



Universidad Nacional de Buenos Aires

Maestría en Biología Molecular Médica

DETERMINACIÓN DE LAS MUTACIONES EN LOS GENES *NPM1* Y *CEBPA*  
EN LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA PEDIÁTRICA  
MEDIANTE PCR Y *GENESCANNING*

Bioq. Patricia Rubio Longo

Directora de tesis: Dra. Cristina N. Alonso

Laboratorio de Biología Molecular - Servicio de Hematología y Oncología

Hospital de Pediatría "Prof. Dr. J.P. Garrahan"

Año 2014

Quisiera agradecer a Cristina Alonso, Marisa Felice y Adriana Medina por ayudarme realizar esta tesis y por alentarme siempre a seguir adelante.

Dedico esta tesis a mis papas, a mis hermanas Ceci y Fabi, a mis sobrinos Bruno y Sofia, a Daniel, Euge y Vane, porque todas las cosas buenas de mi vida han ocurrido gracias a que ellos están a mi alrededor.

## **RESUMEN**

**Introducción:** Las mutaciones de *NPM1*, *CEBPA* y *FLT3* se encuentran en 25-35% de las LMA de adultos. Estas mutaciones se correlacionan con el pronóstico de la enfermedad, especialmente en LMA con cariotipo normal (CN). Hay pocos informes sobre la incidencia e importancia de estas mutaciones en LMA pediátrica y no hay datos de Argentina.

**Objetivo:** Describir la incidencia de estas mutaciones y analizar el impacto clínico y pronóstico de las mutaciones en nuestra institución.

**Pacientes y Métodos:** Se analizaron retrospectivamente muestras de 216 niños con LMA. La mediana de edad fue de 7,0 [0,0-17,9] años, incluyendo 44 pacientes menores a un año. El 15% de los pacientes presentaron CN. La detección de mutaciones *NPM1* y *CEBPA* fueron realizadas por *Gene-Scanning*; las mutaciones *FLT3*-ITD y *FLT3*-TKD fueron estudiadas por RT-PCR y RFLP, respectivamente. Los casos positivos se caracterizaron además por secuenciación.

**Resultados:** La incidencia de las mutaciones estudiadas fueron: *NPM1*<sup>mut</sup>:4,2%, *CEBPA*<sup>mut</sup>:1,9%, *FLT3*-ITD:10,2% y *FLT3*-TKD:7,9%. En LMA con CN fueron: *NPM1*<sup>mut</sup>:24,2%, *CEBPA*<sup>mut</sup>:12,1%, *FLT3*-ITD:15,2% y *FLT3*-TKD:6,1%. La media de edad fue: *NPM1*<sup>mut</sup>:13,4 años, *CEBPA*<sup>mut</sup>:11,6 años, *FLT3*-ITD:13,8 años y *FLT3*-TKD: 8,0 años. *NPM1* y *CEBPA* mostraron asociación significativa con CN ( $p < 0,00001$ ,  $p = 0,001$ , respectivamente), mientras que *FLT3*-ITD se asoció con *PML/RARA* ( $p < 0,0001$ ). Los subtipos FAB observados con mayor frecuencia fueron: *NPM1*<sup>mut</sup>:M2 ( $p = 0,1322$ ), *CEBPA*<sup>mut</sup>:M2 ( $p = 0,0281$ ), *FLT3*-ITD:M3 ( $p = 0,0002$ ) y *FLT3*-TKD:M5 ( $p = 0,3258$ ). Las edades de los pacientes con

NPM1<sup>mut</sup>, CEBPA<sup>mut</sup> y FLT3-ITD fueron significativamente mayores ( $p=0,0001$ ,  $p=0,0368$  y  $p<0,00001$  respectivamente). FLT3-TKD fue la única mutación detectada en 11,4% de los pacientes menores de 1 año.

Las probabilidades de sobrevida libre de eventos (pSLE) y error estándar (EE) fueron: LMA Total:48,9(3,8)%, NPM1<sup>mut</sup>:75,0(15,3)%, CEBPA<sup>mut</sup>:75,0(21,7)%, FLT3-ITD: 59,6(11,1)%, FLT3-TKD: 46,0(16,2)%y NPM1<sup>mut</sup>/CEBPA<sup>mut</sup>/FLT3-ITD<sup>neg</sup>:80,8(12,2)%( $p=0,2002$ ). Las pSLE (SE) de los pacientes NPM1<sup>mut</sup>/CEBPA<sup>mut</sup>/FLT3-ITD<sup>neg</sup> con CN fue de 78,8(13,4)%( $p=0,0593$ ) y en el grupo de riesgo alto fue de 80,8(12,3)% ( $p=0,0104$ ).

**Conclusiones:** Este es el primer reporte de las frecuencias de mutaciones en *NPM1*, *CEBPA* y *FLT3* en LMA pediátrica en nuestro país. Las incidencias de NPM1<sup>mut</sup> y CEBPA<sup>mut</sup> fueron significativamente más altas en la LMA con cariotipo normal. Nuestros datos confirman el pronóstico favorable de LMA con genotipos NPM1<sup>mut</sup>/FLT3-ITD<sup>neg</sup> y/o CEBPA<sup>mut</sup>/FLT3-ITD<sup>neg</sup>, apoyando la postulación de este grupo como un nuevo subtipo de LMA con mejor pronóstico.

## **ABSTRACT**

**Background:** Mutations of *NPM1*, *CEBPA* and *FLT3* are found in 25 to 35% of adult-AML. These mutations correlate with outcome, especially in AML with normal karyotype. There are few reports concerning the incidence and significance of these mutations in childhood-AML and there is no data from Argentina.

**Objective:** To describe the incidence of these mutations and to analyze the clinical and prognostic impact in the outcome in our setting.

**Methods:** Samples from 216 children treated with AML protocols were retrospectively analyzed. The mean age at diagnosis was 6.8 [0.0-17.9] years, including 44 patients younger than 1 year of age. Fifteen percent/ Of them, 15%/presented a normal karyotype (NK). Detection of *NPM1* and *CEBPA* mutations was performