de FL (solo, en ausencia de quimioterapia), han probado muestras de plasma de pacientes tratados con otros 2 inhibidores de FLT3, sorafenib o AC220, en ensayos clínicos.

Se probaron 16 muestras, todas fueron obtenidas de pacientes con inhibición de FLT3 *in vivo* a menos del 15% de la línea base durante al menos 2 semanas continuas (Por ensayo farmacodinámico de inhibición de la actividad en plasma (PIA); resultados no mostrados). Los niveles de FL en estos pacientes durante la terapia con inhibidor de FLT3 varió de 4 a 155 pg/ml (media, 32 pg/ml), esencialmente las mismas que las observadas en los pacientes no tratados, y aproximadamente 2 órdenes de magnitud inferiores a los niveles observados en los pacientes después de la quimioterapia.²⁴⁷

A continuación se deseaban caracterizar los efectos de FL sobre la eficacia de inhibidores de FLT3 *in vitro*. Las células Molm14, que albergan una mutación FLT3/ITD, fueron incubadas en concentraciones crecientes de lestaurtinib en presencia de 0, 1, o 3 ng / ml de FL exógeno. Estas concentraciones de FL se eligieron porque eran similares a las medidas en el día 15 en los pacientes de la prueba de Cephalon 204.²⁴⁷

Como se muestra en la (Fig.15A), FL induce un desplazamiento hacia arriba de la curva de dosis-respuesta para la inhibición de la autofosforilación del FLT3 por lestaurtinib en plasma. Hay una baja regulación de FLT3 fosforilado y total en respuesta a la adición de FL (presumiblemente debido a la internalización del receptor), pero sorprendentemente, a mayores concentraciones de lestaurtinib, la autofosforilación de FLT3 es todavía muy evidente en comparación con el mismo experimento realizado en la ausencia de FL.

A concentraciones de 10 μ M en plasma, que es un nivel observado con frecuencia en los pacientes de la prueba, 3 ng/ml de FL da como resultado la autofosforilación significativa de FLT3 en comparación con la observada en ausencia de FL (Fig.15A).

La adición de FL dio como resultado la baja regulación de FLT3 total y fosforilada, que ha sido descrita en la literatura y se puede ver en la (Fig.15A).²⁴⁷ En todos los casos, la adición de FL resultó en la pérdida de la inhibición completa de estos agentes en las dosis más altas utilizadas y un desplazamiento hacia arriba en las curvas de dosis-respuesta. La Figura 15B ilustra los efectos que la adición de 3 ng/ml de FL tiene sobre la eficacia inhibitoria de todos estos fármacos en plasma.

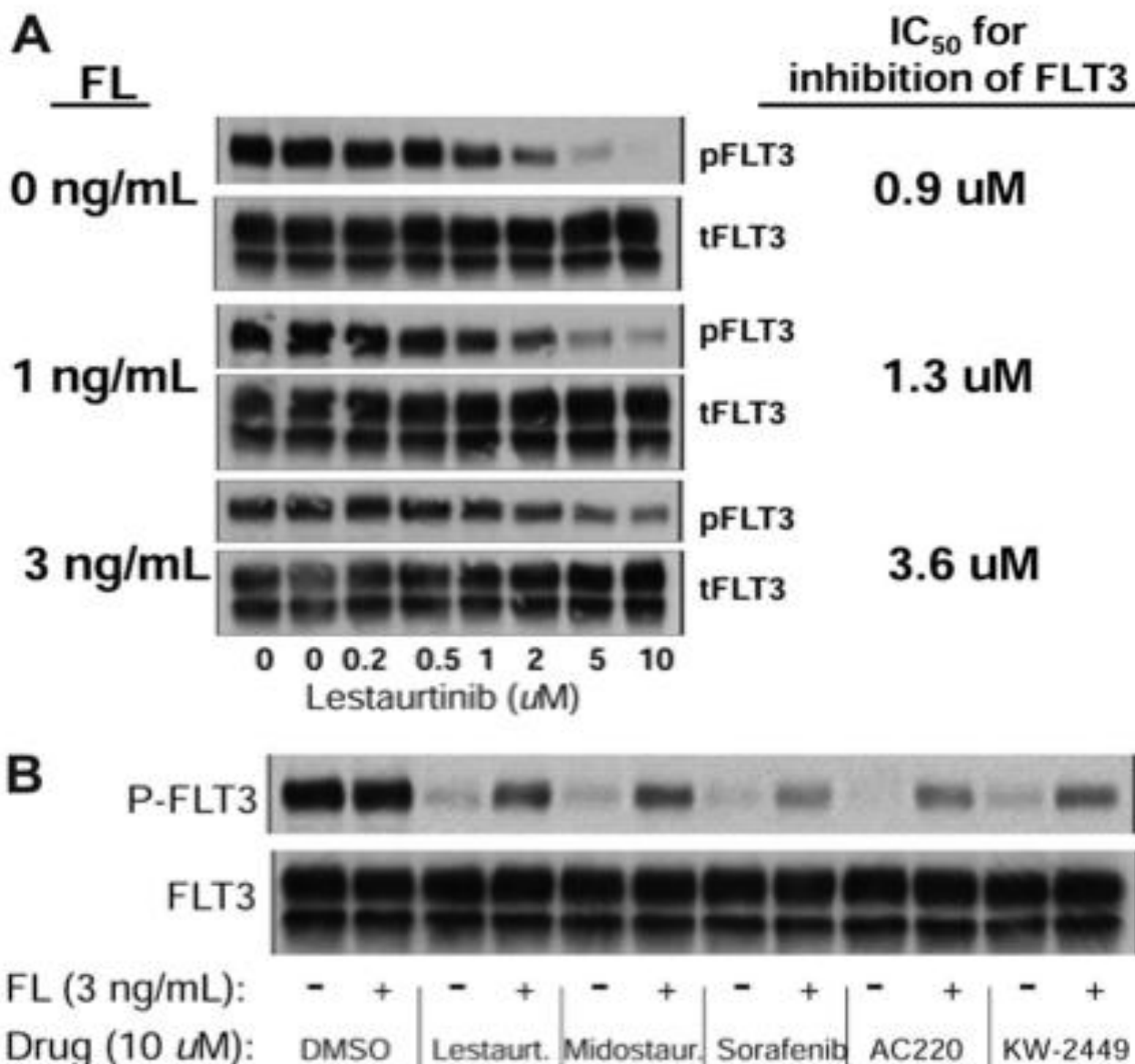


Figura 15. FL deteriora la inhibición de la autofosforilación de FLT3 in vitro. (A) Las células Molm14 fueron expuestas a concentraciones crecientes de lestaurtinib en presencia de 0, 1, y 3 ng/ml de FL en el plasma durante 2 horas. A continuación, la autofosforilación de FLT3 se evaluó por inmunotransferencia con antifosfotirosina (geles, izquierda) por inmunoprecipitación de FLT3, y luego, después de la electroforesis y transferencia a membrana. Las bandas fueron analizadas por densitometría y trazos. (B) Las células Molm14 se incubaron en plasma con 10 μM del fármaco indicado y 0 ng/ml (-) o 3 ng / ml (+) de FL durante 2 horas. A continuación, la autofosforilación de FLT3 se evaluó mediante inmunotransferencia. Figura tomada y modificada de FLT3 ligand impedes the efficacy of FLT3 inhibitors in vitro and in vivo; Takashi Sato, Xiaochuan Yang, Steven Knapper, Paul White, B. Douglas Smith, Steven Galkin, Donald Small, Alan Burnett and Mark Levis; 2011 117: 3286-3293 Prepublished online January 24, 2011; doi:10.1182/blood-2010-01-266742.

Debido a que la intención de inhibir la autofosforilación de FLT3 en la LMA es inducir una respuesta citotóxica, querían determinar si los efectos citotóxicos de estos inhibidores de FLT3 se habían mitigado también por la adición de FL.

Las células Molm14 se incubaron durante 48 horas con concentraciones crecientes de ambos inhibidores de FLT3 y FL, y fueron analizadas para el efecto citotóxico (Fig16). Para todos los fármacos analizados, FL aumentó los valores de citotoxicidad de IC50 e IC80. Los resultados se resumen en la Tabla 4.

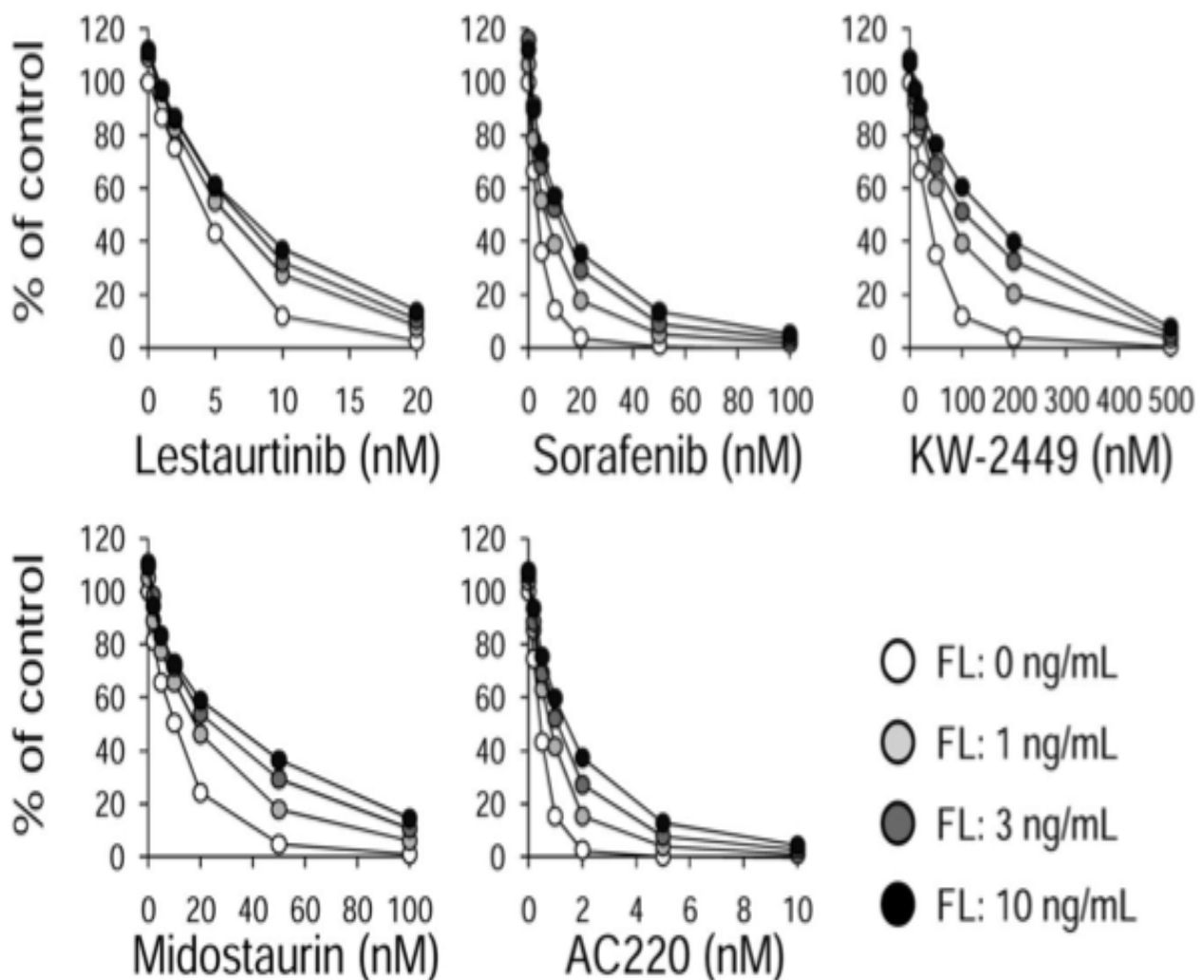


Figura 16. FL interfiere con los efectos citotóxicos de los inhibidores de FLT3. Las células Molm14 se incubaron en medio de cultivo celular (RPMI con 10% de suero fetal bovino) con concentraciones crecientes de los fármacos indicados durante 48 horas en presencia de 0, 1, 3, y 10 ng/ml de FL. La viabilidad celular se determinó utilizando el ensayo de MTT. Los resultados se representan como porcentaje de control en DMSO. Figura tomada y modificada de FLT3 ligand impedes the efficacy of FLT3 inhibitors in vitro and in vivo; Takashi Sato, Xiaochuan Yang, Steven Knapper, Paul White, B. Douglas Smith, Steven Galkin, Donald Small, Alan Burnett and Mark Levis; 2011 117: 3286-3293 Prepublished online January 24, 2011; doi:10.1182/blood-2010-01-266742.

Tabla 4. Los resultados del ensayo de citotoxicidad para los inhibidores de FLT3 en la presencia o ausencia de FL. Tomada y modificada de FLT3 ligand impedes the efficacy of FLT3 inhibitors in vitro and in vivo; Takashi Sato, Xiaochuan Yang, Steven Knapper, Paul White, B. Douglas Smith, Steven Galkin, Donald Small, Alan Burnett and Mark Levis; 2011 117: 3286-3293 Prepublished online January 24, 2011; doi:10.1182/blood-2010-01-266742.

Inhibitor/values, nM	Exogenous FL, ng/mL			
	0	1	3	10
Lestaurtinib				
IC ₅₀	3.3	5.3	6.3	6.8
IC ₈₀	7.1	11	13	15
Midostaurin				
IC ₅₀	7.2	14	23	25
IC ₈₀	17	43	59	86
Sorafenib				
IC ₅₀	3.3	5.9	10	12
IC ₈₀	7.1	16	26	34
AC220				
IC ₅₀	0.38	0.69	0.92	1.3
IC ₈₀	0.75	1.6	2.4	3.3
KW-2449				
IC ₅₀	28	62	85	114
IC ₈₀	58	166	231	296

En 5 muestras primarias de pacientes de LMA con mutaciones FLT3/ITD (Fig.17), observaron un patrón similar de respuesta a FL y la inhibición de FLT3. Para todas las 5 muestras, la adición exógena de FL aumentó la actividad metabólica de la muestra en medio de cultivo y dio como resultado un desplazamiento relativo hacia arriba en la curva dosis-respuesta de citotoxicidad.

Sin embargo, el grado de desplazamiento en las curvas dosis-respuesta fue más variable que lo observaron en las líneas celulares. Los valores de IC₅₀ no se calcularon para estos experimentos debido a la falta de cinética de primer orden y porque en algunos casos una reducción de la actividad metabólica a menos del 50% de la línea de base no se produjo sobre las concentraciones de fármaco utilizadas.

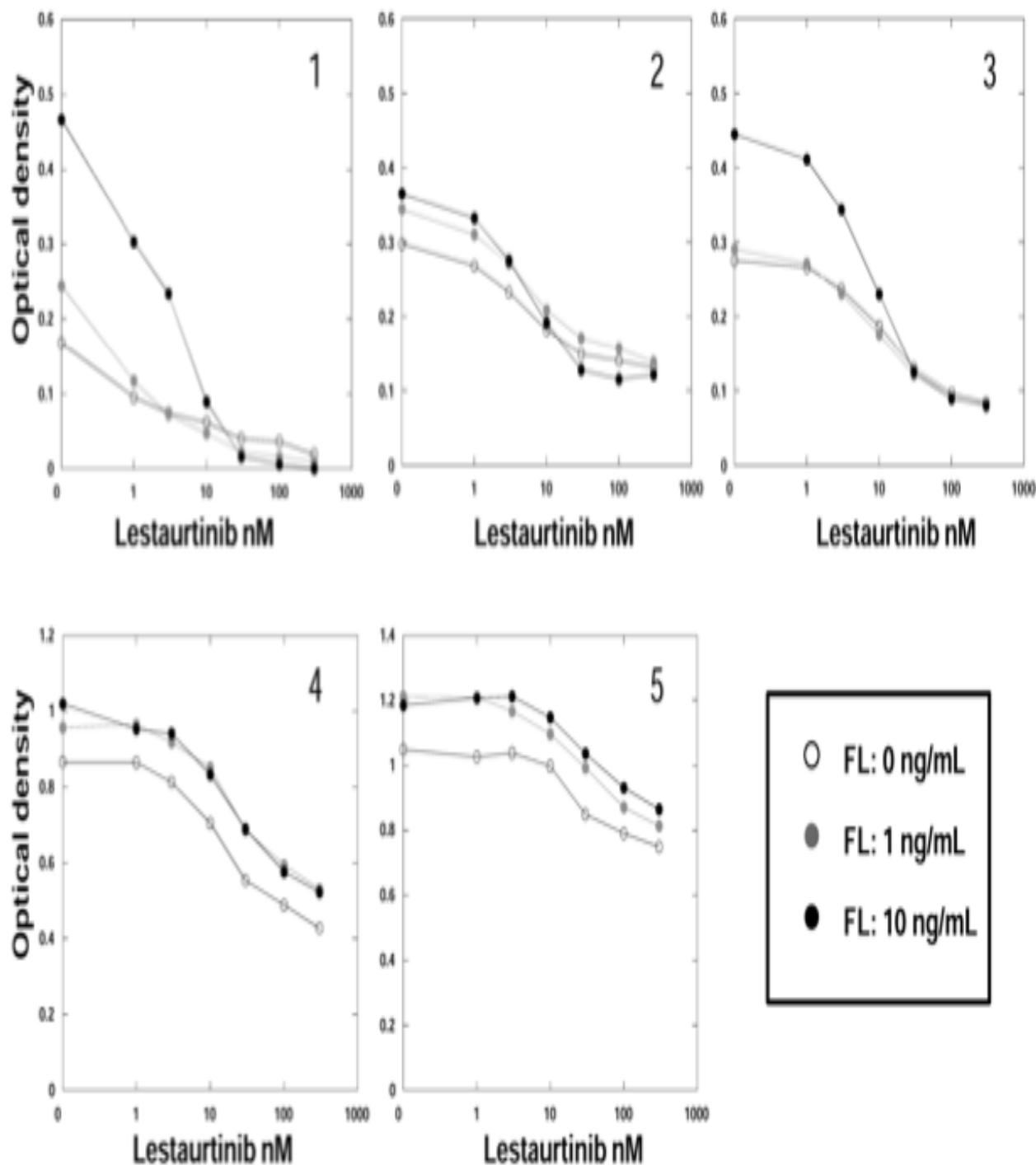


Figura 17. FL interfiere con los efectos citotóxicos de los inhibidores de FLT3 en muestras de AML primarias. Cinco muestras primarias diferentes de blastos de LMA primaria, cada una alberga una mutación FLT3/ITD, se incubaron en medio de cultivo con concentraciones crecientes de los fármacos indicados durante 48 horas en presencia de FL. La viabilidad celular se determinó utilizando el ensayo de MTT. Los resultados se representan como porcentaje de control en DMSO. Cada punto representa la media de las mediciones de densidad óptica por cuadruplicado. Las barras de error fueron omitidas para mayor claridad, pero, para cada punto, ascendieron a <5% del valor de densidad óptica. Figura tomada y modificada de FLT3 ligand impedes the efficacy of FLT3 inhibitors in vitro and in vivo; Takashi Sato, Xiaochuan Yang, Steven Knapper, Paul White, B. Douglas Smith, Steven Galkin, Donald Small, Alan Burnett and Mark Levis; 2011 117: 3286-3293 Prepublished online January 24, 2011; doi:10.1182/blood-2010-01-266742.

11.3 El aumento de los niveles del FL se asoció con una disminución de la inhibición de FLT3 *in vivo*

El aumento continuo de los niveles de FL con sesiones sucesivas de quimioterapia conduce a la predicción que *in vivo* la inhibición de FLT3 por lestaurtinib sería menos eficaz después de la primera sesión de inducción. En confirmación con esto, el valor medio de PIA de la sesión 1 del ensayo AML15 (18 muestras analizadas en total) fue del 3% del valor basal, mientras que en los cursos de 2 a 4 (18 muestras totales) el valor fue de 6,8% (P =0.04).

Para establecer una asociación mejor entre los niveles elevados de FL y el deterioro de la inhibición de FLT3, se analizó el conjunto de datos para los casos en que los pacientes individuales tenían concentraciones de lestaurtinib en plasma similares a 2 puntos de tiempo diferente durante el tratamiento, pero diferentes niveles de FL.²⁴⁷

En la Fig.18A se muestran 2 casos. En ambos casos, la concentración de FL aumentó de un nivel bajo a más de 3 ng/ml, y en ambos casos la intensidad de la autofosforilación del FLT3 es más de 2 veces mayor en las muestras con el FL elevado.²⁴⁷

La actividad de FLT3 es todavía reducida desde el inicio de tal manera que podría predecirse un efecto citotóxico, lo que indica que los niveles elevados de fármacos pueden superar los efectos atenuantes de los altos niveles plasmáticos de FL, al menos en estos casos.

Para caracterizar mejor los efectos de la quimioterapia inducida, FL aumenta en la inhibición de FLT3 en un solo paciente, se recogió plasma de un paciente recientemente diagnosticado con LMA (sin una mutación FLT3) en el diagnóstico y luego cada 5 días después de la quimioterapia de inducción.

El régimen de quimioterapia constaba de citarabina 667 mg/m² por día por infusión continua los días 1 a 3, daunorrubicina 45 mg/m² por día en los días 1 a 3, y etopósido 400 mg/m² por día en los días 8 a 10. Esto fue un régimen de dosis más intensa que cualquiera de los utilizados en los ensayos de lestaurtinib.

Se midieron los niveles de FL en el plasma de estos puntos de tiempo (Fig. 18B) y, a continuación, en un experimento paralelo, añadiern su inhibidor más potente de FLT3, AC220, a una concentración de 2 μ microM a cada punto de tiempo en la muestra de plasma. El plasma con AC220 se utilizó entonces para incubar células Molm14, y el FLT3 fosforilado se evaluó mediante inmunotransferencia. Como se muestra en la Fig.18B, los niveles de FL incrementaron después de la quimioterapia, hasta llegar a un máximo en el día 15, y luego caer de nuevo cerca de niveles basales por el día 25.

En paralelo con la curva de FL, la actividad inhibidora de AC220 es significativamente debilitada entre los días 12 y 20, hasta el punto en que la autofosforilación del FLT3 es casi el 50% del valor basal. Este grado de inhibición de FLT3 se correlaciona con la pérdida significativa de la actividad citotóxica, extrapolando a partir de estudios preclínicos *in vitro* con este agente.

12. PAPEL DE HCT EN FLT3/ITD+ EN AML

Pacientes que tienen LMA con FLT3/DITs tienen menores tasas de RC como los que no tienen FLT3/DIT, sin embargo, aquellos que logran una RC permanecen en riesgo significativamente más alto de recaída y muerte.^{229, 231,232} la remisión posterior a la intensificación de las terapias incluyendo trasplante alogénico de células madre ha sido evaluado por su papel en el tratamiento de los pacientes de LMA con FLT3/DITs.²⁹⁰

Un estudio reciente examinó si los pacientes que recibieron HCT alogénico en la primera RC tuvieron un mejor resultado clínico en comparación con los que fueron tratados con quimioterapia convencional.²⁷⁶ Los pacientes con FLT3/DITs que recibieron un trasplante alogénico HCT de un donante emparentado compatible tuvieron un menor RR (22% frente a 49%) que los pacientes que recibieron quimioterapia estándar.

Los estudios más recientes adultos y pediátricos confirman estos hallazgos, demostrando que los pacientes con FLT3/DTI se ven beneficiados de HCT alogénico en la primera RC.²³² Por lo tanto, los resultados generales sugieren que aunque FLT3/DTI es predictivo de recaída y mala evolución en el entorno de la quimioterapia, su significado pronóstico puede ser suprimido con HCT alogénico.²⁸⁹ Esta mejora en los resultados clínicos con trasplante alogénico para FLT3/DTI positivo con LMA es muy similar a la situación encontrada en Filadelfia positivo LLA donde la enfermedad se asocia con mal pronóstico con la quimioterapia sola, pero no así con HCT alogénico.²⁹¹

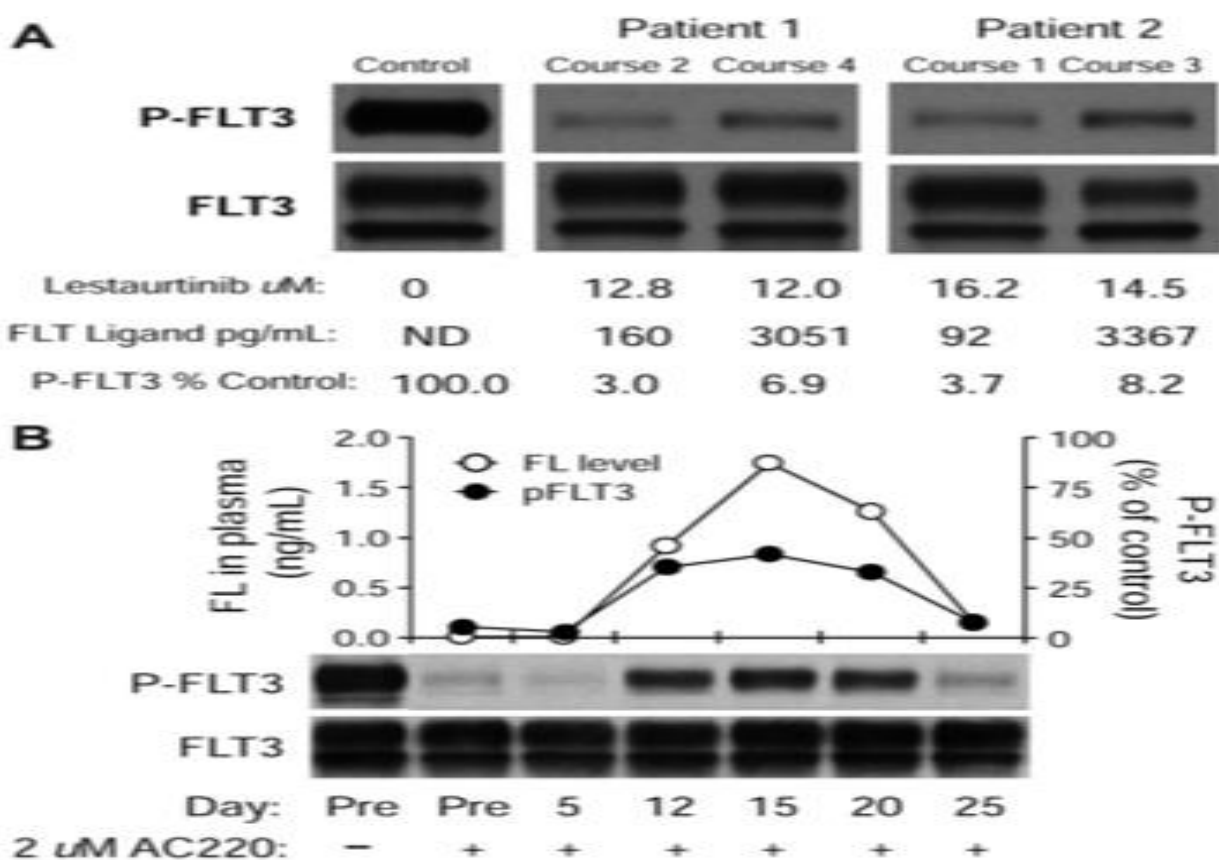


Figura 18. FL deteriora la inhibición de la autofosforilación de FLT3 in vivo. (A) Las muestras de plasma de 2 pacientes individuales tratados en el ensayo AML15 las recogieron en diferentes puntos de tiempo y luego fueron evaluados para la actividad inhibitoria de FLT3 (ensayo PIA). Las células se expusieron al plasma durante 3 horas y después las lisaron. FLT3 fue inmunoprecipitado, se sometió a electroforesis, y fue transferida a una membrana. El blot lo probaron con antifosfotirosina (fila superior) y luego eliminado y sondeado con anti-FLT3 (fila inferior). Los niveles de FL y lestaurtinib los determinaron a partir de las mismas muestras de plasma como se describe en "FL ELISA" y "Farmacocinética." (B) Recogieron el plasma de un paciente solo con LMA recién diagnosticado en diferentes puntos de tiempo después del diagnóstico y el tratamiento con quimioterapia de inducción (citarabina, daunorrubicina, y etopósido). En el plasma analizaron los niveles de FL por inmunoensayo enzimático y se representa (O). En paralelo, se añadió AC220 a una concentración de 2 μ M para cada punto de tiempo y se usó para incubar células Molm14 durante 2 horas. Cada muestra se ensayó para determinar la actividad inhibitoria de FLT3 como en el panel A. El análisis densitométrico de la fosfo-FLT3 blot (transferencia de la parte superior, F). Figura tomada y modificada de FLT3 ligand impedes the efficacy of FLT3 inhibitors in vitro and in vivo; Takashi Sato, Xiaochuan Yang, Steven Knapper, Paul White, B. Douglas Smith, Steven Galkin, Donald Small, Alan Burnett and Mark Levis; 2011 117: 3286-3293 Prepublished online January 24, 2011; doi:10.1182/blood-2010-01-266742.

12.1 Mutaciones de FLT3 "activación de bucle" en leucemias humanas

Las mutaciones puntuales dentro del bucle de activación del dominio cinasa de FLT3 (FLT3/ALM) son el segundo tipo de mutaciones FLT3.^{229,232} Estas mutaciones también se conocen como mutaciones de dominio de tirosina cinasa de FLT3 (FLT3 / TKD).²⁹²

Recientemente se ha informado que una serie adicional de pacientes que presentan LMA tienen mutaciones de la llamada activación de bucle de FLT3. La activación de bucle es un componente general de las tirosina cinasas y cuando la cinasa está en el estado "inactivo", funciona para bloquear el acceso de adenosina trifosfato (ATP) y el sustrato para el dominio cinasa.²⁹³

Después de la activación, que normalmente sería a través de la unión del ligando, en el caso de los miembros de la familia RTKIII, un residuo específico de tirosina dentro del bucle es típicamente fosforilado, haciendo que el bucle adopte una configuración "activada" que permite el acceso a la cinasa.²⁹⁴

Las mutaciones de activación de bucle se han reportado en la posición Asp816 de c-KIT y en la posición correspondiente en RTKs, incluyendo MET y RET. El residuo análogo de ácido aspártico en FLT3 está en la posición del aminoácido 835. Las sustituciones de Asp835 han sido reportadas en 30 de 429 (7%) LMA, en 1 de 29 (3%) MDS, y 1 de 36 (3%) en pacientes de LLA. Una frecuencia similar se registró en 7 de 35 pacientes con LMA (7%). En ambas series, Asp825Tyr fue la sustitución más común, pero otras sustituciones incluyen Asp835Val, Asp835His y Asp835Glu.²⁹⁵

Tomados en conjunto estos datos indican que aproximadamente el 30% de los pacientes con LMA han adquirido mutaciones en FLT3 que comprenden mutaciones de FLT3-ITD (24%) o mutaciones FLT3 activación de bucle (7%). FLT3 es así el único gen más comúnmente mutado en la LMA.²⁹⁶

FLT3/ALMs se han encontrado en las células malignas de pacientes con LMC (~ 1%), LLA (1-3%), MDS (2-5%), y LMA (5 -10%).^{297,298} Dado que los pacientes rara vez albergan tanto un FLT3/ITD y FLT3/ALM²⁹⁹ un alto porcentaje de pacientes con LMA (25 - 45%) tendrá al menos un tipo de mutaciones FLT3, haciendo que las mutaciones de FLT3 sean una de las anomalías genéticas más comunes en la LMA.³⁰⁰ en contraste con el aumento dependiente de la edad en la prevalencia de FLT3/ITD la prevalencia de FLT3/ALM parece ser constante en todos los grupos de edad.³⁰¹

La mayoría de los FLT3/ALMs se producen en los codones 835 con un cambio de un ácido aspártico a tirosina (D835Y), sin embargo, se han descrito otras mutaciones puntuales, deleciones e inserciones en el codón D835.^{293,302,303}

Aunque FLT3/ALM promueve la autofosforilación del receptor, la activación constitutiva del receptor, y la proliferación independiente de ligando es similar a la de FLT3/ITD^{304,305} existen importantes diferencias biológicas entre los dos tipos de mutaciones de FLT3. FLT3/ITDs y FLT3/ALMs parecen promover la activación de diferentes efectores en las vías descendentes, y diferentes respuestas biológicas.³⁰⁶

Los estudios en animales han demostrado que ratones que albergaban FLT3/ITDs principalmente desarrollaban un trastorno mieloproliferativo oligoclonal, mientras que los ratones que albergaban FLT3/ALM son más propensos a desarrollar trastornos linfoides oligoclonales³⁰⁷.

13. IMPORTANCIA CLÍNICA DE FLT3/ALM

Poco después de que FLT3/DTI fuera reconocido, la presencia de mutaciones en el dominio de activación de FLT3 (FLT3-ALM) fueron reportadas en el 7% de los pacientes con LMA y su presencia se asocia con un peor pronóstico. Una evaluación más profunda en un estudio de cohorte dio una definición mas completa de la prevalencia y el significado pronóstico de FLT3/ALM en la LMA pediátrica y adulta.

La prevalencia de FLT3/ALM es del 6-8%, independientemente de la edad y la presencia de FLT3/ALM y FLT3/DTI parecen ser excluyentes entre sí.³⁰⁸

Estos estudios demostraron además que la presencia de FLT3/ALM no está asociada con leucocitosis, y en contraste con FLT3/DTI, aquellos con FLT3/ALM no tienen resultado adverso. Dado que los estudios biológicos han demostrado previamente diferencias funcionales entre el FLT3/DTI y FLT3/ALM, tales diferencias clínicas entre los dos tipos de mutaciones de FLT3 no son sorprendentes.³⁰⁵ Con la revisión de los resultados clínicos en el contexto de la variación alélica de FLT3/DTI y FLT3/ALM, se podría concluir que además de la presencia de mutaciones FLT3 y otras alteraciones estructurales asociados con FLT3/DTI pueden afectar a la progresión de la enfermedad.³⁰⁷

14. MECANISMO SUBYACENTE DE LA VARIACIÓN ALÉLICA EN FLT3/ITD

Como la variación de la proporción alélica se asocia con el resultado clínico, la delineación de los mecanismos subyacentes de la variación alélica puede proporcionar conocimientos sobre la patogénia de la LMA y la guía de intervención terapéutica.

La evaluación inicial de homocigotos de FLT3/DTI por primers STR reveló pérdida de heterocigosidad (LOH) como factor contribuyente a la patogénesis de la enfermedad en FLT3/DTI con AML.³⁰⁸

Un estudio corroboró la presencia de LOH en una cohorte de FLT3/DTI pacientes con LMA, y demostró que la presencia de LOH se asoció con enfermedad de alto riesgo. Nuevos métodos han permitido una evaluación más exhaustiva de la LOH en pacientes con FLT3/ITD.³⁰⁹

La evaluación completa del genoma, del número de copias y alteraciones LOH por la tecnología de matriz SNP/CGH han demostrado amplios segmentos LOH del cromosoma 13 en un subgrupo de pacientes con FLT3/DTI (aquellos con alto ITD-AR) La región de LOH se extendía desde las regiones centroméricas a FLT3 e incluye la totalidad telomérica 13q a FLT3.³¹⁰

Esta gran región de 13qLOH se limitó a las muestras FLT3/DTI y no se observó en aquellos con FLT3/ALM o aquellos con FLT3/WT, lo que sugiere una relación causal entre FLT3/ITD y 13qLOH.

La evaluación adicional de número de copias en aquellos con 13qLOH demostró que no hubo alteraciones de número de copias (ninguna delección), demostrando que la variación alélica observada es debido a que se copia el LOH neutral, conocido de otro modo como disomía uniparental segmental adquirida (aUPD).³¹¹

Estudios recientes han demostrado que la presencia de aUPD no es única para FLT3/DTI y que aUPD puede ser un evento común en la patogénesis mielóide. La UPD segmental adquirida es un mecanismo por el cual se logra un estado homocigótico después de una adquisición inicial de una mutación heterocigota, donde se utiliza el alelo mutante como una plantilla, y el alelo de tipo salvaje se convierte en mutante, lo que resulta en un estado homocigótico.³¹²

Se ha demostrado que en las muestras con FLT3/DTI en las que se demostró previamente 13q aUPD, CD34+/CD33- los progenitores mieloides tempranos exhiben FLT3/DTI en un estado heterocigótico (no aUPD), y el estado homocigótico sólo se observa en los blastos mieloides más maduros, CD34 + / CD33 +, lo que confirma que aUPD es un acontecimiento tardío en la patogénesis de la LMA.³¹⁰

La UPD segmentaria puede involucrar una región dentro del alelo resultante de dos rupturas simétricas seguido de la reparación, lo que resulta en la conversión de una región intersticial en el cromosoma (UPD segmentaria intersticial, Fig.19C) o de una ruptura simple, lo que lleva a la conversión de todo el segmento telomérico del cromosoma (UPD segmentaria terminal, Fig.19D).³¹²

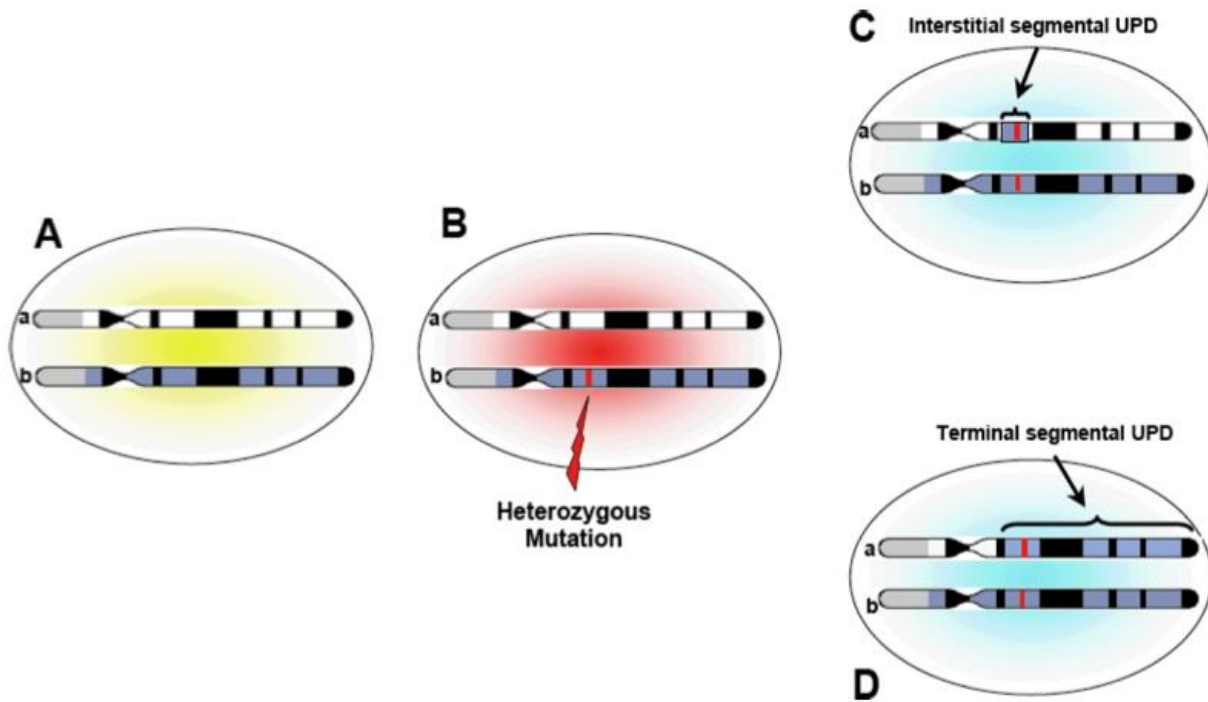


Figura 19. Pérdida de heterocigosidad (LOH) debido a aUPD. La disomía uniparental adquirida, en estado homocigoto puede afectar todo el cromosoma o se limita a un segmento de un cromosoma (aUPD segmentaria). La aUPD segmentaria está mediada por recombinación homóloga mediada por cruce somático entre dos cromátidas homólogas no hermanas. En condiciones basales, en estado no mutado, los genes están representados por dos alelos diferentes (A, estado heterocigoto). La alteración molecular se adquiere en un alelo, que conduce a una mutación heterocigota (B). La evolución de la UPD lleva a la conversión del alelo de tipo salvaje a mutante, y a la evolución de la mutación homocigótica. Cuando es intersticial, la UPD segmentaria resulta en dos descansos simétricos que flanquean un segmento del cromosoma, donde durante el proceso de reparación, la región flanqueada por las interrupciones en el alelo de tipo salvaje se utiliza como una plantilla y, como resultado, un segmento del cromosoma sufre una conversión de heterocigotos a estado homocigótico (UPD adquirida). El segmento terminal de UPD resulta de una simple ruptura simétrica en cada una de las dos cromátidas homólogas no hermanas y el producto reparado resultante demuestra UPD (LOH) de la región telomérica a la región de la doble línea rota. Figura tomada y modificada de Structural and functional Alterations of FLT3 in Acute Myeloid Leukemia; Soheil Meshinchi and Frederick R. Appelbaum Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA; Clin Cancer Res. 2009 July 1; 15(13): 4263–4269. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1123.

15. INHIBIDORES DE FLT3

En la actualidad, los inhibidores multidiaria de FLT3 más antiguos se encuentran en ensayos clínicos avanzados, mientras que los más nuevos, los inhibidores de FLT3 más selectivos están entrando en desarrollo.³¹³

Muchos inhibidores potentes de FLT3 se han identificado, y algunos se han probado clínicamente como agentes únicos y en combinación con quimioterapia, pero hasta el momento las respuestas clínicas se han limitado^{314,315}.

Actualmente, sorafenib, un inhibidor de la proteína tirosina cinasa (VEGFR y PDGFR) y cinasas Raf, es el único inhibidor aprobado para uso clínico en FLT3. Sorafenib está disponible para su uso sin prescripción, aunque no suele conducir a una completa respuesta. Un esfuerzo adicional en el inhibidor de FLT3 es claramente necesario. Para este propósito, los métodos más eficaces para los ensayos de la actividad de la cinasa FLT3 son altamente deseables.³¹⁶

15.1 Experiencia clínica con FLT3-TKI's como agentes únicos

Midostaurin.

En un ensayo de fase 2, 20 pacientes con LMA FLT3-mutado ya sea recaído/resistente, síndrome mielodisplásico avanzado, o considerados no aptos para quimioterapia intensiva fueron tratados con midostaurin.³¹⁶

Fueron detectados 18 pacientes con mutación FLT3-ITD, y 2 pacientes con una mutación FLT3-D835Y. Catorce pacientes experimentaron una reducción mayor del 50% del recuento de blastocitos, algunos pacientes lograron la eliminación completa de blastocitos PB. Además, 6 pacientes lograron una disminución de más del 50% en el número de blastos BM.³¹⁶

La mediana del tiempo hasta la progresión fue de 2-3 meses. En estudios de laboratorio correlativos, la actividad del inhibidor de plasma se determinó en 10 pacientes. FLT3-ITD-que expresan las líneas celulares se incubaron con las muestras plasmáticas obtenidas de pacientes durante la terapia con midostaurin. La autofosforilación FLT3 se determinó en comparación con los niveles basales.³¹⁷

En 8 muestras de pacientes, la inhibición de la fosforilación por la tirosina de FLT3 se observó; 6 de estos 8 pacientes mostraron respuestas clínicas, mientras que 2 pacientes parecían ser intrínsecamente resistentes a midostaurin. No se observaron respuestas en pacientes con fosforilación de tirosina en niveles >15% de niveles basales en la terapia con midostaurin.³¹⁷

Lestaurtinib.

El agente único lestaurtinib se probó en un ensayo clínico de fase 1/2 en pacientes con resistencia/recaída de LMA que expresan mutaciones FLT3-activadas. Cinco pacientes tratados a una dosis de 60 mg por vía oral dos veces al día experimentaron respuestas clínicas favorables mostradas por una disminución en blastos en sangre periférica y en médula osea, la recuperación de recuentos absolutos de neutrófilos y disminución de transfusiones.³¹⁸

En general, las respuestas fueron de corta duración, con una duración de 2 semanas a 3 meses. Todos los pacientes en los que se observaron respuestas clínicas logran una inhibición fuerte y sostenida de fosforilación de la tirosina a un nivel basal menor de 15% .³¹⁹

Curiosamente, 2 de 8 pacientes no muestran respuesta citotóxica a lestaurtinib en un bioensayo *in vitro*, a pesar de la potente inhibición de la fosforilación de FLT3. Como se predijo por los datos *in vitro*, ambos pacientes mostraron una respuesta clínica evidente, lo que sugiere la activación de vías alternativas desconocidas.³¹⁹

En un seguimiento de fase 2 del ensayo clínico, los efectos de lestaurtinib en monoterapia fueron examinados en los pacientes con LMA no tratada independientemente del estado de mutación FLT3.³²⁰

Se observó que no hay una remisión completa (RC) o remisión parcial (RP) en este grupo de pacientes. Ocho de los 29 pacientes tratados con una dosis inicial de 60 mg dos veces al día demostraron mejorías hematológicas, en algunos pacientes que experimentan la independencia de transfusión prolongada.³²⁰

El tiempo medio hasta la progresión fue de 25 días. Información correlativa de estudios *in vitro* y *ex vivo* demostraron una clara relación entre el nivel de inhibición de la tirosina quinasa FLT3, con la citotoxicidad *in vitro* y las respuestas clínicas.³²¹

Sorafenib.

La eficacia terapéutica de sorafenib se evaluó en un ensayo de fase 1 en 16 pacientes con resistencia / recaída de LMA. Las dosis oscilaron entre 200-400 mg dos veces al día por vía oral y no presentaron toxicidad limitante de la dosis. Una disminución significativa en el porcentaje de blastocitos de sangre periférica y médula ósea se observó en todos los pacientes FLT3-ITD⁺ (6/6), mientras que sólo 3 pacientes FLT3-wt (3/7) y ninguno de los pacientes portadores de FLT3-D835Y (0/3) respondieron.³²²

Recientemente, los resultados de un programa de uso compasivo de sorafenib en 6 pacientes FLT3-ITD⁺, ya sea resistente o en recaída, han sido reportados.³²³ Los 6 pacientes mostraron evidencia de respuesta clínica, 3 pacientes lograron remisión completa. Dos pacientes podrían someterse a un trasplante alogénico de células madre. En contraste con los informes de estudios anteriores de FLT3-TKI, la duración del tratamiento se prolongó con una media de 158 días.³²²

Las respuestas de larga duración y las altas tasas de respuesta en esta población de pobre riesgo están en línea con los datos recientemente publicados que demuestran que los blastos con altas mutaciones a proporciones alélicas de tipo nativo o de recaída/resistencia desarrollan la enfermedad apegada al oncogén y son más propensos a responder a FLT3-TKIs tales como sorafenib.³²⁴

Semaxanib.

Semaxanib se probó en un ensayo de fase 2 en pacientes con LMA resistente al tratamiento o síndrome mielodisplásico, independientemente de su estado de mutación de FLT3.³²⁵ Semaxanib como agente único tenía modesta actividad clínica con PR documentado y mejora hematológica en 4 pacientes (7%). En pacientes con AML, la mediana de supervivencia fue de 12 semanas, con una duración media del tratamiento de 9 semanas.

Estudios correlativos revelaron fosforilación de FLT3 en 17 de 22 pacientes. Siete pacientes mostraron inhibición de la fosforilación de FLT3 después de la infusión de semaxanib. Sin embargo, no se pudo demostrar si hay correlación con la respuesta clínica.³²⁶

En otro ensayo multicéntrico de fase 2, la inscripción se limita a pacientes con LMA resistentes a tratamiento o en pacientes no aptos para la quimioterapia convencional y la expresión de c-KIT en los blastos leucémicos.³²⁷

De 42 pacientes, 1 paciente logró una respuesta morfológica sin evidencia de blastos en PB y BM, 7 pacientes tenían documentado una remisión parcial (19% de tasa de respuesta global), y 17 pacientes no fueron evaluables debido a la progresión rápida de la enfermedad o muerte temprana. Las respuestas duraron de 1-5 meses con una duración media de 1,6 meses. De 7 pacientes portadores de mutaciones FLT3-ITD, ninguno respondió a la terapia.³²⁷

Sunitinib.

Los efectos farmacodinámicos y farmacocinéticos de sunitinib fueron evaluados en una sola dosis, estudio de fase 1 en pacientes con LMA. Como se esperaba, la magnitud y duración de la inhibición de la fosforilación de tirosina FLT3 fue dependiente de la dosis y los niveles de fármaco en plasma. Se observó en los pacientes la inhibición de la fosforilación de FLT3 y FLT3 de tipo nativo, significativa y sostenida (>24 horas) que alcanzan niveles de fármaco en plasma de >50 ng/ml y >100 ng/ml, respectivamente. De acuerdo con datos *in vitro* reportados, los blastos FLT3-ITD fueron más susceptibles a la inhibición por sunitinib en comparación con blastos FLT3-wt.³²⁸

Con el fin de evaluar la seguridad y tolerabilidad, así como la actividad biológica y molecular, fue iniciado un estudio de fase 1 de sunitinib en recaída o resistencia de los pacientes con LMA.³²⁹

Los 4 pacientes con mutaciones de FLT3 lograron una respuesta morfológica o parcial, mientras que sólo 2 de los 7 pacientes con FLT3 de tipo nativo mostraron evidencia de actividad clínica.

Los pacientes evaluables alcanzaron los niveles de fármaco en plasma de 50-100 ng / ml y la modulación de la fosforilación de tirosina FLT3. Todas las respuestas fueron de corta duración (4-16 semanas).³²⁹

Tandutinib.

Con el fin de evaluar la seguridad, farmacocinética y farmacodinamia, se inició una fase 1 de ensayo clínico con tandutinib en 40 pacientes con LMA.³³⁰

Se administraron dos veces al día Tandutinib con una dosis inicial de 50 mg seguida de un aumento de la dosis hasta 700 mg dos veces al día. La toxicidad limitante de la dosis resultó en debilidad muscular generalizada reversible, fatiga, o ambos, probablemente debido a la inhibición de los receptores musculares de tipo nicotínicos.³³⁰

En un seguimiento de fase 2 del ensayo, 20 pacientes con FLT3-ITD-positivos LMA, ya sea resistentes o en recaída o no elegible para la quimioterapia de inducción, fueron incluidos.³³¹

Todos los pacientes alcanzaron concentraciones plasmáticas de Tandutinib > 150 ng / ml, IC₅₀ sugerida necesaria para inhibir la autofosforilación del FLT3, y la evaluación *ex vivo* de la fosforilación de tirosina FLT3 reveló la inhibición parcial o completa en 4 pacientes evaluables. La respuesta fue evaluable en 15 de 18 pacientes: 7 pacientes presentaron progresión de la enfermedad, 2 pacientes tenían enfermedad estable, y 6 pacientes transitorios (1-3 meses) evidencia de los efectos antileucémicos con una disminución de blastocitos en sangre periférica (reducción media de 92%) y en blastos en médula osea (disminución media del 62%).

KW-2449.

Para evaluar la farmacocinética, farmacodinamia, y la seguridad, se inició un estudio de fase 1 aumentando la dosis de KW-2449 en pacientes con LMA recaídas/resistentes.³³²

KW-2449 fue segura y bien tolerada. Ocho pacientes (26%) presentaban una > 50% de reducción transitoria de blastos, y no fueron observadas remisiones completas. De los 8 que respondieron, 5 albergaban mutaciones DTI de FLT3.³³²

Curiosamente, aunque la dosis máxima tolerada no se ha definido, el ensayo se terminó antes de tiempo porque los estudios correlativos de laboratorio sugieren que la inhibición eficaz y sostenida de FLT3 no se logró utilizando un programa de dosificación dos veces al día.³³²

Los niveles plasmáticos de fármaco >500 nM, el umbral necesario para lograr la inhibición de la fosforilación de tirosina FLT3 a <20% del nivel de línea de base, se mantiene sólo durante 4-6 horas.³³²

Por consiguiente, la fosforilación de la tirosina FLT3 fue completamente regulada 2 y 4 horas después de la dosis, pero se recuperó en puntos de tiempo de 8 y 12 horas como se revela por un análisis *ex vivo* de blastos de AML primarias.³³³

Estos datos ponen de relieve la importancia de los estudios de laboratorio correlativos necesarios para entender la correlación de los efectos citotóxicos *in vitro*, la actividad farmacocinética, farmacodinámica, y clínica.³³³

AC220.

Un nuevo enfoque para identificar TKIs prometedores fue utilizado por investigadores, que proyectaron una biblioteca de compuestos enfocados contra varias cinasas. Sobre la base de la afinidad de unión, se identificó un nuevo bis-arilo derivado de urea con alta selectividad para FLT3. La optimización de este compuesto en términos de potencia, selectividad y propiedades PK resultaron en la segunda generación AC220 FLT3-TKI.³³⁴

Recientemente, AC220 se investigó en un estudio de fase 1 el aumento de la dosis en recaída/resistencia en pacientes con LMA cualquiera que sea su estado de mutación de FLT3.³³⁵

AC220 se administró una vez al día en forma de solución oral. A dosis de 300 mg/d, se observaron reacciones adversas en 2 pacientes, y, por lo tanto, 200 mg fue declarada como la dosis máxima tolerada. En este estudio, un total de 76 pacientes fueron tratados con AC220.³³⁵

De ellos, 23 (30%) experimentaron respuestas clínicas: 9 pacientes (12%) tuvieron una remisión completa, y 14 (18%) tuvieron una remisión parcial. Observaron respuestas en cohortes tratadas con dosis tan bajas como 18 mg y 40 mg/d. La duración media de la respuesta fue de 14 semanas. Curiosamente, 10 de 18 pacientes (56%) FLT3-ITD⁺ comparados con 9 de 47 pacientes (19%) con FLT3 de tipo nativo respondieron sugiriendo un aumento de la susceptibilidad de FLT3 mutante en LMA. En la actualidad, el seguimiento de estudios de fase 2 en pacientes FLT3-ITD y FLT3 de tipo nativo están en curso.³³⁵

16. ENSAYOS CLÍNICOS: TRATAMIENTO COMBINADO CON QUIMIOTERAPIA Y TKI

Basándose en datos *in vitro* que muestran los efectos sinérgicos de las combinaciones de FLT3-TKIs con agentes quimioterapéuticos convencionales, este método está siendo evaluado en varios ensayos clínicos.³³⁶⁻³³⁷

A la fecha, existen pocos datos publicados únicamente en los resultados de estos ensayos. Parece que FLT3-TKI pueden combinarse de manera segura con la quimioterapia convencional, la combinación produce altas tasas de remisiones completas en pacientes con mutación FLT3, e inhibe la señalización de FLT3.³³⁸⁻³³⁹

Sin embargo, no es claro si esto se traduce en una mayor supervivencia libre de progresión y mejores tasas de supervivencia global (SG). Curiosamente, los resultados de un ensayo aleatorizado de quimioterapia de recuperación seguida por lestaurtinib para FLT3 mutante LMA en la primera recaída se informó que es negativa en cuanto a aumentar las tasas de respuesta o la prolongación de la supervivencia.³³⁹

Sin embargo, estos resultados deben considerarse con cuidado ya que los factores farmacocinéticos y posibles factores fisiológicos limitaron la capacidad de lestaurtinib para inhibir eficazmente FLT3.³³⁹

En la actualidad, los grandes estudios multicéntricos aleatorizados internacionales se están llevando a cabo en pacientes recién diagnosticados para probar la eficacia de FLT3-TKI en combinación con la quimioterapia estándar. Estos ensayos están en curso y se espera reclutar a unos pocos cientos de pacientes. Los resultados son esperados con ansiedad y tendrán un gran impacto en este campo.³³⁹

El programa óptimo (concomitadamente o secuencialmente, durante la inducción solamente, o durante todos los ciclos de la quimioterapia) y la duración (sólo durante el tratamiento primario o tratamiento de mantenimiento) de tratamiento TKI necesita ser cuidadosamente determinada en ensayos clínicos futuros.³³⁹

Por último, pero no menos importante, recientemente, dos ensayos clínicos de la fase 1/2 que evalúan la combinación de un FLT3-TKI (midostaurin) con agentes hipometilantes (decitabina o azacitidina) se han iniciado en los Estados Unidos. Los últimos ensayos están diseñados principalmente para pacientes con LMA menores o iguales a 60 años de edad, y los resultados pueden ser de gran importancia para la creciente población de pacientes mayores con LMA.³³⁹

16.1 Experiencia preclínica con un enfoque dirigido a FLT3-Anticuerpo

El uso de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra FLT3 también puede resultar como una estrategia terapéutica satisfactoria. Recientemente, se aisló el fragmento Fab del anticuerpo neutralizante IMC-EB10 humano y se demostró que se unen selectivamente a la superficie celular de FLT3 con alta afinidad y bloquean la unión de FL.³⁴⁰

El tratamiento IMC-EB10 de FLT-wt y células FLT3-mutadas inhibe la fosforilación de tirosina de FLT3, la activación de las vías descendentes, y el crecimiento celular. Además, IMC-EB10 inducida por células dependientes de anticuerpos es mediada por la citotoxicidad en las células que expresan FLT3.³⁴¹

En un modelo animal de trasplante de médula ósea, el tratamiento de los ratones disminuyó el injerto de blastocitos de la LMA primaria humana, sin afectar el injerto de células CD34⁺ humanas normal. Además, IMC-EB10 prolonga significativamente la supervivencia de ratones NOD / SCID trasplantados con células MOLM14 FLT3-ITD⁺.³⁴²

Curiosamente, esta terapia de anticuerpos neutralizantes fue también eficaz en ratones NOD / SCID trasplantados con FLT3-TKI resistentes a células MOLM14, destacando el impacto de células dependiente de anticuerpos mediada por la citotoxicidad. La seguridad de IMC-EB10 está actualmente probada en pacientes con LMA en la fase 1 de ensayo clínico (NCT00887926).³⁴³

16.2 Mecanismos de resistencia a FLT3-TKIs

Generalmente, el fracaso del tratamiento es causado por la resistencia inherente (primaria) del clon maligno o desarrollo de la resistencia emergente, secundaria (adquirida) después de una respuesta inicial. En la siguiente sección, se comentarán los posibles mecanismos de resistencia intrínseca y adquirida implicados en el fracaso de la terapia FLT3-TKI. Los mecanismos intrínsecos de resistencia primaria y secundaria FLT3-TKI se resumen en la Fig.20. Los mecanismos conocidos de resistencia a FLT3-TKI son los siguientes.

a) Resistencia primaria.

Los datos derivados de los ensayos de fase 1 y 2 usando monoterapia FLT3-TKI sugieren la existencia de resistencia primaria en aproximadamente el 30% de pacientes con LMA FLT3-mutados.³⁴⁴

Curiosamente algunos de los blastos leucémicos FLT3-mutados muestran una resistencia inherente a pesar de la inhibición casi completa de la fosforilación de la tirosina FLT3.³⁴⁴

Además, algunos pacientes muestran activación persistente de STAT5 y las vías descendentes de MAPK. Estos datos sugieren la activación de las vías de supervivencia compensatorias que presentan las células leucémicas independientes del FLT3 como se muestra en la Fig.21. Alternativamente, las células leucémicas son independientes de la autofosforilación de FLT3 pero todavía requieren la expresión FLT3-DTI. El apoyo a esta hipótesis proviene de los datos recientemente publicados que describen un nuevo mecanismo de resistencia primaria.³⁴⁵

La DTI que atípicamente se integra en TKD-1 (FLT3-ITD627E) induce la unión sostenida al adaptador de la proteína del factor de crecimiento unida al receptor proteína 2 y mejora la expresión de la proteína 1 (MCL1) de células mieloides leucémicas.³⁴⁶

Cabe destacar que estos efectos fueron independientes de TKI inducida por la supresión de la fosforilación de la tirosina de FLT3 y la resistencia mediada primaria a FLT3-TKI. Por el contrario, RNA inducido por caída de FLT3-DTI abolió la expresión MCL1 sobre la regulación y causó la muerte celular apoptótica.³⁴⁶

La sensibilidad hacia FLT3-TKIs también puede depender del tipo de mutaciones de receptor FLT3. Se ha probado la sensibilidad de 8 mutaciones de activación de bucle para tandutinib compuesto.³⁴⁶

Todos los mutantes confieren crecimiento independiente de citoquinas en células Ba/F3, sin embargo, hubo una variabilidad amplia en la inhibición de la autofosforilación de FLT3 y la citotoxicidad de los diferentes mutantes. Resultados similares han sido reportados para el compuesto SU5614.³⁴⁷

Por otra parte, se ha demostrado que diferentes TKIs -FLT3 exhiben distinta actividad inhibidora frente a varias mutaciones puntuales TKD-FLT3.

En el futuro, la información sobre la sensibilidad diferencial de mutaciones TKD- FLT3 y la reactividad cruzada de distintas TKIs-FLT3 podrían tener implicaciones para la selección de un apropiado TKI para FLT3.²⁴⁸

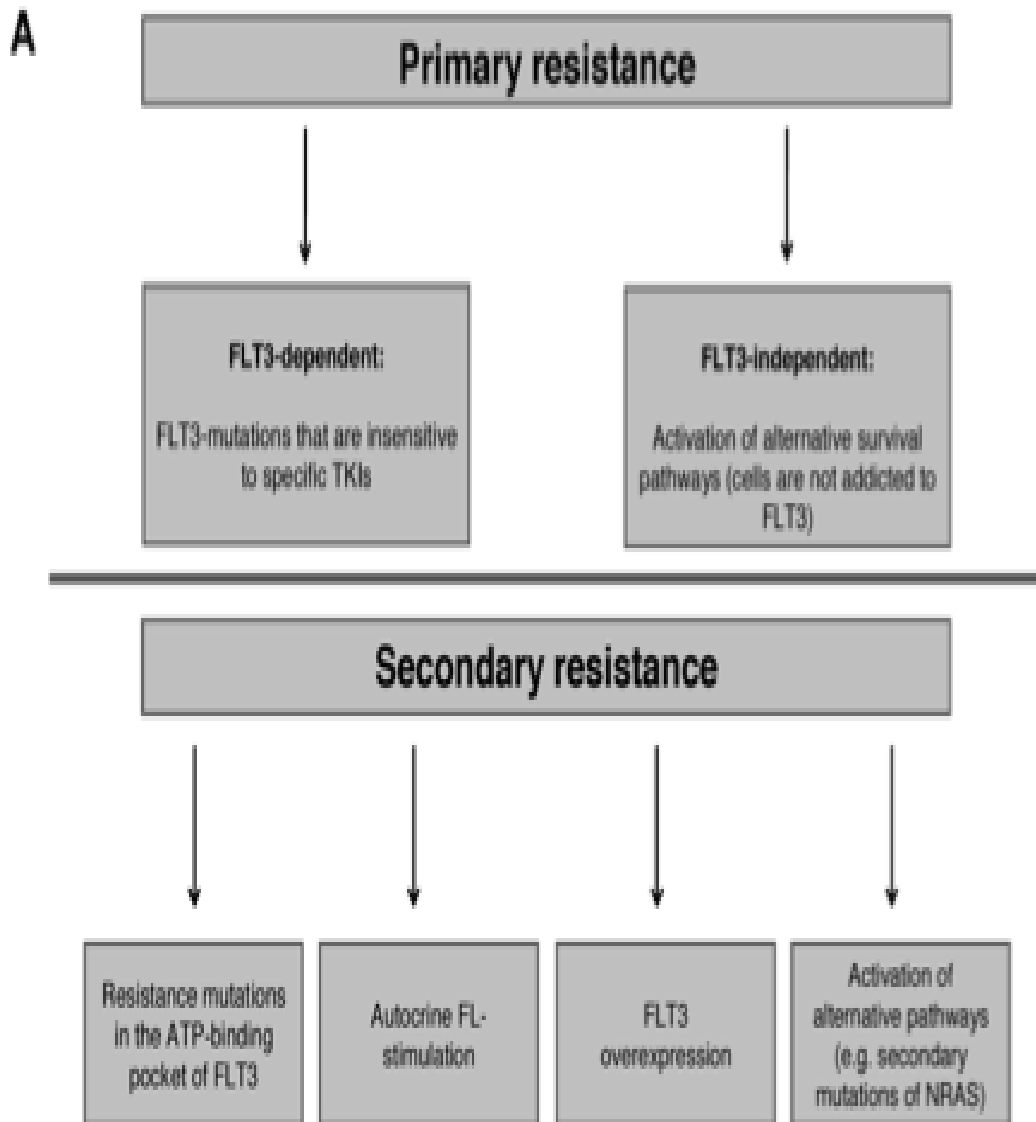


Figura 20. Mecanismos moleculares de la resistencia intrínseca a FLT3-TKI. Descripción general: resistencia FLT3-TKI de FLT3-mutado en LMA se clasifican en la resistencia primaria, que se debe a las características biológicas específicas de la enfermedad, y en la resistencia secundaria, que se produce en segundo lugar después de la exposición a TKI. Figura tomada y modificada de FLT3 as a therapeutic target in AML: still challenging after all these years; Thomas Kindler, Daniel B. Lipka and Thomas Fischer; 2010 116: 5089-5102; Prepublished online August 12, 2010; doi:10.1182/blood-2010-04-261867.

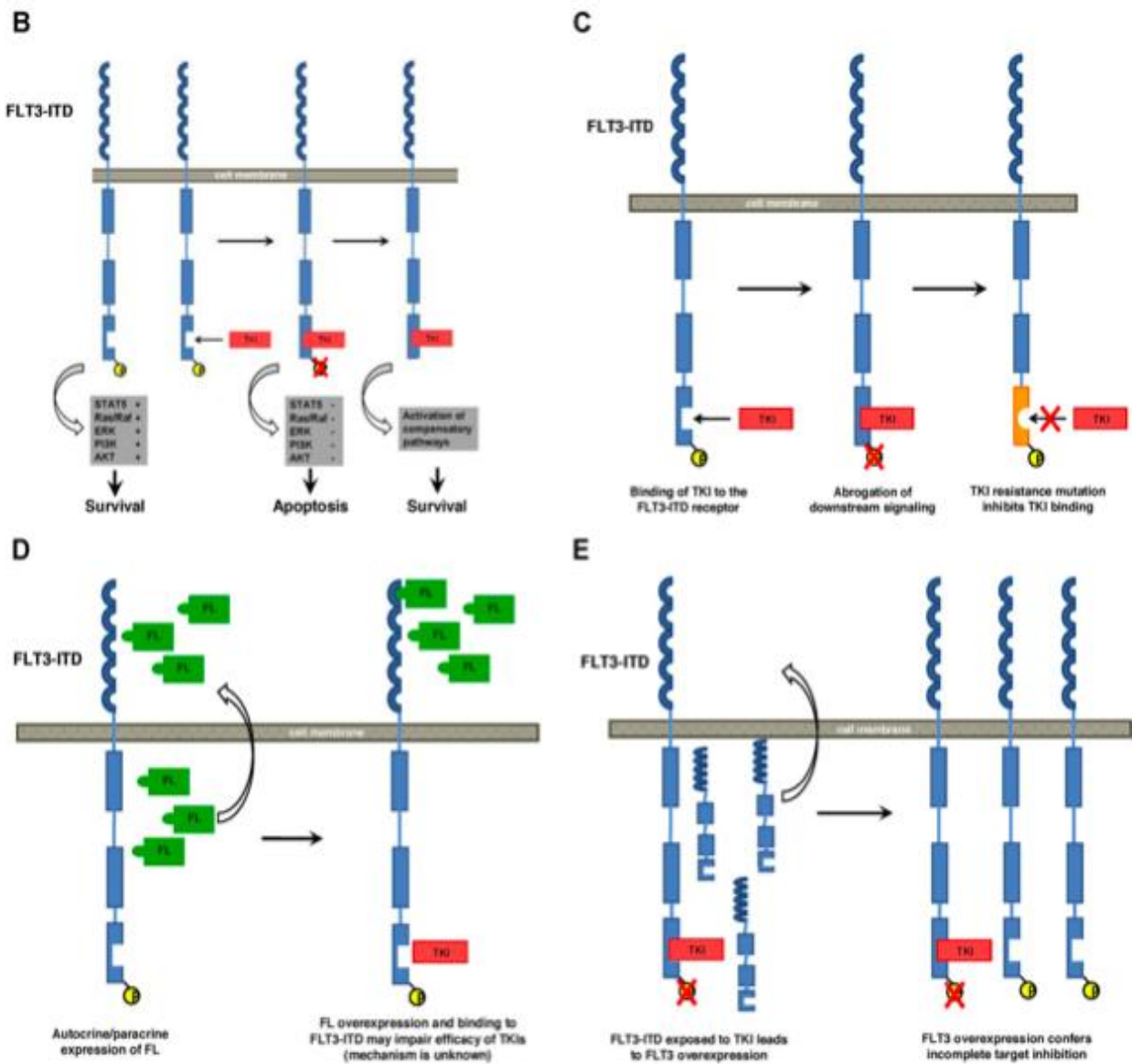


Figura 21. Mecanismos moleculares de la resistencia intrínseca a FLT3-TKI. Descripción general: resistencia FLT3-TKI de FLT3-mutado en LMA se clasifican en la resistencia primaria, que es debido a las características biológicas específicas de la enfermedad, y en la resistencia secundaria, que se produce en segundo lugar después de la exposición a TKI. Figura tomada y modificada de FLT3 as a therapeutic target in AML: still challenging after all these years; Thomas Kindler, Daniel B. Lipka and Thomas Fischer; 2010 116: 5089-5102; Prepublished online August 12, 2010; doi:10.1182/blood-2010-04-261867.

b) Resistencia secundaria.

La mayoría de los pacientes tratados con un solo agente de TKIs -FLT3 experimentaron una respuesta parcial y transitoria que dura sólo unas pocas semanas. Para varios compuestos estudios de farmacocinética y farmacodinamia, revelaron bioactividad pobre, debido a la insuficiencia de los niveles de fármaco en plasma, vida media corta en plasma, o metabolización hepática.

Estos resultados probablemente se correlacionan con la inhibición incompleta o transitoria de la autofosforilación de FLT3 seguido por deteriorados efectos citotóxicos como se observa en los estudios de laboratorio correlativos.³⁴⁸

La citotoxicidad insuficiente resulta en la eliminación incompleta del clon maligno es probablemente un requisito previo para el desarrollo de resistencia secundaria a los medicamentos. Un importante mecanismo de resistencia TKI es causada por la adquisición de alteraciones genéticas específicas dentro de la diana quinasa. Estas mutaciones pueden interferir con la unión de TKI al receptor FLT3 similar al descrito para la resistencia a imatinib-mesilato el LMC (Fig.21C).³⁴⁹

En efecto, una pantalla *in vitro* diseñada para detectar mutaciones en la adenosina trifosfato, en el sitio de unión de FLT3 se identificaron 4 mutaciones que confieren resistencia a midostaurina, SU5614, y K 252 (similar a la CEP-701).³⁵⁰

Curiosamente, una de estas mutaciones se detectó en un paciente en el momento de la recaída clínica, mientras la monoterapia con midostaurina y se identificó como la única causa de la resistencia a midostaurin.³⁵¹

Recientemente, el perfil de mutaciones de resistencia al tratamiento con sorafenib, midostaurina, y SU5614 sesiguen investigando. En contraste con la situación utilizando diferentes inhibidores de BCR-ABL, diversos TKIs-FLT3 generan un perfil distinto de la resistencia, que no se superponen molecularmente. Estos datos proporcionan una base para estrategias de tratamiento secuencial y/o combinatorio de TKIs-FLT3 en terapia de primera línea.³⁵²

La estimulación autocrina de FL también ha sido identificada como un mecanismo de resistencia potencial (Fig.21D). El tratamiento a largo plazo con el TKI -FLT3 ABT-869 representa, células resistentes a varios TKIs-FLT3.³⁵³

No fueron detectadas mutaciones dentro del TKD-FLT3 o regulación de la expresión de FLT3 fosforilada.

Sin embargo, el análisis de la expresión génica reveló un aumento en la expresión de FL acompañada por la activación constitutiva de STAT3 y posterior regulación de la survivina, proteína anti-apoptótica. shRNA mediada por la caída de survivina o tratamiento con un anticuerpo neutralizante FL-derogó el fenotipo de resistencia.³⁵⁴

Los datos *in vitro* sugieren la amplificación de la FLT3-locus en el cromosoma 13 y la sobre-expresión de la proteína FLT3-ITD como mecanismos adicionales posibles para la resistencia secundaria TKI -FLT3 (Figura 21E).³⁵⁵

En los ensayos clínicos, se ha demostrado que el tratamiento TKI-FLT3 y la quimioterapia mielosupresora puede inducir un aumento en la expresión de FL y/o expresión de la superficie celular de FLT3.³⁵⁵

Un mecanismo alternativo de la resistencia es la activación de vías de compensación de representación de FLT3 mutados en células independientes de la señalización de FLT3. En un esfuerzo para recapitular la exposición prolongada a TKIs-FLT3 *in vivo*, se trataron células MOLM14 con dosis crecientes de lestaurtinib durante varios meses.³⁴³

El análisis de las vías descendentes mostraron una activación constitutiva de AKT y ERK en líneas celulares resistentes a pesar que se observó la inhibición completa de la autofosforilación de FLT3. Una característica común de la resistencia FLT3-TKI es la desregulación y / o sobre-expresión de proteínas anti-apoptóticas. Como se señaló anteriormente, las proteínas anti-apoptóticas MCL1 y survivin se encontraron hasta reguladas en resistentes a las células de LMA.^{345,353}

Además, MCL1 está regulado en células madre leucémicas FLT3-ITD.³⁵⁶ Por último, la proteína de células β 2 linfoma han demostrado ser reguladas en FLT3 líneas celulares que expresan y blastocitos de la LMA primarias resistentes a TKIs.³⁵⁷

En conclusión, apuntando a la apoptosis relacionada con las proteínas de señalización en combinación con FLT3-TKIs puede proporcionar una opción interesante para la leucemia resistente.³⁵⁷

Es de destacar que la inhibición de las vías AKT y MAPK de sensibilidad parcialmente restauradas a FLT3-TKIs en líneas celulares muestran activación independiente FLT3. Una característica común de resistencia TKI -FLT3 es la desregulación y / o sobre-expresión de proteínas anti-apoptóticas. Además, MCL1 está regulado en células madre leucémicas FLT3-ITD⁺.³⁵⁶

Por último, la proteína de células B en linfoma 2 han demostrado ser reguladas hasta en líneas celulares que expresan FLT3 y blastocitos primarios de la LMA resistentes a TKIs. En conclusión, apuntando a la apoptosis relacionada con las proteínas de señalización en combinación con FLT3-TKIs puede proporcionar una opción interesante para la leucemia resistente.³⁵⁷

16.3 Lecciones aprendidas de ensayos clínicos FLT3-TKI

Hasta ahora, 6 FLT3 TKIs orales, incluyendo midostaurin, lestaurtinib, sorafenib, sunitinib, tandutinib y KW- 2449, el compuesto SU5416 intravenoso, y la segunda generación de FLT3-TKI AC220 se han investigado como monoterapia en ensayos clínicos.

El estudio del análisis clínico de un solo agente FLT3-TKI permite extraer varias conclusiones importantes con respecto al estado de mutación del FLT3, PK / PD y la predicción de la respuesta:

1.- Los blastocitos de diferentes pacientes muestran un alto grado de heterogeneidad en la respuesta de fármaco independientemente del estado de la mutación FLT3 como se demuestra mediante ensayos de citotoxicidad *in vitro*. Alta expresión de FLT3 y la estimulación paracrina / autocrina puede hacer blastos FLT3-wt dependientes de la señalización de FLT3 y susceptibles a la terapia FLT3-TKI.³⁵⁸

Sin embargo, la actividad clínica en pacientes con FLT3 nativo, se ve claramente con menos frecuencia, en comparación con pacientes que albergan mutaciones de FLT3. Es de destacar que algunos pacientes FLT3-ITD no mostraron respuesta a la terapia de TKI de FLT3, aunque se observó la inhibición casi completa de la autofosforilación FLT3 *in vitro* e *in vivo*.

Así, la activación de las vías de compensación pueden hacer a las células independientes de señalización FLT3. Por lo tanto, algunos pacientes no se beneficiarán del tratamiento FLT3-TKI debido a resistencia primaria inherente.³¹⁷

2.- Las respuestas citotóxicas de dosis en pacientes con LMA reflejan estrechamente la inhibición de la fosforilación de la tirosina de FLT3. En estudios de laboratorio correlativos, la baja regulación de la autofosforilación de FLT3 a menos del 20% de los niveles basales era necesario para lograr una respuesta citotóxica in vivo.^{317,321}

Además, la citotoxicidad depende de la inhibición sostenida de la fosforilación de tirosina de FLT3, si la inhibición no es duradera resulta en la supervivencia de los blastocitos leucémicos.³³³

3.- Un requisito previo son suficientes niveles plasmáticos del fármaco para lograr la inhibición de la autofosforilación de FLT3 y la inducción de la muerte celular. En estudios *in vitro* de plasma de la actividad del inhibidor demostraron que la concentración de fármaco en el plasma necesita alcanzar niveles de 1-2 a órdenes de magnitud mayor que los valores obtenidos a partir de experimentos de cultivo celular para conferir la inhibición de la autofosforilación FLT3 y el crecimiento celular.³⁴⁵⁻³⁵³

Este efecto es probablemente debido a la capacidad de la alta unión a proteínas de TKIs con una variabilidad potencialmente amplia en niveles libres de fármaco activo. La acumulación de metabolitos activos e inactivos resaltan aún más la complejidad de esta cuestión. Por ejemplo, midostaurin se metaboliza en el hígado por el citocromo P450 a 2 metabolitos principales, CGP62221 y CGP52421.

Estudios de farmacocinética demostraron un aumento de las concentraciones mínimas de midostaurin y su metabolito activo CGP62221 con concentraciones pico en los días 3 y 8, respectivamente.³¹⁷ Durante un seguimiento posterior, se observó una disminución de 2 a 4 veces alcanzando niveles de estado estacionario en el día 28.

Cabe destacar que, aunque CGP52421 es 22 veces menos potente que el compuesto padre, es menor su unión a proteínas, y alcanza niveles de estado estacionario entre 20-30 μM , 3 veces mayor que la IC_{50} requerida para la supresión de la autofosforilación de FLT3.

Por consiguiente, en ensayos de citotoxicidad *in vitro* parece ser poco fiable como un marcador sustituto *in vivo* de efecto/actividad de FLT3-TKI, y el uso de ensayos de plasma inhibitorios pueden servir como una alternativa más adecuada.

4.- La calidad de la respuesta clínica en general fue menor. La mayoría de los pacientes que respondieron experimentaron mejora hematológica sólo con una disminución de blastocitos en sangre periférica y una disminución menos pronunciada en los blastos de médula ósea. Además, las respuestas fueron transitorias sólo duran de unas pocas semanas a meses. Las posibles explicaciones para la eficacia relativamente pobre incluyen las mencionadas propiedades de los compuestos farmacocinéticos/ farmacodinámicos o resistencia inherente en algunos pacientes.³²³

Sin embargo, en algunos pacientes, se observó remisión completa o parcial con insuficiente recuperación hematológica. Por ejemplo, 2 pacientes con FLT3-ITD⁺ con LMA tratados con sorafenib en un programa de uso compasivo experimentaron una remisión completa duradera.³²³

Ambos pacientes habían recibido varios ciclos de quimioterapia y finalmente recayeron en el trasplante alogénico de células madre. Esta experiencia sugiere que la evolución clonal de blastos leucémicos FLT3 altamente dependientes, finalmente, pueden producir una respuesta.³²³

Tres de 6 pacientes FLT3-ITD⁺ tratados con AC220 en el MTD de 200 mg/día también experimentaron un CR³³⁵. Ambos, sorafenib y AC220 han demostrado ser FLT3 TKIs altamente selectivos dotados de características farmacocinéticas/farmacodinámicas beneficiosas, así probablemente mantienen la inducción y la inhibición completa de la fosforilación de tirosina de FLT3 en los blastos leucémicos adictos a la señalización FLT3.^{324,334}

De acuerdo con estas observaciones, se ha demostrado recientemente en estudios *in vitro* que pacientes recaídos/resistentes con LMA y pacientes con alta carga alélica mutante son más propensos a responder a la terapia selectiva FLT3-TKI.³²⁴

5.- El potencial terapéutico de la utilización de FLT3 como una diana molecular todavía no está claramente definido. Es probable que dependan de un mayor refinamiento de las propiedades intrínsecas de los inhibidores de FLT3 y en la definición de combinaciones asociadas útiles y algoritmos terapéuticos.³²⁴

17. INHIBIDORES MOLECULARES PEQUEÑOS COMO OPCIONES TERAPÉUTICAS

La vía de FLT3 es un objetivo para los inhibidores de tirosina cinasa (TKI), como las mutaciones de FLT3 que es una de las mutaciones más comunes en LMA y constitutivamente activa el receptor cinasa.^{344,359}

Dado que la sobre expresión de FLT3-WT y la expresión de las mutaciones de FLT3 se han implicado en la leucemogénesis, inhibidores moléculares pequeños que bloquean la activación constitutiva del receptor mutado e incluso del receptor de tipo nativo pueden tener implicaciones terapéuticas.³⁵⁹

Estudios iniciales *in vitro* usando TKIs inespecíficos como la herbimicina A, AG1296 y AG1295 se ha encontrado que estos medicamentos bloquean la activación constitutiva de FLT3/DITs y las células muertas albergan preferentemente FLT3 / DTI.³⁶⁰⁻³⁶¹

Se han identificado numerosos compuestos potenciales como MLN518, PKC412, SU5416, SU5614 , SU11248, CEP-701 y CEP-5214, que también bloquean la activación FLT3.³⁶¹

Dos compuestos (CEP-701 y PKC-412) han demostrado alguna promesa terapéutica para pacientes con LMA con mutaciones FLT3. CEP-701 (lestaurtinib) es un compuesto indolocarbazol que inhibe la autofosforilación de FLT3 y receptores mutantes de FLT3^{362,363} con alta selectividad contra FLT3 en comparación con otros RTK tales como KIT, FMS, y PDGF.³⁶²

Una prueba de fase I/II evaluó como único agente CEP-701 en pacientes con LMA refractaria, recaída o bajo riesgo que expresa mutaciones activadoras de FLT3.^{364,365}

Cinco de catorce pacientes con LMA con mutaciones FLT3 lograron una respuesta clínica objetiva con CEP-701, aunque no se observaron CRs.^{364,365}

También se ha demostrado que CEP-701 se une altamente a proteínas plasmáticas y la falta de inhibición de FLT3 en algunos casos puede ser debido a la falta de viabilidad del medicamento.^{366,367}

En la evaluación de la eficacia *in vitro* de CEP-701 en FLT3/DIT, han demostrado que CEP-701 en combinación con quimioterapia mató líneas de células que albergan una FLT3/DITs de forma sinérgica, lo que sugiere un posible beneficio terapéutico para la adición de CEP-701 con quimioterapia.³⁶⁷

Posteriormente, se evaluó la eficacia de la combinación de CEP-701 con la quimioterapia convencional. Un total de 48 pacientes con LMA con mutaciones FLT3 fueron aleatorizados a recibir quimioterapia estándar o la quimioterapia estándar con CEP-701 durante la primera recaída. De los 24 pacientes que recibieron CEP-701, 5 lograron remisión completa y otros 5 obtuvieron una remisión parcial con la recuperación del recuento incompleto.³⁶⁷

Para aquellos pacientes que recibieron sólo quimioterapia estándar, 3 alcanzaron la remisión completa y 3 obtuvieron CR con la recuperación del recuento incompleto. CEP-701 también está siendo evaluado en un ensayo de fase III para su eficacia de *novo* en LMA con mutaciones FLT3 en MRC 15, donde los pacientes con mutaciones FLT3 son asignados al azar a la quimioterapia estándar con o sin CEP-701.³⁶⁸

PKC412 (midostaurin) es un benzoilestaurosporina, que fue desarrollado inicialmente como un inhibidor del receptor de VEGF, pero también inhibe la quinasa del receptor FLT3. Un ensayo de fase II examinó PKC412 en monoterapia como único agente en 20 pacientes con LMA de alto riesgo con FLT3/DITs. Aunque 6 pacientes mostraron respuesta objetiva, de nuevo no se observaron remisiones completas³⁶⁹

18. PROMESAS Y DESAFÍOS PARA LA INHIBICIÓN DEL FLT3 EN LA LMA

FLT3 es una prometedora diana molecular para el tratamiento de la LMA. Sin embargo, el entusiasmo debe ser atenuado por varias consideraciones.

En primer lugar, como se señaló anteriormente, es probable que, como para la LMC crisis blástica, la LMA asociada con la activación de mutaciones del gen FLT3 tendrá mutaciones adicionales que pueden no ser sensibles a la inhibición.

Se podría esperar una tasa de respuesta a la inhibición de FLT3 en la LMA comparable a la de mesilato de imatinib en LMC crisis blástica de aproximadamente 30%. Es probable que los agentes adicionales sean necesarios para una terapia eficaz de LMA.²⁸⁷

En segundo lugar, del 70% al 100% de LMA y la mayoría de casos LLA sobreexpresan FLT3, pero sólo una fracción de éstos tienen activación de mutaciones. Todavía no se sabe qué efecto podría tener la inhibición de FLT3 en la LMA asociado con la sobreexpresión del alelo FLT3 de tipo nativo.²⁸⁸

En tercer lugar, ninguno de los inhibidores que están siendo investigados en la actualidad son verdaderamente específicos para FLT3. Aunque estos agentes son selectivos, que también se dirigen a otras cinasas, incluyendo PDGFR, c-FMS, SYK, c-KIT, VEGFR, y PKC por nombrar algunos. Los efectos tóxicos de estos medicamentos tendrán que ser evaluados cuidadosamente.²⁸⁷

Sin embargo, como ha sido sugerido para el mesilato de imatinib, los blancos adicionales en algunos casos pueden resultar beneficiosos. Así, aunque un número de diferentes inhibidores se pueden encontrar para inhibir eficazmente FLT3 *in vivo*, la eficacia terapéutica puede variar considerablemente dependiendo de los otros blancos u objetivos.²⁸⁷

En cuarto lugar, aunque la mayoría de los datos indican que los inhibidores de FLT3 van dirigidos al sitio de unión a ATP, se inhibirán todos los alelos de FLT3-ITD, será importante para evaluar los efectos sobre todos los alelos, y para determinar si existen diferencias en las propiedades biológicas o de respuesta a la terapia para diferentes alelos ITD. Además, no todos los inhibidores son eficaces en mutaciones de activación de bucle. Se sabe que el mesilato de imatinib, por ejemplo, es muy eficaz en la inhibición de BCR/ABL, y las mutaciones de delección yuxtamembranal en c-KIT asociado con tumores gastrointestinales de células estromales.²⁸⁹

Sin embargo, el mesilato de imatinib tiene una actividad mínima para la mutación más común de activación de c-KIT en la LMA, Asp816Tyr. De manera similar, no todos los inhibidores de FLT3 bajo evaluación tienen actividad contra las mutaciones FLT3 Asp835Tyr, y todavía no se conoce que compuestos son activos para otras mutaciones de sustitución Asp835.^{279,289}

Por último, se puede esperar casi con seguridad que se desarrolle resistencia a los inhibidores FLT3, como se ha observado con la terapia de STI571 LMC crisis blástica.

En algunos casos, la resistencia puede ser debido a una mejor degradación o exportación celular del fármaco, pero también es claro que las mutaciones puntuales cerca del sitio de unión a ATP también pueden afectar la resistencia.²⁸⁹ Será importante para anticipar este problema caracterizar los mecanismos moleculares de resistencia a cada inhibidor.⁹⁰

Este enfoque puede permitir la selección de combinaciones de inhibidores de FLT3 que impiden el desarrollo de resistencia, análogo al uso de combinaciones de inhibidores de la transcripción inversa en el tratamiento de la infección por VIH.⁹⁰

En este sentido, la conclusión de ensayos clínicos para identificar eficacia y no toxicidad de inhibidores de FLT3, entre los muchos que se encuentran actualmente en proceso de evaluación, pueden proporcionar uno o más agentes activos que podrían ser utilizados en combinación.⁹⁰

En resumen, FLT3 es un objetivo importante para el tratamiento de la LMA. Aunque hay problemas en la aplicación de inhibidores de FLT3 en la LMA, no hay promesa de que estas nuevas terapias mejorarán los resultados sin aumentar la toxicidad en el tratamiento de la LMA.⁹⁰

También es verosímil que habrá eficacia mejorada en el uso de terapias molecularmente dirigidas tanto para las mutaciones clase I y clase II.⁹⁰

Por ejemplo, fármacos que inhiben FLT3 pueden ser muy eficaces en combinación con ATRA para el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda (LPA) asociado con el reordenamiento del gen PML / RARA, un enfoque que está siendo probado en modelos murinos.³⁷¹

La inhibición de FLT3 también podría ser utilizada como tratamiento de mantenimiento después del trasplante alogénico, como se hace comúnmente con inhibidores de BCR-ABL,³⁷² a la luz particularmente de la creciente evidencia anecdótica de la actividad en este entorno. Por último, se podría considerar a la focalización FL con anticuerpos monoclonales.³⁷³

Obviamente, sería mucho más preferible evitar el trasplante alogénico, por sus riesgos concomitantes a corto y largo plazo de la morbilidad y la mortalidad, tratando de curar a los pacientes con una combinación de quimioterapia y la inhibición de FLT3.⁶⁴

Se han dado grandes pasos en el mejoramiento de la supervivencia de los pacientes con LMA en los últimos decenios. Se ha reconocido cada vez más que la LMA no es una sola enfermedad, y las mejoras en la supervivencia se han producido como resultado de adaptar la terapia de acuerdo con las características moleculares de la enfermedad.⁶⁷

En este caso, puede ser necesario adaptar la terapia para tratar de tener en cuenta la ley de consecuencias no deseadas. Incluso la historia médica reciente está llena de ejemplos de que las mejores intenciones se tuercen: terapia de estrógeno que previene la osteoporosis, pero las causas: cáncer de mama,⁶⁸ la terapia de eritropoyetina que disminuye los requerimientos de transfusión, pero mata a los pacientes con eventos

cardiovasculares y tromboembólicos,⁶⁹ y el control intensivo de glucosa en la sangre que resulta en muertes por hipoglucemia.⁷⁰ Más no es siempre mejor, y esto bien puede aplicarse a la quimioterapia y la LMA FLT3/ITD.

19. FUTURAS DIRECCIONES

Una característica distintiva de la transducción de señales oncogénicas es la activación simultánea de varias vías de supervivencia. En los blastocitos primarios de la LMA y líneas celulares, se ha observado la activación redundante de la PI3K/AKT, MAPK, y JAK / STAT.³⁷⁴ Estas vías son activadas por cinasas de receptores mutados corriente arriba, la activación cruzada entre estas vías o mecanismos autocrinos / paracrinos. Como se mencionó anteriormente, el tratamiento con FLT3-TKI de blastos primarios de LMA provoca una inhibición sustancial de FLT3, pero en algunas muestras sólo una supresión incompleta de la vía descendente.³²¹

Por lo tanto, focalizando blastos leucémicos en múltiples niveles se puede además suprimir la fosforilación de proteínas por debajo de un umbral necesario para inducir la muerte celular apoptótica.

20. FLT3 Y CÉLULAS INICIADORAS DE LEUCEMIA

El concepto de las células madre leucémicas o células iniciadoras de leucemia (LICs) fue desarrollado por John Dick hace varias décadas. En elegantes estudios de xenotrasplante, su grupo demostró que sólo un subconjunto menor de blastos leucémicos muestran la capacidad de auto-renovación y son capaces de propagar la leucemia en los receptores irradiados.³⁷⁵

Las células transplantadas tenían la capacidad de diferenciarse y copió el fenotipo inicial de la enfermedad. Estos datos indican que las CMH (células madre hematopoyéticas) y LICs comparten muchas características, incluyendo fenotipo, la actividad de auto-renovación y la resistencia a medicamentos mejorada.

Es razonable suponer que para la cura de pacientes con LMA, la erradicación de la iniciación y mantenimiento de las células leucémicas sin afectar su contraparte normal es un requisito previo.³⁷⁶

Sin embargo, el impacto del FLT3 de tipo nativo y mutado en la supervivencia y mantenimiento LIC, así como la cuestión de si FLT3-TKIs ataca LIC y contribuye a la erradicación de LICs sigue siendo difícil de alcanzar. Existe cierta evidencia de que las mutaciones FLT3-ITD juegan un papel esencial en la función LIC. La expresión forzada de FLT3-ITD en células de la sangre del cordón CD34⁺ en humanos confieren persistentes propiedades FLT3 dependientes de la autorrenovación *in vitro*.³⁷⁷

Por otra parte, FLT3-ITD, CD34⁺ HSCs humanos transducidos han demostrado un aumento potencial de la supervivencia, proliferación aumentada, y la expansión de la población CD34⁺/CD38.³⁷⁸

Es importante destacar que, en estos estudios, FLT3 se expresa bajo el control de promotores exógenos que causan niveles no fisiológicos de expresión y por lo tanto pueden alterar la función "normal" inducida de FLT3-ITD.³⁷⁸

En efecto, los datos derivados de las muestras primarias de pacientes proporcionan resultados más heterogéneos. Por ejemplo, en varios estudios de análisis clínicos, las muestras de pacientes emparejados en el diagnóstico y la recaída han informado (i) la mutación identificada originalmente ITD o TKD se perdió en algunos casos³⁷⁹⁻³⁸⁰, (ii) un nuevo FLT3-ITD se detectó en la recaída³⁷⁹, y (iii) las mutaciones FLT3-ITD y TKD surgió en pacientes previamente considerados como FLT3 de tipo salvaje al momento del diagnóstico.³⁸¹⁻³⁸²

Estos datos indican que las mutaciones de FLT3 son eventos inestables y tardíos de la leucemia, y la orientación de estas células pueden eliminar un subclón, pero no la LIC. Sin embargo, la mayoría de los pacientes (88%) mantuvieron la mutación original detectada de FLT3 en la recaída como lo revela una evaluación combinada de 6 estudios.³⁸³

Es de destacar que la relación mutante-tipo nativo aumentó en la recaída en la mayoría de los casos con algunos pacientes en los que precede un estado homocigoto, lo que sugiere la evolución del apego al oncogén.^{385,382}

Analizaron FLT3 en relación mutante tipo salvaje con células madre enriquecidas con CD34⁺ / CD38⁻ células en comparación con los blastos no clasificados de LMA. No se detectó diferencia en los niveles de expresión FLT3-ITD, lo que sugiere que la mutación está presente en la población madre / progenitoras.³⁸⁴

Además, la población CD34⁺ / CD38⁻ fue capaz de conferir una leucemia en ratones NOD / SCID modelo de ratón, mientras que el tratamiento con lestaurtinib inhibió significativamente el injerto leucémico pero no la de CHM normales.³⁸⁵

En resumen, en algunos casos, las mutaciones de FLT3 parecen representar un éxito temprano durante la transformación maligna y contribuyen de manera significativa a la supervivencia y proliferación de blastos leucémicos.³⁸⁵

21 FLT3 y microambiente

Una observación consistente en todos los ensayos clínicos que prueban FLT3-TKIs como agentes únicos fue la rápida eliminación de los blastos en sangre periférica sobre blastos en médula ósea en pacientes con respuesta.³⁸⁶

En estudios in vitro, la adición exógena de FL disminuye significativamente los efectos citotóxicos de varios TKIs- FLT3.³⁸⁷

Por lo tanto, la expresión de FL en torno a las células de estroma pueden mejorar la señalización a través de FLT3 de tipo nativo o mutado y contrarrestar los efectos inhibitorios.³⁸⁷

Alternativamente, otras citocinas y factores de crecimiento, tales como el factor de células madre, IL-3, o trombopoyetina, abundantemente presentes en el BM, pueden compensar la pérdida de la activación constitutiva de FLT3 y hacer blastos FLT3 mutados independientes de la señalización FLT3.³⁸⁷

Recientemente, el nicho, como las condiciones han demostrado completar la derogación FLT3-TKI muerte celular inducida, mientras que la inhibición de las vías descendentes que comparten como PI3K y MAPK disminuyo notablemente la supervivencia de células en este contexto.³⁸⁸

Además de citocinas y factores de crecimiento, componentes de la matriz extracelular y moléculas de adhesión celular se ha demostrado que confieren la adhesión celular mediada por resistencia a los fármacos (CAM-DR).³⁸⁹

El bloqueo de la interacción de la fibronectina al antígeno muy tardío 4 usando FNIII14, un péptido derivado de la fibronectina, restaura la sensibilidad a la citarabina en líneas de células leucémicas.³⁹⁰(Fig.22).

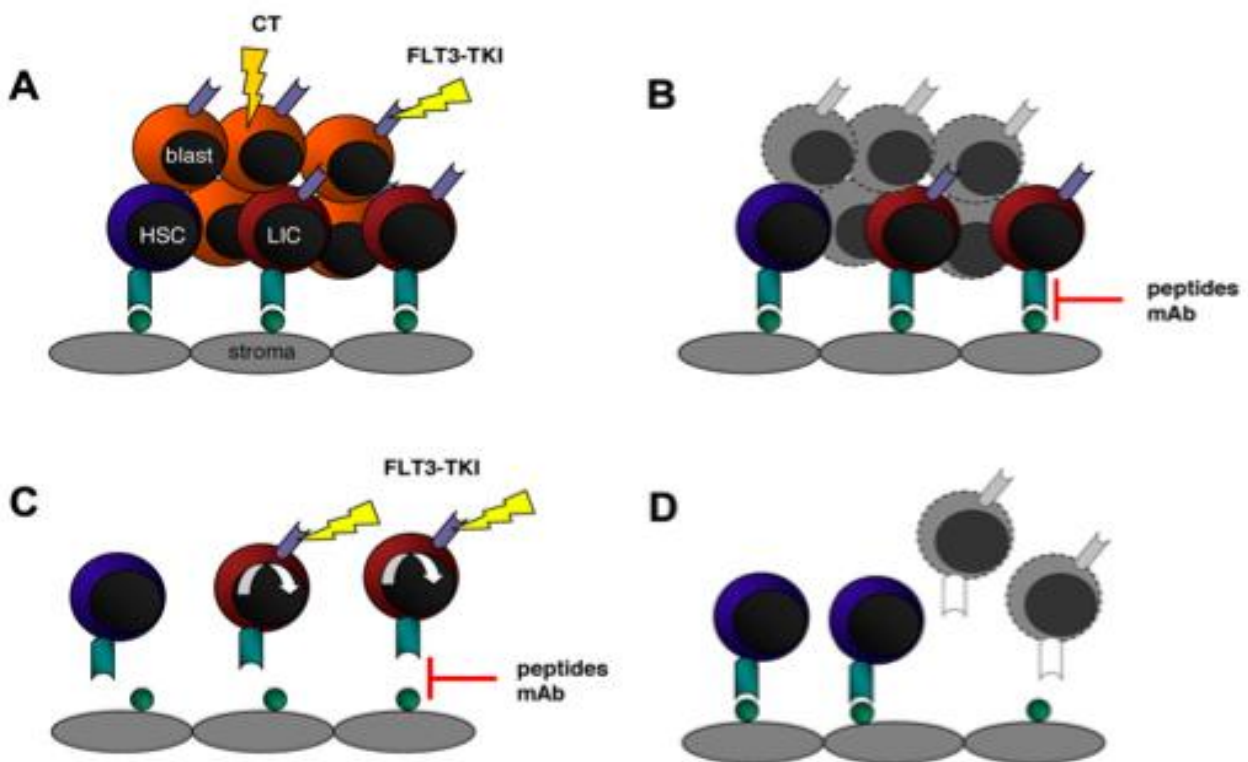


Figura 22. Focalización de la interacción LIC-estroma en combinación con FLT3-TKI. (A) El tratamiento de los blastos leucémicos con quimioterapia (QT) o FLT3-TKI mata células cíclicas en PB y BM mientras que las LICs y HSCs se incrustan en su nicho y son protegidos contra la muerte celular por apoptosis. (B) Focalización de la interacción célula estromal-LIC usando anticuerpos neutralizantes o péptidos pequeños interrumpe señales mediadas por la supervivencia en el estroma y comunicación de LIC, y también con CMHs de su entorno. (C) En consecuencia, FLT3-ITD que expresan LICs entran en el ciclo celular y se vuelven sensibles a FLT3-TKI, mientras que las CMH normales están a salvo. (D) Por último, las CMHs se adhieren a las células del estroma de nuevo e inician la reconstitución hematopoyética. Figura tomada y modificada de FLT3 as a therapeutic target in AML: still challenging after all these years; Thomas Kindler, Daniel B. Lipka and Thomas Fischer; 2010 116: 5089-5102; Prepublished online August 12, 2010; doi:10.1182/blood-2010-04-261867.

Se ha demostrado que la quimiocina factor alfa 1 derivado del y su receptor afin CXCR4 actúan como mediadores críticos en las interacciones estromales con células leucémicas. CXCR4 está involucrada en la migración, recaída, y el injerto de células de LMA al BM de ratones NOD/SCID.^{391,392}

Curiosamente, la expresión CXCR4 demostró ser significativamente mayor en LMA FLT3-ITD⁺ que en muestras de LMA con FLT3 de tipo nativo.³⁹³ Recientemente, la PIM1 serina-/treonina-cinasa se encontró que era esencial para la expresión en la superficie de CXCR4 y procesar el receptor intracelular.³⁹⁴

Como PIM1 es altamente expresado en células de LMA en FLT3-ITD⁺, PIM1 parece actuar como un regulador central de FLT3-ITD inducida por la expresión CXCR4. De hecho, el bloqueo de CXCR4 usando pequeñas moléculas inhibitoras causan la movilización de los blastos leucémicos BM-residentes y sinergizan con agentes quimioterapéuticos convencionales.³⁹⁵⁻³⁹⁶

AMD3465, un inhibidor de segunda generación de CXCR4, inhibe la fosforilación de CXCR4 y suprime la activación de las vías de señalización prosupervivencia mediada estromalmente.³⁹⁶

Sobre la base de estos alentadores datos *in vitro* e *in vivo*, una fase de ensayo clínico 1 probó la combinación del inhibidor de CXCR4 plerixafor más el factor estimulante de colonias de granulocitos. granulocitos además del inhibidor de la tirosina cinasa sorafenib (NCT00943943).³⁹⁶

Como la mayoría de TKIs-FLT3 han demostrado ser menos potentes en la inhibición de FLT3 de tipo nativo tal como se expresa en las CMH normales, la orientación CXCR4 en combinación con FLT3-TKI puede selectivamente erradicar blastos malignos FLT3 mutados sin afectar a sus homólogos normales (Fig.22).

22. CONCLUSIONES

Las investigaciones generadas en las últimas décadas han logrado un importante avance en el conocimiento de la fisiopatología de LMA y se han producido grandes cambios tanto a nivel diagnóstico como terapéutico.

Todo ello ha contribuido a la identificación de múltiples factores pronóstico que han permitido individualizar la intensidad de los tratamientos en función del riesgo de cada paciente. A pesar de esto la supervivencia libre de enfermedad a 5 años es alrededor del 50% e independientemente del tratamiento el 30% de los niños con LMA, presentan recurrencia de la enfermedad.

La integración de los resultados citológicos, fenotípicos, citogenéticos y moleculares permiten definir muy bien algunos subtipos de LMA atendiendo a sus características clínico biológicas. Sin embargo el grupo más numeroso y heterogéneo de pacientes está constituido por LMA en las que en su mayoría no se detecta ninguna alteración citogenética, por lo que es necesario identificar anomalías moleculares asociadas a LMA, tales como las mutaciones internas en tandem del gen FLT3 (FLT3-ITD) y mutaciones puntuales en la zona de activación (FLT3-ALM).

Identificar mutaciones presentes en FLT3 permitirá conocer las características clínico biológicas de la enfermedad ante la presencia o ausencia de estas mutaciones en nuestro país, relacionarlo con la respuesta a la quimioterapia de inducción a remisión, los porcentajes de recaídas y a mediano plazo estratificar a los pacientes en grupos que podrían beneficiarse con el tratamiento con fármacos inhibidores de FLT3 y realizar posteriormente estudios pronóstico a pacientes mexicanos.

La detección temprana de mutaciones FLT3 se convirtió desde hace algunos años en un procedimiento estándar para el diagnóstico de pacientes con LMA en varios centros clínicos. Clínicamente, la presencia de mutaciones en FLT3 confiere un mal pronóstico en la LMA debido principalmente a un mayor riesgo de recaída de la enfermedad que resulta en una menor supervivencia, por ello cabe destacar la importancia de implementar la detección de FLT3 en nuestro país para el diagnóstico de LMA.

Los resultados de los actuales ensayos clínicos aleatorios que examinan una combinación de quimioterapia estándar con y sin FLT3-TKI en pacientes recién diagnosticados estarán disponibles dentro de los próximos años y se espera que tengan un impacto importante en esta área.

La DIT (Duplicación Interna por Tándem) es el tipo más común de mutación de FLT3, se observa en un 25-30% de las LMA del adulto y en un 12% de los niños con LMA.

El segundo tipo más frecuente de mutación involucra la zona de activación (FLT-ALM: activating loop mutations) en el dominio tirosina cinasa (TKD) de FLT3, codificada por el exón 20 y consiste fundamentalmente en mutaciones puntuales o deleciones que afectan al Aspartato o a la isoleucina de las posiciones 835 (D835) y 836 (D836).

Las características del receptor FLT3 lo convierten en un candidato muy atractivo para nuevas estrategias de tratamiento, esto ya que la intervención terapéutica común está conformada por fármacos antagonistas: moléculas pequeñas o anticuerpos monoclonales como el malato de sunitinib, que es una molécula pequeña capaz de bloquear el dominio extracelular del RTK teniendo actividad directa contra el cáncer.

He realizado esta revisión que ha sido exploratoria y descriptiva y he podido concluir que se deben de redoblar esfuerzos para poder llegar a establecer y esclarecer al 100% el funcionamiento del receptor FLT3, que en la última década ha dejado ver que es más importante de lo que parecía ya que la enfermedad con la que se asocia es la leucemia el cual es un padecimiento grave que causa la muerte de miles de personas al año en México, y es por ello que se debe de proporcionar una terapia dirigida a cada paciente, y esta debe ser individualizada y no general, dependiendo de la mutación que presente cada paciente.

Finalmente, ésta recopilación de información ha servido para la profundización y comprensión de FLT3, ya que forma parte del protocolo HIM-2014-002 "Asociación de las mutaciones en el Gen FLT3 con las características clínico biológicas en pacientes con leucemia mieloide aguda", que es un proyecto apoyado por el "Hospital Infantil de México Federico Gómez".

REFERENCIAS.

1. Pui CH, Campana D, Evans WE: Childhood acute lymphoblastic leukemia current status and future perspectives. *Lancet Oncology* 2001;2:597– 607.
2. Campana D, Janossy G: Proliferation of normal and malignant human immature lymphoid cells. *Blood* 1988;71:1201–1210.
3. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. *IARC Press: Lyon* 2001.
4. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A: Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999;341:1051–1062.
5. Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, et al: Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2002;1:75–87.
6. Andersson A, Olofsson T, Lindgren D, et al: Molecular signatures in childhood acute leukemia and their correlations to expression patterns in normal hematopoietic subpopulations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:19069–19074.
7. Spector LG, Ross JA, Robison LL, Bhatia S: Epidemiology and etiology. In Pui CH (ed): *Childhood Leukemias, 2nd ed. Cambridge, Cambridge University Press, 2006, pp 48–66.*
8. Ahlbom A, Day N, Feychting M, et al: A pooled analysis of magnetic fields and childhood leukaemia. *Br J Cancer* 2000;83:692–698.
9. Buffler PA, Kwan ML, Reynolds P, Urayama KY: Environmental and genetic risk factors for childhood leukemia: appraising the evidence. *Cancer Invest* 2005;23:60–75.
10. Horwitz M. The genetics of familial leukemia. *Leukemia* 1997; 11: 1347- 1359.
11. Langmuir PB, Aplenc R, Lange BJ: Acute myeloid leukaemia in children. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001;14:77–93.
12. Emanuel PD: Myelodysplasia and myeloproliferative disorders in childhood: an update. *Br J Haematol* 1999;105:852–863.
13. Hasle H, Niemeyer CM, Chessells JM, et al: A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. *Leukemia* 2003;17:277–282.
14. Sanz MA, Sierra J. Leucemia mieloide aguda. En Hematología. JF San Miguel, J Sierra, A Urbano-Ispizua, V Vicente, JL Vives. Eds. *Arán Ediciones, Madrid* 2003; 1007-1028.
15. Hasle H: Myelodysplastic and myeloproliferative disorders in children. *Curr Opin*

Pediatr 2007; 19:1–8.

16. Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. *A report of the French-American-British Cooperative group. Ann Intern Med* 1985; 103: 620-625.

17. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. *IARC Press: Lyon 2001.*

18. Swerdlow SH, Campo E, Lee Harris N, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. (Eds.): WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. *IARC: Lyon 2008.*

19. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al: Proposals for the classification of the acute leukaemias. *French-American-British (FAB) cooperative group. Br J Haematol* 1976;33:451–458.

20. Béné MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. European Group for the immunological classification of acute leukemias: Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia* 1995; 9: 1783- 1790.

21. Nguyen S, Leblanc T, Fenaux P, et al: A white blood cell index as the main prognostic factor in t(8;21) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 161 cases from the French AML Intergroup. *Blood* 2002;99:3517–3523.

22. Raimondi SC, Chang MN, Ravindranath Y, et al: Chromosomal abnormalities in 478 children with acute myeloid leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in a cooperative pediatric oncology group study—POG 8821. *Blood* 1999; 94:3707–3716.

23. Iwai T, Yokota S, Nakao M, et al: Internal tandem duplication of the FLT3 gene and clinical evaluation in childhood acute myeloid leukemia. The Children's Cancer and Leukemia Study Group, Japan. *Leukemia* 1999;13:3843.

24. Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, et al: Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 1999;93:3074– 3080.

25. Evans WE, Relling MV: Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics. *Nature* 2004;429:464–468.

26. Freireich EJ. Arabinosyl cytosine: A 20 year update. *J Clin Oncol* 1987; 5:523-4

27. Cassileth PA, Lynch E, Hines JD, Oken MM, Mazza JJ, Bennett JM, et al. Varying intensity of postremission therapy in acute myeloid leukemia. *Blood* 1992; 79:1924-30.

28. Gajewski JL, Ho WG, Nimer SD, Hirji KF, Gekelman L, Jacobs AD, Champlin RE.

Efficacy of intensive chemotherapy for acute myelogenous leukemia associated with a preleukemic syndrome. *J Clin Oncol* 1989; 7:1637–45.

29. Sanz GF, Mena-Duran AV, Ribera JM, Bernal T, Palomera L, del Cañizo MC et al. Autologous stem cell transplantation after FLAG-IDA chemotherapy for high-risk myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukemias secondary to MDS (sAML) does not improve outcome: A PETHEMA experience in 103 patients. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2005; 106:793.

30. Foon KA, Gale RP. Therapy of acute myelogenous leukemia. *Blood Reviews* 1992; 6:15-25.

31. Yanada M, Matsuo K, Emi N, Naoe T. Efficacy of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation depends on cytogenetic risk for acute myeloid leukemia in first disease remission: a metaanalysis. *Cancer* 2005; 103:1652– 58.

32. Stone RM, O'Donnell MR, Sekeres MA. Acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004; 98-117.

33. Kern W, Haferlach T, Schoch C, Sauerland MC, Heinecke A, Wormann B et al. *Ann Hematol* 2004; 83:S49-51.

34. Tallman MS. New agents for the treatment of acute myeloid leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2006; 19:311-20.

35. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 89:2079-88.

36. Huang ME, Ye YC, Chen SR, Chai JR, Lu JX, Zhou L et al. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1988; 72:567-72.

37. Mayers RJ, Davis RB, Schiffer CA, Berg DT, Powell BL, Schulman P, Omura GA, Moore JO, McIntyre OR, Frei E 3rd. Intensive post-remission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1994; 331: 896-903.

38. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Sierra J, Tallman MS, Löwenberg B, Bloomfield CD. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia Net. *Blood* 2010; 115; 453-474.

39. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine* 1997; 3:730-737.

40. Zon LI. Intrinsic and extrinsic control of haematopoietic stem-cell self-renewal. *Nature*

2008; 453: 306-313.

41. Terstappen LW, Safford M, Loken MR. Flow cytometric analysis of human bone marrow. III. Neutrophil maturation. *Leukemia* 1990; 4: 657-663.
42. Macedo A, Orfao A, Ciudad J, San Miguel JF. Phenotypic characterization of normal myeloid differentiation. *Blood Journal* 1994; 39: 277-282.
43. Rosenbauer F, Tenen DG. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nature reviews* 2007; 7:105-117.
44. Ravandi F, Estrov Z. Eradication of leukemia stem cells as a new goal of therapy in leukemia. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 340-344.
45. Gudgin E, Huntly B. Acute myeloid leukemia biology and leukemia stem cells. *Hematology Education: the education program for the annual congress of the European Hematology Association* 2009; 3: 17-23.
46. Zhu J, Emerson SG. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene* 2002; 21: 3295-3313.
47. Friedman AD. Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* 2007; 26: 6816-6828.
48. Rosmarin AG, Yang Z, Resendes KK. Transcriptional regulation in myelopoiesis: Hematopoietic fate choice, myeloid differentiation, and leukemogenesis. *Experimental Hematology* 2005; 33: 131-143.
49. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, Walker H, Wheatley K, Bowen DT, Burnett AK, Goldstone AH, Linch DC. The presence of a 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: 1752-1759.
50. Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, Linch DC; Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia *Blood* 2008; 11: 2776-2784.
51. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Morgan M, Benner A, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, Döhner H for the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008; 358: 1909-1918.
52. Chung KY, Morrone G, Schuringa JJ, Wong B, Dorn DC, Moore MA. Enforced

expression of an FLT3 internal tandem duplication in human CD34+ cells confers properties of self-renewal and enhanced erythropoiesis. *Blood* 2005; 105: 77-84.

53. Gilliland DG, Griffin JD: The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 2002;100: 1532–1542.

54. Kondo M, Horibe K, Takahashi Y, et al: Prognostic value of internal tandem duplication of the FLT3 gene in childhood acute myelogenous leukemia. *Med Pediatr Oncol* 1999;33:525–529.

55. Liang DC, Shih LY, Hung IJ, et al: Clinical relevance of internal tandem duplication of the FLT3 gene in childhood acute myeloid leukemia. *Cancer* 2002;94:3292–3298.

56. Rocnik JL, Okabe R, Yu JC, et al: Roles of tyrosine 589 and 591 in STAT5 activation and transformation mediated by FLT3-ITD. *Blood* 2006;108:1339–1345.

57. Brown P, Small D: FLT3 inhibitors: a paradigm for the development of targeted therapeutics for paediatric cancer. *Eur J Cancer* 2004;40:707–721

58. Fiedler W, Serve H, Dohner H, et al: A phase 1 study of SU11248 in the treatment of patients with refractory or resistant acute myeloid leukemia (AML) or not amenable to conventional therapy for the disease. *Blood* 2005;105:986–993.

59. Piloto O, Nguyen B, Huso D, et al: IMC-EB10, an anti-FLT3 monoclonal antibody, prolongs survival and reduces nonobese diabetic/severe combined immunodeficient engraftment of some acute lymphoblastic leukemia cell lines and primary leukemic samples. *Cancer Res* 2006;66:4843–4851.

60. Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002; 3: 179-198.

61. Speck NA, Gilliland DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 502-513.

62. Renneville A, Roumier C, Biggio V, Nibourel O, Boissel N, Fenaux P, Preudhomme C. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia* 2008; 22: 915-931.

63. Ishikawa Y, Kiyoi H, Tsujimura A, Miyawaki S, Miyazaki Y, Kuriyama K, Tomonaga M, Naoe T. Comprehensive analysis of cooperative gene mutations between class I and class II in de novo acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 2009; 83: 90-98.

64. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, et al. The presence of a 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;98:1752-1759.

65. Rosnet O, Matteï M, Marchetto S, Birnbaum D. Isolation and chromosomal localization of a novel FMS-like tyrosine kinase gene. *Genomics*. 1991; 2: 380-385

66. 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

67.- 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

68. Small D, Levenstein M, Kim E y col. STK-1, the human homolog of Flk2/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

69. Rosnet O, Birnbaum D. Hematopoietic receptors of class III receptor-type tyrosine kinases. *Critical Reviews in Oncology*. 1993; 4:595-613

70. 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

71. Rosnet O, Schiff C, Pebusque MJ y col. Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood*. 1993; 82: 1110-1119

72. 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)

73. 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

74. 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

75. Parcels B, Ikeda A, Simms-Waldrup T y col. FMS-like Tyrosine Kinase 3 in Normal

Hematopoiesis and Acute Myeloid Leukemia. *Stem Cells*. 2006; 24: 1174-1184

76. Lyman S, Jacobsen E. C-kit Ligand and Flt3 Ligand: Stem/Progenitor Cell Factors With Overlapping Yet Distinct Activities. *Blood*. 1998; 91: 1101-1134
77. Meshinchi S, Appelbaum F. Structural and functional Alterations of FLT3 in Acute Myeloid. *Educational of: Clinical Cancer Research*. 2009; 15: 4263-4269
78. Kottadiris D, Gale R, Linch D. FLT3 mutations and leukaemia. *British Journal of Hematology*. 2003; 122: 523-538
79. Naoe T, Kiyoi H. Normal and oncogenic FLT3. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2004; 61: 2932-2938
80. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia; D. Gary Gilliland and James D. Griffin; 2002 100: 1532-1542; *Prepublished online May 24, 2002; doi:10.1182/blood-2002-02-0492*.
81. 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.
82. Rosnet O, Schiff C, Pebusque MJ, et al. Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood*. 1993;82:1110-1119.
83. deLapeyriere O, Naquet P, Planche J, et al. Expression of Flt3 tyrosine kinase receptor gene in mouse hematopoietic and nervous tissues. *Differentiation*. 1995;58:351-359.
84. Maroc N, Rottapel R, Rosnet O, et al. Biochemical characterization and analysis of the transforming potential of the FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase. *Oncogene*. 1993;8:909-918.
85. 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.
86. Brasel K, Escobar S, Anderberg R, de Vries P, Gruss HJ, Lyman SD. Expression of the flt3 receptor and its ligand on hematopoietic cells. *Leukemia*. 1995;9:1212-1218.
87. Turner AM, Lin NL, Issarachai S, Lyman SD, Broudy VC. FLT3 receptor expression on the surface of normal and malignant human hematopoietic cells. *Blood*. 1996;88:3383-3390.
88. Rosnet O, Buhning HJ, Marchetto S, et al. Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia*. 1996;10:238-248.
89. Rasko JE, Metcalf D, Rossner MT, Begley CG, Nicola NA. The flt3/flk-2 ligand:

receptor distribution and action on murine haemopoietic cell survival and proliferation. *Leukemia*. 1995;9:2058-2066.

90. Drexler HG. Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. *Leukemia*. 1996;10:588-599.

91. Mackarehtschian K, Hardin JD, Moore KA, Boast S, Goff SP, Lemischka IR. Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity*. 1995;3:147-161.

92. Dosil M, Wang S, Lemischka IR. Mitogenic signalling and substrate specificity of the Flk2/Flt3 receptor tyrosine kinase in fibroblasts and interleukin 3-dependent hematopoietic cells. *Mol Cell Biol* 1993;13(10):6572–85. [PubMed: 7692230].

93. Lavagna-Sevenier C, Marchetto S, Birnbaum D, Rosnet O. FLT3 signaling in hematopoietic cells involves CBL, SHC and an unknown P115 as prominent tyrosine-phosphorylated substrates. *Leukemia* 1998;12(3):301–10. [PubMed: 9529123].

94. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T, Misawa S: Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996, 10:1911-1918.

95. Ray RJ, Paige CJ, Furlonger C, Lyman SD, Rottapel R. Flt3 ligand supports the differentiation of early B cell progenitors in the presence of interleukin-11 and interleukin-7. *Eur J Immunol* 1996;26 (7):1504–10. [PubMed: 8766553]

96. Rusten LS, Lyman SD, Veiby OP, Jacobsen SE. The FLT3 ligand is a direct and potent stimulator of the growth of primitive and committed human CD34+ bone marrow progenitor cells in vitro. *Blood* 1996;87(4):1317–25. [PubMed: 8608220]

97. Shah AJ, Smogorzewska EM, Hannum C, Crooks GM. Flt3 ligand induces proliferation of quiescent human bone marrow CD34+CD38– cells and maintains progenitor cells in vitro. *Blood* 1996;87(9): 3563–70. [PubMed: 8611678]

98. Veiby OP, Lyman SD, Jacobsen SE. Combined signaling through interleukin-7 receptors and flt3 but not c-kit potently and selectively promotes B-cell commitment and differentiation from uncommitted murine bone marrow progenitor cells. *Blood* 1996;88(4):1256–65. [PubMed: 8695843]

99. Namikawa R, Muench MO, de Vries JE, Roncarolo MG. The FLK2/FLT3 ligand synergizes with interleukin-7 in promoting stromal-cell-independent expansion and differentiation of human fetal pro-B cells in vitro. *Blood* 1996;87(5):1881–90. [PubMed: 8634436]

100. Mackarehtschian K, Hardin JD, Moore KA, Boast S, Goff SP, Lemischka IR. Targeted

- disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity* 1995;3(1): 147–61. [PubMed: 7621074]
- 101.** Rosnet O, Buhring HJ, Marchetto S, et al. Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia* 1996;10(2):238–48. [PubMed: 8637232]
- 102.** Armstrong SA, Kung AL, Mabon ME, et al. Inhibition of FLT3 in MLL. Validation of a therapeutic target identified by gene expression based classification. *Cancer Cell* 2003;3(2):173–83. [PubMed: 12620411]
- 103.** Ozeki K, Kiyoi H, Hirose Y, et al. Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. *Blood* 2004;103(5):1901–8. [PubMed: 14604973]
- 104.** Soheil Meshinchi and Frederick R. Appelbaum Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA. Las alteraciones estructurales y funcionales de FLT3 en la leucemia mieloide aguda. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(13): 4263–4269. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1123.
- 105.** Lyman SD, James L, Vanden Bos T, et al. Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. *Cell.* 1993;75:1157-1167.
- 106.** Hannum C, Culpepper J, Campbell D, et al. Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. *Nature.* 1994; 368:643-648.
- 107.** Lyman SD, Stocking K, Davison B, Fletcher F, Johnson L, Escobar S. Structural analysis of human and murine flt3 ligand genomic loci. *Oncogene.* 1995;11:1165-1172.
- 108.** Lisovsky M, Braun SE, Ge Y, et al. Flt3-ligand production by human bone marrow stromal cells. *Leukemia.* 1996;10:1012-1018.
- 109.** Brasel K, Escobar S, Anderberg R, de Vries P, Gruss HJ, Lyman SD. Expression of the flt3 receptor and its ligand on hematopoietic cells. *Leukemia.* 1995;9:1212-1218.
- 110.** Lyman SD, Brasel K, Rousseau AM, Williams DE. The flt3 ligand: a hematopoietic stem cell factor whose activities are distinct from steel factor. *Stem Cells.* 1994;12:99-107; discussion 108-110.
- 111.** Lyman SD. Biology of flt3 ligand and receptor. *Int J Hematol.* 1995;62:63-73.
- 112.** Rasko JE, Metcalf D, Rossner MT, Begley CG, Nicola NA. The flt3/flk-2 ligand: receptor distribution and action on murine haemopoietic cell survival and proliferation. *Leukemia.* 1995;9:2058- 2066.

- 113.** Sonoda Y, Kimura T, Sakabe H, et al. Human FLT3 ligand acts on myeloid as well as multipotential progenitors derived from purified CD34+ blood progenitors expressing different levels of c-kit protein. *Eur J Haematol.* 1997;58:257-264.
- 114.** Piacibello W, Garetto L, Sanavio F, et al. The effects of human FLT3 ligand on in vitro human megakaryocytopoiesis. *Exp Hematol.* 1996;24: 340-346.
- 115.** McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE, et al. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood.* 2000;95: 3489-3497.
- 116.** Maraskovsky E, Brasel K, Teepe M, et al. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med.* 1996;184:1953-1962.
- 117.** Yu H, Fehniger TA, Fuchshuber P, et al. Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15. *Blood.* 1998;92:3647- 3657.
- 118.** Williams DE. In vivo effects of flt3 ligand [abstract]. *Blood.* 1997;90:5022a.
- 119.** Lyman SD, Williams DE. Biology and potential clinical applications of flt3 ligand. *Curr Opin Hematol.* 1995;2:177-181.
- 120.** Lynch DH, Andreasen A, Maraskovsky E, Whitmore J, Miller RE, Schuh JC. Flt3 ligand induces tumor regression and antitumor immune responses in vivo. *Nat Med.* 1997;3:625-631.
- 121.** Esche C, Subbotin VM, Maliszewski C, Lotze MT, Shurin MR. FLT3 ligand administration inhibits tumor growth in murine melanoma and lymphoma. *Cancer Res.* 1998;58:380-383.
- 122.** Wang A, Braun SE, Sonpavde G, Cornetta K. Antileukemic activity of Flt3 ligand in murine leukemia. *Cancer Res.* 2000;60:1895-1900.
- 123.** Minden M, Imrie K, Keating A. Acute leukemia in adults. *Curr Opin Hematol.* 1996;3:259-265.
- 124.** Drexler HG. Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. *Leukemia.* 1996;10:588-599.
- 125.** Piacibello W, Fubini L, Sanavio F, et al. Effects of human FLT3 ligand on myeloid leukemia cell growth: heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors. *Blood.* 1995;86:4105-4114.

- 126.** Braun SE, Aronica SM, Ge Y, et al. Retroviral mediated gene transfer of Flt3 ligand enhances proliferation and MAP kinase activity of AML5 cells. *Exp Hematol.* 1997;25:51-56.
- 127.** Drexler HG, Meyer C, Quentmeier H. Effects of FLT3 ligand on proliferation and survival of myeloid leukemia cells. *Leuk Lymphoma.* 1999;33: 83-91.
- 128.** Lisovsky M, Estrov Z, Zhang X, et al. Flt3 ligand stimulates proliferation and inhibits apoptosis of acute myeloid leukemia cells: regulation of Bcl-2 and Bax. *Blood.* 1996;88:3987-3997.
- 129.** Juan TS, McNiece IK, Van G, et al. Chronic expression of murine flt3 ligand in mice results in increased circulating white blood cell levels and abnormal cellular infiltrates associated with splenic fibrosis. *Blood.* 1997;90:76-84.
- 130.** Dosil M, Wang S, Lemischka IR. Mitogenic signalling and substrate specificity of the Flk2/Flt3 receptor tyrosine kinase in fibroblasts and interleukin 3-dependent hematopoietic cells. *Mol Cell Biol.* 1993;13(10):6572-6585.
- 131.** Zhang S, Fukuda S, Lee Y, et al. Essential role of signal transducer and activator of transcription (Stat)5a but not Stat5b for Flt3-dependent signaling. *J Exp Med.* 2000;192(5):719-728.
- 132.** Lyman SD, Jacobsen SE. c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood.* 1998;91(4): 1101-1134.
- 133.** Lyman SD, James L, Johnson L, et al. Cloning of the human homologue of the murine flt3 ligand: a growth factor for early hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 1994;83(10):2795-2801.
- 134.** Stirewalt DL, Radich JP: The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer* 2003, 3:650-665.
- 135.** Small D, Levenstein M, Kim E, et al. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(2): 459-463.
- 136.** Mackarechtschian K, Hardin JD, Moore KA, Boast S, Goff SP, Lemischka IR. Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity.* 1995;3(1): 147-161.
- 137.** Sitnicka E, BuzaVidas N, Larsson S, Nygren JM, Liuba K, Jacobsen SE. Human CD34+ hematopoietic stem cells capable of multilineage engrafting NOD/SCID mice

express flt3: distinct flt3 and c-kit expression and response patterns on mouse and candidate human hematopoietic stem cells. *Blood*. 2003;102(3):881-886.

138. Brown P, Meshinchi S, Levis M, et al. Pediatric AML primary samples with FLT3/ITD mutations are preferentially killed by FLT3 inhibition. *Blood*. 2004;104(6):1841-1849.

139. Weisel KC, Yildirim S, Schweikle E, Kanz L, Mohle R. Effect of FLT3 inhibition on normal hematopoietic progenitor cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1106:190-196.

140. Lyman SD, Seaberg M, Hanna R, et al. Plasma/ serum levels of flt3 ligand are low in normal individuals and highly elevated in patients with Fanconi anemia and acquired aplastic anemia. *Blood*. 1995;86(11):4091-4096.

141. Molyneux G, Gibson FM, Whayman M, Turton JA. Serum FLT-3 ligand in a busulphan induced model of chronic bone marrow hypoplasia in the female CD-1 mouse. *Int J Exp Pathol*. 2008;89(2): 159-170.

142. Bertho JM, Demarquay C, Frick J, et al. Level of Flt3-ligand in plasma: a possible new bio-indicator for radiation-induced aplasia. *Int J Radiat Biol*. 2001;77(6):703-712.

143. Haidar JH, Bazarbachi A, Mahfouz R, Haidar HA, Jaafar H, Daher R. Serum Flt3 ligand variation as a predictive indicator of hematopoietic stem cell mobilization. *J Hematother Stem Cell Res*. 2002; 11(3):533-538.

144. Zhou J, Bi C, Janakakumara JV, et al. Enhanced activation of STAT pathways and overexpression of survivin confer resistance to FLT3 inhibitors and could be therapeutic targets in AML. *Blood*. 2009;113(17):4052-4062.

145. Kelly LM, Yu JC, Boulton CL, et al. CT53518, a novel selective FLT3 antagonist for the treatment of acute myelogenous leukemia (AML). *Cancer Cell*. 2002;1(5):421-432.

146. Turner AM, Lin NL, Issarachai S, Lyman SD, Broudy VC. FLT3 receptor expression on the surface of normal and malignant human hematopoietic cells. *Blood*. 1996;88(9):3383-3390.

147. Zarrinkar PP, Gunawardane RN, Cramer MD, et al. AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2009;114(14):2984-2992.

148. Pratz KW, Sato T, Murphy KM, Stine A, Rajkhowa T, Levis M. FLT3-mutant allelic burden and clinical status are predictive of response to FLT3 inhibitors in AML. *Blood*. 2010;115(7):1425-1432.

149. Rosnet O, Buhning HJ, deLapeyriere O, et al. Expression and signal transduction of the FLT3 tyrosine kinase receptor. *Acta Haematol*. 1996; 95(3-4):218-223.

- 150.** Gabbianelli M, Pelosi E, Montesoro E, et al. Multi- level effects of flt3 ligand on human hematopoiesis: expansion of putative stem cells and proliferation of granulomonocytic progenitors/ monocytic precursors. *Blood*. 1995;86(5):1661- 1670.
- 151.** Shah AJ, Smogorzewska EM, Hannum C, Crooks GM. Flt3 ligand induces proliferation of quiescent human bone marrow CD34+CD38- cells and maintains progenitor cells in vitro. *Blood*. 1996; 87(9):3563-3570.
- 152.** Carow CE, Levenstein M, Kaufmann SH, et al. Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias. *Blood*. 1996;87(3):1089-1096.
- 153.** Armstrong SA, Mabon ME, Silverman LB, et al. FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2004;103(9):3544-3546.
- 154.** Dosil M, Wang S, Lemischka IR: Mitogenic signalling and substrate specificity of the Flk2/Flt3 receptor tyrosine kinase in fibroblasts and interleukin 3-dependent hematopoietic cells. *Mol Cell Biol* 1993, 13:6572-6585.
- 155.** Takahashi S: Inhibition of the MEK/MAPK signal transduction pathway strongly impairs the growth of Flt3-ITD cells. *Am J Hematol* 2006, 81:154-155.
- 156.** Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, Tanimoto M, Kitamura T, Saito H, Naoe T; 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.
- 157.** Bruserud O, Hovland R, Wergeland L, Huang TS, Gjertsen BT: Flt3-mediated signaling in human acute myelogenous leukemia (AML) blasts: a functional characterization of Flt3-ligand effects in AML cell populations with and without genetic Flt3 abnormalities. *Haematologica* 2003, 88:416-428.
- 158.** Gilliland DG, Griffin JD: The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 2002, 100:1532-1542.
- 159.** Choudhary C, Schwable J, Brandts C, Tickenbrock L, Sargin B, Kindler T, Fischer T, Berdel WE, Muller-Tidow C, Serve H: AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations. *Blood* 2005, 106:265-273.
- 160.** Grundler R, Miething C, Thiede C, Peschel C, Duyster J: FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model. *Blood* 2005, 105:4792-4799.
- 161.** Calo V, Migliavacca M, Bazan V, Macaluso M, Buscemi M, Gebbia N, Russo A: STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J Cell Physiol* 2003,

197:157-168.

162. Takahashi S, Harigae H, Kaku M, Sasaki T, Licht JD: Flt3 mutation activates p21(WAF1/CIP1) gene expression through the action of STAT5. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 316:85-92.

163. Takahashi S, McConnell MJ, Harigae H, Kaku M, Sasaki T, Melnick AM, Licht JD: The Flt3 internal tandem duplication mutant inhibits the function of transcriptional repressors by blocking interactions with SMRT. *Blood* 2004, 103:4650-4658.

164. Kim KT, Baird K, Ahn JY, Meltzer P, Lilly M, Levis M, Small D: Pim-1 is upregulated by constitutively activated FLT3 and plays a role in FLT3- mediated cell survival. *Blood* 2004, 21:21.

165. Zheng R, Levis M, Piloto O, Brown P, Baldwin BR, Gorin NC, Beran M, Zhu Z, Ludwig D, Hicklin D, et al: FLT3 ligand causes autocrine signaling in acute myeloid leukemia cells. *Blood* 2004, 103:267-274.

166. Ozeki K, Kiyoi H, Hirose Y, Iwai M, Ninomiya M, Kodera Y, Miyawaki S, Kuriyama K, Shimazaki C, Akiyama H, et al: Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. *Blood* 2004, 103:1901-1908.

167. Lemmon MA, Schlessinger J: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010, 141:1117-1134.

168. Birg F, Courcoul M, Rosnet O, et al. Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages. *Blood*. 1992;80:2584-2593.

169. Stacchini A, Fubini L, Severino A, Sanavio F, Aglietta M, Piacibello W. Expression of type III receptor tyrosine kinases FLT3 and KIT and responses to their ligands by acute myeloid leukemia blasts. *Leukemia*. 1996;10:1584-1591.

170. Soheil Meshinchi and Frederick R. Appelbaum Fred Hutchinson ,Structural and functional Alterations of FLT3 in Acute Myeloid Leukemia; Cancer Research Center, Seattle, WA, Published in final edited form as: *Clin Cancer Res*. 2009 July 1; 15(13): 4263–4269. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1123.

171. Carow CE, Levenstein M, Kaufmann SH, et al. Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias. *Blood*. 1996;87:1089-1096.

172. Yun Chen^{1†}, Yao Guo^{3†}, Jiayu Han¹, Wanting Tina Ho¹, Shibo Li², Xueqi Fu³ and Zhizhuang Joe Zhao^{1,3*} Generation and characterization of a highly effective protein substrate for analysis of FLT3 activity Chen et al. *Journal of Hematology & Oncology* 2012.

173. DaSilva N, Hu ZB, Ma W, Rosnet O, Birnbaum D, Drexler HG. Expression of the FLT3 gene in human leukemia-lymphoma cell lines. *Leukemia*. 1994;8:885-888.

- 174.** Meierhoff G, Dehmel U, Gruss HJ, et al. Expression of FLT3 receptor and FLT3-ligand in human leukemia-lymphoma cell lines. *Leukemia*. 1995;9: 1368-1372.
- 175.** Kindler T, Lipka DB, Fischer T. FLT3 as a therapeutic target in AML: still challenging after all these years. *Blood*. 2010;116(24): 5089-102.
- 176.** Marcucci G, Haferlach T, Dohner H. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol*. 2011;29(5):475-86.
- 177.** Walker A, Marcucci G. Impact of molecular prognostic factors in cytogenetically normal acute myeloid leukemia at diagnosis and relapse. *Haematologica*. 2011;96(5):64-3.
- 178.** Whitman SP, Maharry K, Radmacher MD, Becker H, Mrozek K, Margeson D, et al. FLT3 internal tandem duplication associates with adverse outcome and gene and microRNA-expression signatures in patients 60 years of age or older with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood*. 2010;116(18):3622-6.
- 179.** Mrozek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*. 2007;109(2):431-48.
- 180.** Stirewalt DL, Radich JP: The role of FLT3 in hematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer* 2003, 3:650–665.
- 181.** Takahashi S: Downstream molecular pathways of FLT3 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia: biology and therapeutic implications. *J Hematol Oncol* 2011, 4:13.
- 182.** Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT. Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2001;113:983-988.
- 183.** Fenski R, Flesch K, Serve S, et al. Constitutive activation of FLT3 in acute myeloid leukaemia and its consequences for growth of 32D cells. *Br J Haematol*. 2000;108:322-330.
- 184.** Meshinchi S, Woods WG, Stirewalt DL, et al. Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood*. 2001;97:89-94.
- 185.** Iwai T, Yokota S, Nakao M, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene and clinical evaluation in childhood acute myeloid leukemia. *The Children's Cancer and*

Leukemia Study Group, Japan. *Leukemia*. 1999;13:38-43.

186. Meshinchi S, Stirewalt DL, Alonzo TA, et al. Activating mutations of RTK/ras signal transduction pathway in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood*. 2003;102:1474-1479.

187. Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, et al. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 1999;93: 3074-3080.

188. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, et al. The presence of a 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;98:1752-1759.

189. Thiede C, Steudel C, Mohr B, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*. 2002;99:4326-4335.

190. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*. 2001;97:2434-2439.

191. Yanada M, Matsuo K, Suzuki T, Kiyoi H, Naoe T. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Leukemia*. 2005;19:1345-1349.

192. Nakao M, Yokota S, Iwai T, et al. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996;10(12):1911–8. [PubMed: 8946930]

193. Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia* 1998;12(9): 1333–7. [PubMed: 9737679]

194. Gale RE, Green C, Allen C, et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2007

195. Meshinchi S, Alonzo TA, Stirewalt DL, et al. Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML. *Blood* 2006;108(12):3654–61. [PubMed: 16912228]

196. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, et al. Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2006;107(9):3724–6. [PubMed: 16368883]

197. Meshinchi S, Stirewalt DL, Alonzo TA, et al. Structural and numerical variation of FLT3/ITD in pediatric AML. *Blood* 2008;111(10):4930–3. [PubMed: 18305215]

- 198.** Nakao M, Yokota S, Iwai T, et al. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1996;10:1911-1918.
- 199.** Horiike S, Yokota S, Nakao M, et al. Tandem duplications of the FLT3 receptor gene are associated with leukemic transformation of myelodysplasia. *Leukemia*. 1997;11:1442-1446.
- 200.** Meshinchi S, Woods WG, Stirewalt DL, et al. Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood*. 2001;97:89-94.
- 201.** Yokota S, Kiyoi H, Nakao M, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies: a study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia*. 1997;11:1605-1609.
- 202.** Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*. 2001;97:2434-2439.
- 203.** Fenaux P. Chromosome and molecular abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol*. 2001;73:429-437.
- 204.** Xu F, Taki T, Yang HW, et al. Tandem duplication of the FLT3 gene is found in acute lymphoblastic leukaemia as well as acute myeloid leukaemia but not in myelodysplastic syndrome or juvenile chronic myelogenous leukaemia in children. *Br J Haematol*. 1999;105:155-162.
- 205.** Meshinchi S, Woods WG, Stirewalt DL, et al. Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood*. 2001;97:89-94.
- 206.-** Kondo M, Horibe K, Takahashi Y, et al. Prognostic value of internal tandem duplication of the FLT3 gene in childhood acute myelogenous leukemia. *Med Pediatr Oncol*. 1999;33:525-529.
- 207.** Xu F, Taki T, Eguchi M, et al. Tandem duplication of the FLT3 gene is infrequent in infant acute leukemia. Japan Infant Leukemia Study Group. *Leukemia*. 2000;14:945-947.
- 208.** Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, et al. FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2001; 97:3589-3595.
- 209.** Kiyoi H, Naoe T, Yokota S, et al. Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia. Leukemia Study Group of the Ministry of

Health and Welfare (Kohseisho). *Leukemia*. 1997;11:1447-1452.

210. Iwai T, Yokota S, Nakao M, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene and clinical evaluation in childhood acute myeloid leukemia. The Children's Cancer and Leukemia Study Group, Japan. *Leukemia*. 1999;13:38-43.

211. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, et al. FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group. *Br J Haematol*. 2000;111:190-195.

212. Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, et al. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 1999;93:3074-3080.

213. Nakano Y, Kiyoi H, Miyawaki S, et al. Molecular evolution of acute myeloid leukaemia in relapse: unstable N-ras and FLT3 genes compared with p53 gene. *Br J Haematol*. 1999;104:659-664.

214. Iwai T, Yokota S, Nakao M, et al. Internal tandem duplication in the juxtatransmembrane domain of the flt3 is not involved in blastic crisis of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 1997;11:1992-1993.

215. Pardanani A, Reeder TL, Baek J-Y, Li C-Y, Butterfield JH, Tefferi A. FLT3 mutations studies and clinical correlates of c-kit D816 mutation in adult systemic mast cell disease [abstract]. *Blood*. 2001;89:630a.

216. Baldwin BR, Zheng R, Small D. FLT3 is not frequently mutated in solid tumors [abstract]. *Blood*. 2001;98:156b.

217. Ishii E, Zaitso M, Ihara K, Hara T, Miyazaki S. High expression but no internal tandem duplication of FLT3 in normal hematopoietic cells. *Pediatr Hematol Oncol*. 1999;16:437-441.

218. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, et al. The presence of a 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;98:1752-1759.

219. Whitman SP, Archer KJ, Feng L, et al. 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 Res*. 2001;61:7233-7239.

220. Meshinchi S, Woods WG, Stirewalt DL, Sweetser DA, Buckley JD, Tjoa TK, Bernstein ID, Radich JP: Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication

in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* 2001, 97:89-94.

221. Taketani T, Taki T, Sugita K, Furuichi Y, Ishii E, Hanada R, Tsuchida M, Ida K, Hayashi Y: FLT3 mutations in the activation loop of tyrosine kinase domain are frequently found in infant ALL with MLL rearrangements and pediatric ALL with hyperdiploidy. *Blood* 2004, 103:1085-1088.

222. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, et al: Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 2001, 97:2434-2439.

223. Markovic A, MacKenzie KL, Lock RB: FLT-3: a new focus in the understanding of acute leukemia. *Int J Biochem Cell Biol* 2005, 37:1168-1172.

224. Stirewalt DL, Radich JP: The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer* 2003, 3:650-665.

225. Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, 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(5):624–31. [PubMed: 10698507]

226. Stirewalt DL, Radich JP. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer* 2003;3 (9):650–65. [PubMed: 12951584]

227. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998;279(5350):577–80. [PubMed: 9438854]

228. Gille H, Kowalski J, Yu L, et al. A repressor sequence in the juxtamembrane domain of Flt-1 (VEGFR-1) constitutively inhibits vascular endothelial growth factor-dependent phosphatidylinositol 3'-kinase activation and endothelial cell migration. *Embo J* 2000;19(15):4064–73. [PubMed: 10921887]

229. Griffith J, Black J, Faerman C, et al. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell* 2004;13(2):169–78. [PubMed: 14759363]

230. Mizuki M, Fenski R, Halfter H, et al. Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood* 2000;96(12):3907–14. [PubMed: 11090077]

231. Mizuki M, Fenski R, Halfter H, et al. Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood* 2000;96(12):3907–14. [PubMed: 11090077]

232. Zheng R, Bailey E, Nguyen B, et al. Further activation of FLT3 mutants by FLT3 ligand [published ahead of print April 25, 2011]. *Oncogene*. doi: 10.1038.onc.2011.110.56.

- 233.** Sato T, Yang X, Knapper S, et al. FLT3 ligand impedes the efficacy of FLT3 inhibitors in vitro and in vivo. *Blood*. 2011;117(12):3286-3293.
- 234.** Nakao M, Yokota S, Iwai T, et al. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1996;10(12):1911-1918.
- 235.** Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia*. 1998; 12(9):1333-1337.
- 236.** Griffith J, Black J, Faerman C, et al. the structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell*. 2004;13(2):169-178.
- 237.** Kindler T, Lipka DB, Fischer T. FLT3 as a therapeutic target in AML: still challenging after all these years. *Blood*. 2010;116(24):5089-5102.
- 238.** Levis M, Small D. FLT3: ITDoes matter in leukemia. *Leukemia*. 2003;17(9):1738-1752.
- 239.** Pinheiro RF, de Sa Moreira E, Silva MR, Alberto FL, Chauffaille Mde L. FLT3 internal tandem duplication during myelodysplastic syndrome follow-up: a marker of transformation to acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008;183(2):89- 93.
- 240.** Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, et al. The presence of a 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(6):1752-1759.
- 241.** Thiede C, Steudel C, Mohr B, 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(12):4326- 4335.
- 242.** Ravandi F, Kantarjian H, Faderl S, et al. Outcome of patients with FLT3-mutated acute myeloid leukemia in first relapse. *Leuk Res*. 2010;34(6):752- 756.
- 243.** Levis M, Ravandi F, Wang ES, et al. Results from a randomized trial of salvage chemotherapy followed by lestaurtinib for patients with FLT3 mutant AML in first relapse. *Blood*. 2011;117(12): 3294-3301.
- 244.** Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, et al. Activ- ity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute

lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med.* 2001; 344(14):1038-1042.

245. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2001;344(14):1031-1037.

246. Zheng R, Bailey E, Nguyen B, et al. Further activation of FLT3 mutants by FLT3 ligand [published ahead of print April 25, 2011]. *Oncogene.* doi: 10.1038.onc.2011.110.

247. Sato T, Yang X, Knapper S, et al. FLT3 ligand impedes the efficacy of FLT3 inhibitors in vitro and in vivo. *Blood.* 2011;117(12):3286-3293.

248. Lyman SD, Seaberg M, Hanna R, et al. Plasma/ serum levels of flt3 ligand are low in normal individuals and highly elevated in patients with Fanconi anemia and acquired aplastic anemia. *Blood.* 1995;86(11):4091-4096.

249. Bojko P, Pawloski D, Stellberg W, Schroder JK, Seeber S. Flt3 ligand and thrombopoietin serum levels during peripheral blood stem cell mobilization with chemotherapy and recombinant human glycosylated granulocyte colony-stimulating factor (rhu-G-CSF, lenograstim) and after high-dose chemotherapy. *Ann Hematol.* 2002;81(9):522- 528

250. Pratz KW, Sato T, Murphy KM, Stine A, Rajkhowa T, Levis M. FLT3-mutant allelic burden and clinical status are predictive of response to FLT3 inhibitors in AML. *Blood.* 2010;115(7):1425-1432.

251. Nakano Y, Kiyoi H, Miyawaki S, et al. Molecular evolution of acute myeloid leukaemia in relapse: unstable N-ras and FLT3 genes compared with p53 gene. *Br J Haematol.* 1999;104(4):659-664.

252. Shih LY, Huang CF, Wu JH, et al. Internal tandem duplication of FLT3 in relapsed acute myeloid leukemia: a comparative analysis of bone marrow samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse. *Blood.* 2002;100(7):2387-2392.

253. Fernandez HF, Sun Z, Yao X, et al. Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2009;361(13):1249-1259.

254. Green C, Linch DC, Gale RE. Most acute myeloid leukaemia patients with intermediate mutant FLT3/ITD levels do not have detectable bi-allelic disease, indicating that heterozygous disease alone is associated with an adverse outcome. *Br J Haematol.* 2008;142(3):423-426.

255. Kottaridis PD, Gale RE, Langabeer SE, Frew ME, Bowen DT, Linch DC. Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute

myeloid leukemia: implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors. *Blood*. 2002;100(7):2393-2398.

256. Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, et al. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 1999;93(9):3074–80. [PubMed: 10216104]

257. Schlenk RF, Dohner K, Krauter J, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2008; 358(18):1909-1918.

258. Dezern AE, Sung A, Kim S, et al. Role of allogeneic transplantation for FLT3/ITD acute myeloid leukemia: outcomes from 133 consecutive newly-diagnosed patients from a single institution [published online ahead of print February 12, 2011]. *Biol Blood Marrow Transplant*. doi:10.1016/j.bbmt.2011.02.003.

259. Gale RE, Hills R, Kottaridis PD, et al. No evidence that FLT3 status should be considered as an indicator for transplantation in acute myeloid leukemia (AML): an analysis of 1135 patients, excluding acute promyelocytic leukemia, from the UK MRC AML10 and 12 trials. *Blood*. 2005; 106(10):3658-3665.

260. Gupta V, Tallman MS, Weisdorf DJ. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for adults with acute myeloid leukemia: myths, controversies, and unknowns. *Blood*. 2011;117(8):2307-2318.

261. Kayser S, Dohner K, Krauter J, et al. Impact of allogeneic transplantation from matched related and unrelated donors on clinical outcome in younger adult AML patients with FLT3 internal tandem duplications [abstract]. *Blood*. 2010; 116(21):Abstract 909.

262. Gale RE, Green C, Allen C, et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2008;111(5):2776–84. [PubMed: 17957027]

263. Wybenga-Groot LE, Baskin B, Ong SH, Tong J, Pawson T, Sicheri F. Structural basis for autoinhibition of the Ephb2 receptor tyrosine kinase by the unphosphorylated juxtamembrane region. *Cell*. 2001;106:745-757.

264. Hubbard SR. Theme and variations: juxtamembrane regulation of receptor protein kinases. *Mol Cell*. 2001;8:481-482.

265. Burke CL, Stern DF. Activation of Neu (ErbB-2) mediated by disulfide bond-induced dimerization reveals a receptor tyrosine kinase dimer interface. *Mol Cell Biol*.

1998;18:5371-5379.

266. Burke CL, Lemmon MA, Coren BA, Engelman DM, Stern DF. Dimerization of the p185neu transmembrane domain is necessary but not sufficient for transformation. *Oncogene*. 1997;14:687-696.

267. Favelyukis S, Till JH, Hubbard SR, Miller WT. Structure and autoregulation of the insulin-like growth factor 1 receptor kinase. *Nat Struct Biol*. 2001;8:1058-1063.

268. Mohammadi M, Schlessinger J, Hubbard SR. Structure of the FGF receptor tyrosine kinase domain reveals a novel autoinhibitory mechanism. *Cell*. 1996;86:577-587.

269. Mohammadi M, McMahon G, Sun L, et al. Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors. *Science*. 1997;276:955-960.

270. Weiss A, Schlessinger J. Switching signals on or off by receptor dimerization. *Cell*. 1998;94:277-280.

271. Till JH, Ablooglu AJ, Frankel M, Bishop SM, Kohanski RA, Hubbard SR. Crystallographic and solution studies of an activation loop mutant the insulin receptor tyrosine kinase: insights kinase mechanism. *J Biol Chem*. 2001;276:10049-10055.

272. Binns KL, Taylor PP, Sicheri F, Pawson T, Holland SJ. Phosphorylation of tyrosine residues in the kinase domain and juxtamembrane region regulates the biological and catalytic activities of Eph receptors. *Mol Cell Biol*. 2000;20:4791-4805.

273. Stapleton D, Balan I, Pawson T, Sicheri F. The crystal structure of an Eph receptor SAM domain reveals a mechanism for modular dimerization. *Nat Struct Biol*. 1999;6:44-49.

274. Soheil Meshinchi and Frederick R. Appelbaum Fred Hutchinson, Structural and functional Alterations of FLT3 in Acute Myeloid Leukemia; Cancer Research Center, Seattle, WA, Published in final edited form as: *Clin Cancer Res*. 2009 July 1; 15(13):4263-4269. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1123.

275. Thiede C, Koch S, Creutzig E, et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2006;107(10):4011-20. [PubMed: 16455956]

276. Gale RE, Hills R, Kottaridis PD, et al. No evidence that FLT3 status should be considered as an indicator for transplantation in acute myeloid leukemia (AML): an analysis of 1135 patients, excluding acute promyelocytic leukemia, from the UK MRC AML10 and 12 trials. *Blood* 2005;106 (10):3658-65. [PubMed: 16076872]

277. Schlenk RF, Dohner K, Krauter J, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008;358(18):1909-18.

[PubMed: 18450602]

278. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 2001;97(8):2434–9.

[PubMed: 11290608]

279. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT. Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2001;113(4):983–8. [PubMed: 11442493]

280. Kindler T, Breitenbuecher F, Kasper S, et al. Identification of a novel activating mutation (Y842C) within the activation loop of FLT3 in patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2005;105 (1):335–40. [PubMed: 15345593]

281. Griffin JD. Point mutations in the FLT3 gene in AML. *Blood*. 2001;97:2193a.

282. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT. Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2001;113:983-988.

283. Lin P, Jones D, Medeiros LJ, Chen W, Vega-Vazquez F, Luthra R. Activating FLT3 mutations are detectable in chronic and blast phase of chronic myeloproliferative disorders other than chronic myeloid leukemia. *Am J Clin Pathol* 2006;126(4):530–3. [PubMed: 16938665]

284. Chen W, Jones D, Medeiros LJ, Luthra R, Lin P. Acute myeloid leukaemia with FLT3 gene mutations of both internal tandem duplication and point mutation type. *Br J Haematol* 2005;130(5):726–8. [PubMed: 16115128]

285. Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, et al. Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood*. 2005;105(1):54-60.

286. Meshinchi S, Stirewalt DL, Alonzo TA, et al. Activating mutations of RTK/ras signal transduction pathway in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* 2003;102(4):1474–9. [PubMed: 12702504]

287. Meshinchi S, Alonzo TA, Gerbing R, Lang B, Radich J. FLT3 internal tandem duplication (FLT3/ ITD) is a prognostic factor for poor outcome in pediatric AML: a CCG2961 study. *Blood* 2003;102:335a.

288. Matsuno N, Nanri T, Kawakita T, Mitsuya H, Asou N. A novel FLT3 activation loop mutation N841K in acute myeloblastic leukemia. *Leukemia* 2005;19(3):480–1. [PubMed:

15625552]

- 289.** Spiekermann K, Bagrintseva K, Schoch C, Haferlach T, Hiddemann W, Schnittger S. A new and recurrent activating length mutation in exon 20 of the FLT3 gene in acute myeloid leukemia. *Blood* 2002;100(9):3423–5. [PubMed: 12384447]
- 290.** Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia* 1998;12(9): 1333–7. [PubMed: 9737679]
- 291.** Choudhary C, Schwable J, Brandts C, et al. AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations. *Blood* 2005;106(1):265–73. [PubMed: 15769897]
- 292.** Vempati S, Reindl C, Kaza SK, et al. Arginine 595 is duplicated in patients with acute leukemias carrying internal tandem duplications of FLT3 and modulates its transforming potential. *Blood* 2007;110(2):686–94. [PubMed: 17387224]
- 293.** Grundler R, Miething C, Thiede C, Peschel C, Duyster J. FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model. *Blood* 2005;105(12):4792–9. [PubMed: 15718420]
- 294.** Meshinchi S, Woods WG, Stirewalt DL, et al. Prevalence and prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* 2001;97(1):89–94. [PubMed: 11133746]
- 295.** Whitman SP, Archer KJ, Feng L, et al. 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 Res* 2001;61(19):7233–9. [PubMed: 11585760]
- 296.** Meshinchi S, Pollard JA, Tsuchiya KD, Stirewalt DA, Bernstein ID, Radich J. Gene Conversion Is a Late Event in Evolution of High Risk AML. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2007;110(11):207.
- 297.** Raghavan M, Smith LL, Lillington DM, et al. Segmental uniparental disomy is a commonly acquired genetic event in relapsed acute myeloid leukemia. *Blood* 2008;112(3):814–21. [PubMed: 18490517]
- 298.** Fitzgibbon J, Smith LL, Raghavan M, et al. Association between acquired uniparental disomy and homozygous gene mutation in acute myeloid leukemias. *Cancer Res* 2005;65(20):9152–4. [PubMed: 16230371]
- 299.** Levis MJ. Will newer tyrosine kinase inhibitors have an impact in AML? *Best Pract Res Clin Haematol.* 2010;23(4):489-494.

- 300.** Zhu X, Ma Y, Liu D: Novel agents and regimens for acute myeloid leukemia: 2009 ASH annual meeting highlights. *J Hematol Oncol* 2010, 3:17.
- 301.** Fathi A, Levis M: FLT3 inhibitors: a story of the old and the new. *Curr Opin Hematol* 2011, 18:71–76.
- 302.** Pratz KW, Levis MJ: Bench to Bedside Targeting of FLT3 in Acute Leukemia. *Curr Drug Targets* 2010, 11:781–789.
- 303.** Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* 2002;30(1):41–7. [PubMed: 11731795]
- 304.** Zhao M, Kiyoi H, Yamamoto Y, et al. In vivo treatment of mutant FLT3-transformed murine leukemia with a tyrosine kinase inhibitor. *Leukemia* 2000;14(3):374–8. [PubMed: 10720129]
- 305.** Minami Y, Kiyoi H, Yamamoto Y, et al. Selective apoptosis of tandemly duplicated FLT3- transformed leukemia cells by Hsp90 inhibitors. *Leukemia* 2002;16(8):1535–40. [PubMed: 12145695]
- 306.** Levis M, Allebach J, Tse KF, et al. A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood* 2002;99(11):3885–91. [PubMed: 12010785]
- 307.** Levis M, Allebach J, Fai-Tse K, et al. FLT3-targeted inhibitors kill FLT3-dependent modeled cells, leukemia-derived cell lines, and primary AML blasts in vitro and in vivo. *Blood* 2001;89:721a.
- 308.** Smith BD, Levis M, Brown P, et al. Single agent CEP-701, a novel FLT-3 inhibitor, shows initial response in patients with refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 2002;100(11):314a.
- 309.** Smith BD, Levis M, Beran M, et al. Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 2004;103 (10):3669–76. [PubMed: 14726387]
- 310.** Levis M, Smith BD, Beran M, et al. A Randomized, Open-Label Study of Lestaurtinib (CEP-701), an Oral FLT3 Inhibitor, Administered in Sequence with Chemotherapy in Patients with Relapsed AML Harboring FLT3 Activating Mutations: Clinical Response Correlates with Successful FLT3 Inhibition. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2005;106(11):403.
- 311.** Levis M, Pham R, Smith BD, Small D. In vitro studies of a FLT3 inhibitor combined with chemotherapy: sequence of administration is important in order to achieve synergistic

cytotoxic effects. *Blood* 2004;104:1145–50. [PubMed: 15126317]

312. Weisberg E, Boulton C, Kelly LM, et al. Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Cancer Cell* 2002;1(5):433–43. [PubMed: 12124173]

313. Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, et al. Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood* 2005;105(1):54–60. [PubMed: 15345597]

314. Stone RM, Fischer T, Paquette R. Phase 1B study of PKC412, an oral FLT3 kinase inhibitor, in sequential and simultaneous combinations with daunorubicin and cytarabine (DA) induction and high-dose consolidation in newly diagnosed patients with AML. *Blood* 2005;106:404a.al. e

315. Levis M, Brown P, Smith BD, et al. Plasma inhibitory activity (PIA): a pharmacodynamic assay reveals insights into the basis for cytotoxic response to FLT3 inhibitors. *Blood*. 2006;108(10): 3477-3483.

316. Smith BD, Levis M, Beran M, et al. Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2004; 103(10):3669-3676.

317. Knapper S, Burnett AK, Littlewood T, et al. A phase 2 trial of the FLT3 inhibitor lestaurtinib (CEP701) as first-line treatment for older patients with acute myeloid leukemia not considered fit for intensive chemotherapy. *Blood*. 2006;108(10): 3262-3270.

318. Knapper S, Mills KI, Gilkes AF, Austin SJ, Walsh V, Burnett AK. The effects of lestaurtinib (CEP701) and PKC412 on primary AML blasts: the induction of cytotoxicity varies with dependence on FLT3 signaling in both FLT3-mutated and wild-type cases. *Blood*. 2006;108(10):3494-3503.

319. Zhang W, Konopleva M, Shi YX, et al. Mutant FLT3: a direct target of sorafenib in acute myelogenous leukemia. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(3): 184-198.

320. Metzelder S, Wang Y, Wollmer E, et al. Compassionate use of sorafenib in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia: sustained regression before and after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2009;113(26):6567-6571.

321. Pratz KW, Sato T, Murphy KM, Stine A, Rajkhowa T, Levis M. FLT3-mutant allelic burden and clinical status are predictive of response to FLT3 inhibitors in AML. *Blood*. 2010;115(7):1425-1432.

322. Giles FJ, Stopeck AT, Silverman LR, et al. SU5416, a small molecule tyrosine kinase receptor inhibitor, has biologic activity in patients with refractory acute myeloid leukemia or

myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2003;102(3):795-801.

323. O'Farrell AM, Yuen HA, Smolich B, et al. Effects of SU5416, a small molecule tyrosine kinase receptor inhibitor, on FLT3 expression and phosphorylation in patients with refractory acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2004;28(7):679-689.

324. Fiedler W, Mesters R, Tinnefeld H, et al. A phase 2 clinical study of SU5416 in patients with refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2003;102(8): 2763-2767.

325. O'Farrell AM, Foran JM, Fiedler W, et al. An innovative phase I clinical study demonstrates inhibition of FLT3 phosphorylation by SU11248 in acute myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res*. 2003;9(15):5465-5476.

326. Fiedler W, Serve H, Dohner H, et al. A phase 1 study of SU11248 in the treatment of patients with refractory or resistant acute myeloid leukemia (AML) or not amenable to conventional therapy for the disease. *Blood*. 2005;105(3):986-993.

327. DeAngelo DJ, Stone RM, Heaney ML, et al. Phase 1 clinical results with tandutinib (MLN518), a novel FLT3 antagonist, in patients with acute myelogenous leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Blood*. 2006;108(12):3674- 3681.

328. DeAngelo DJ, Stone RM, Heaney ML, et al. Phase II evaluation of the tyrosine kinase inhibitor MLN518 in patients with acute myeloid leukemia (AML) bearing a FLT3 internal tandem duplication (ITD) mutation. *Blood*. 2004;104:496. *Abstract 1792*.

329. Cortes J, Robos GJ, Kantarjian HM, et al. A phase I dose escalation study of KW-2449, an oral multi-kinase inhibitor against FLT3, Abl, FGFR1 and aurora in patients with relapsed/ refractory AML, ALL and MDS or resistant/intolerant CML. *Blood*. 2008;112. *Abstract 2967*.

330. Pratz KW, Cortes J, Roboz GJ, et al. A pharmacodynamic study of the FLT3 inhibitor KW-2449 yields insight into the basis for clinical response. *Blood*. 2009;113(17):3938-3946.

331. Zarrinkar PP, Gunawardane RN, Cramer MD, et al. AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2009;114(14):2984-2992.

332. Cortes J, Foran J, Ghirdaladze D, et al. AC220, a potent, selective second generation FLT3 receptor tyrosine kinase (RTK) inhibitor, in a first-in-human (FIH) phase 1 AML study. *Blood*. 2009; 114. *Abstract 636*.

333. Schittenhelm MM, Kampa KM, Yee KW, Heinrich MC. The FLT3 inhibitor tandutinib (formerly MLN518) has sequence-independent synergistic effects with cytarabine and

daunorubicin. *Cell Cycle*. 2009;8(16):2621-2630.

334. Yee KW, Schittenhelm M, O'Farrell AM, et al. Synergistic effect of SU11248 with cytarabine or daunorubicin on FLT3 ITD-positive leukemic cells. *Blood*. 2004;104(13):4202-4209.

335. DeAngelo DJ, Amrein PC, Kovacsovics TJ, et al. Phase 1/2 study of tandutinib (MLN518) plus standard induction chemotherapy in newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Blood*. 2006;108. Abstract 158.

336. Levis M, Ravandi F, Wang ES, et al. Results from a randomized trial of salvage chemotherapy followed by lestaurtinib for FLT3 mutant AML patients in first relapse. *Blood*. 2009;114. Abstract 788.

337. Li Y, Li H, Wang MN, et al. Suppression of leukemia expressing wild-type or ITD-mutant FLT3 receptor by a fully human anti-FLT3 neutralizing antibody. *Blood*. 2004;104(4):1137-1144.

338. Piloto O, Levis M, Huso D, et al. Inhibitory anti-FLT3 antibodies are capable of mediating antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and reducing engraftment of acute myelogenous leukemia blasts in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res*. 2005; 65(4):1514-1522.

339. Piloto O, Nguyen B, Huso D, et al. IMC-EB10, an anti-FLT3 monoclonal antibody, prolongs survival and reduces nonobese diabetic/severe combined immunodeficient engraftment of some acute lymphoblastic leukemia cell lines and primary leukemic samples. *Cancer Res*. 2006;66(9):4843-4851.

340. Piloto O, Wright M, Brown P, Kim KT, Levis M, Small D. Prolonged exposure to FLT3 inhibitors leads to resistance via activation of parallel signaling pathways. *Blood*. 2007;109(4):1643-1652.

341. Breitenbuecher F, Markova B, Kasper S, et al. A novel molecular mechanism of primary resistance to FLT3-kinase inhibitors in AML. *Blood*. 2009; 113(17):4063-4073.

342. Clark JJ, Cools J, Curley DP, et al. Variable sensitivity of FLT3 activation loop mutations to the small molecule tyrosine kinase inhibitor MLN518. *Blood*. 2004;104(9):2867-2872.

343. Bagrintseva K, Schwab R, Kohl TM, et al. Mutations in the tyrosine kinase domain of FLT3 define a new molecular mechanism of acquired drug resistance to PTK inhibitors in FLT3-ITD-transformed hematopoietic cells. *Blood*. 2004; 103(6):2266-2275.

344. Grundler R, Thiede C, Miething C, Steudel C, Peschel C, Duyster J. Sensitivity toward tyrosine kinase inhibitors varies between different activating mutations of the FLT3

receptor. *Blood*. 2003; 102(2):646-651.

345. Shah NP, Tran C, Lee FY, Chen P, Norris D, Sawyers CL. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science*. 2004; 305(5682):399-401.

346. Cools J, Mentens N, Furet P, et al. Prediction of resistance to small molecule FLT3 inhibitors: implications for molecularly targeted therapy of acute leukemia. *Cancer Res*. 2004;64(18):6385- 6389.

347. Heidel F, Solem FK, Breitenbuecher F, et al. Clinical resistance to the kinase inhibitor PKC412 in acute myeloid leukemia by mutation of Asn-676 in the FLT3 tyrosine kinase domain. *Blood*. 2006; 107(1):293-300.

348. von Bubnoff N, Engh RA, Aberg E, Sanger J, Peschel C, Duyster J. FMS-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplication tyrosine kinase inhibitors display a nonoverlapping profile of resistance mutations in vitro. *Cancer Res*. 2009;69(7): 3032-3041.

349. Zhou J, Bi C, Janakakumara JV, et al. Enhanced activation of STAT pathways and overexpression of survivin confer resistance to FLT3 inhibitors and could be therapeutic targets in AML. *Blood*. 2009;113(17):4052-4062.

350. Weisberg E, Boulton C, Kelly LM, et al. Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Cancer Cell*. 2002;1(5):433-443.

351. Stolzel F, Steudel C, Oelschlagel U, et al. Mechanisms of resistance against PKC412 in resistant FLT3-ITD positive human acute myeloid leukemia cells. *Ann Hematol*. 2010;89(7):653-662.

352. Yoshimoto G, Miyamoto T, Jabbarzadeh-Tabrizi S, et al. FLT3-ITD up-regulates MCL-1 to promote survival of stem cells in acute myeloid leukemia via FLT3-ITD-specific STAT5 activation. *Blood*. 2009;114(24):5034-5043.

353. Kohl TM, Hellinger C, Ahmed F, et al. BH3 mimetic ABT-737 neutralizes resistance to FLT3 inhibitor treatment mediated by FLT3-independent expression of BCL2 in primary AML blasts. *Leukemia*. 2007;21(8):1763-1772.

354. Ozeki K, Kiyoi H, Hirose Y, et al. Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2004;103(5): 1901-1908.

355. Kornblau SM, Womble M, Qiu YH, et al. Simultaneous activation of multiple signal transduction pathways confers poor prognosis in acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2006;108(7):2358- 2365.

356. Dick JE. Acute myeloid leukemia stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1044:1-5.

357. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that

originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997;3(7):730-737.

358. Chung KY, Morrone G, Schuringa JJ, Wong B, Dorn DC, Moore MA. Enforced expression of an Flt3 internal tandem duplication in human CD34+ cells confers properties of self-renewal and enhanced erythropoiesis. *Blood.* 2005;105(1):77-84.

359. Li L, Piloto O, Kim KT, et al. FLT3/ITD expression increases expansion, survival and entry into cell cycle of human haematopoietic stem/progenitor cells. *Br J Haematol.* 2007;137(1):64-75.

360. Kottaridis PD, Gale RE, Langabeer SE, Frew ME, Bowen DT, Linch DC. Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors. *Blood.* 2002;100(7):2393-2398.

361. Nakano Y, Kiyoi H, Miyawaki S, et al. Molecular evolution of acute myeloid leukaemia in relapse: unstable N-ras and FLT3 genes compared with p53 gene. *Br J Haematol.* 1999;104(4):659-664.

362. Shih LY, Huang CF, Wu JH, et al. Heterogeneous patterns of FLT3 Asp(835) mutations in relapsed de novo acute myeloid leukemia: a comparative analysis of 120 paired diagnostic and relapse bone marrow samples. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(4):1326-1332.

363. Huang Q, Chen W, Gaal KK, Slovak ML, Stein A, Weiss LM. A rapid, one step assay for simultaneous detection of FLT3/ITD and NPM1 mutations in AML with normal cytogenetics. *Br J Haematol.* 2008;142(3):489-492.

364. Kern W, Haferlach C, Haferlach T, Schnittger S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Cancer.* 2008;112(1):4-16.

365. Levis M, Murphy KM, Pham R, et al. Internal tandem duplications of the FLT3 gene are present in leukemia stem cells. *Blood.* 2005;106(2):673-680.

366. Schnittger S, Schoch C, Dugas M, et al. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood.* 2002; 100(1):59-66.

367. Konopleva M, Konoplev S, Hu W, Zaritskey AY, Afanasiev BV, Andreeff M. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of antiapoptotic proteins. *Leukemia.*

2002;16(9):1713- 1724.

368. Sato TKS, Burnett AK, White P, Levis M. Increased plasma FLT3 ligand levels following chemotherapy may interfere with the clinical efficacy of FLT3 inhibitors. *Blood*. 2009;114. Abstract 937.

369. Matsunaga T, Fukai F, Miura S, et al. Combination therapy of an anticancer drug with the FNIII14 peptide of fibronectin effectively overcomes cell adhesion-mediated drug resistance of acute myelogenous leukemia. *Leukemia*. 2008; 22(2):353-360.

370. Tavor S, Petit I, Porozov S, et al. CXCR4 regulates migration and development of human acute myelogenous leukemia stem cells in transplanted NOD/SCID mice. *Cancer Res*. 2004;64(8):2817- 2824.

371 Fukuda S, Broxmeyer HE, Pelus LM. Flt3 ligand and the Flt3 receptor regulate hematopoietic cell migration by modulating the SDF-1alpha(CXCL12)/ CXCR4 axis. *Blood*. 2005;105(8):3117-3126.

372. Rombouts EJ, Pavic B, Lowenberg B, Ploemacher RE. Relation between CXCR-4 expression, Flt3 mutations, and unfavorable prognosis of adult acute myeloid leukemia. *Blood*. 2004;104(2):550- 557.

373. Grundler R, Brault L, Gasser C, et al. Dissection of PIM serine/threonine kinases in FLT3-ITD- induced leukemogenesis reveals PIM1 as regulator of CXCL12-CXCR4-mediated homing and migration. *J Exp Med*. 2009;206(9):1957-1970.

374. Nervi B, Ramirez P, Rettig MP, et al. Chemosensitization of acute myeloid leukemia (AML) following mobilization by the CXCR4 antagonist AMD3100. *Blood*. 2009;113(24):6206-6214.

375. Zeng Z, Shi YX, Samudio IJ, et al. Targeting the leukemia microenvironment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to kinase inhibitors and chemotherapy in AML. *Blood*. 2009;113(24): 6215-6224.

376. Levis M, Brown P, Smith BD, et al. Plasma inhibitory activity (PIA): a pharmacodynamic assay reveals insights into the basis for cytotoxic response to FLT3 inhibitors. *Blood*. 2006;108(10): 3477-3483.

377. Levis M, Smith BD, Beran M, et al. A randomized, open-label study of lestaurtinib (CEP-701), an oral FLT3 inhibitor, administered in sequence with chemotherapy in patients with relapsed AML harboring FLT3 activating mutations: clinical response correlates with successful FLT3 inhibition [abstract]. *Blood*. 2005;106:Abstract 121a.

378. Knapper S, Burnett A, Hills RK, Small D, Levis M. Lestaurtinib FLT3 inhibitory activity is modulated by concomitant azole therapy and may influence relapse risk [abstract].

Blood. 2009;114:326a.

379. Levis M, Allebach J, Tse KF, et al. A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood*. 2002; 99(11):3885-3891.

380. Pratz KW, Cortes J, Roboz GJ, et al. A pharmacodynamic study of the FLT3 inhibitor KW-2449 yields insight into the basis for clinical response. *Blood*. 2009;113(17):3938-3946.

381. Shiotsu Y, Kiyoi H, Ishikawa Y, et al. KW-2449, a novel multikinase inhibitor, suppresses the growth of leukemia cells with FLT3 mutations or T315I-mutated BCR/ABL translocation. *Blood*. 2009;114(8):1607-1617.

382. Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, et al. Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood*. 2005;105(1):54-60.

383. Qiu C, Tarrant MK, Boronina T, et al. In vitro enzymatic characterization of near full length EGFR in activated and inhibited states. *Biochemistry*. 2009; 48(28):6624-6632.

384. Liu Y, Gray NS. Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. *Nat Chem Biol*. 2006;2(7):358-364.

385. Ravandi F, Cortes JE, Jones D, et al. Phase I/II study of combination therapy with sorafenib, idarubicin, and cytarabine in younger patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2010; 28(11):1856-1862.

386. Stone RM, Fischer T, Paquette R, et al. Phase IB study of PKC412, an oral FLT3 kinase inhibitor, in sequential and simultaneous combinations with daunorubicin and cytarabine (DA) induction and high-dose cytarabine consolidation in newly diagnosed patients with AML [abstract]. *Blood*. 2005; 106:121a.

387. Zheng R, Piloto O, Small D. FLT3 ligand is required for full activation of FLT3 mutants [abstract]. *Blood*. 2006;108(11):186a.

388. D. Gary Gilliland and James D. Griffin ;The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia;; 2002 100: 1532-1542; *Prepublished online May 24, 2002*; doi:10.1182/blood-2002-02-0492.

389. Vempati S, Reindl C, Kaza SK, et al. Arginine 595 is duplicated in patients with acute leukemias carrying internal tandem duplications of FLT3 and modulates its transforming potential. *Blood*. 2007; 110:686-694.

390. Griffith J, Black J, Faerman C, et al. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell*. 2004;13:169-178.

- 391.** Reindl C, Bagrintseva K, Vempati S, et al. Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML. *Blood*. 2006;107:3700-3707.
- 392.** Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, et al. Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2006;107:3724-3726.
- 393.** Gale RE, Green C, Allen C, et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008;111:2776- 2784.
- 394.** Schnittger S, Schoch C, Kern W, Haferlach T. 3 position of the FLT3-LM and loss of heterozygosity are highly correlated to unfavourable outcome in AML. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2006; 108:807.
- 395.** Weisberg E, Barrett R, Liu Q, Stone R, Gray N, Griffin JD. FLT3 inhibition and mechanisms of drug resistance in mutant FLT3-positive AML. *Drug Resist Updat*. 2009;12(3):81-89.
- 396.** Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med*. 2001; 344:1038-1042.
- 397.** Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2001;344:1031-1037.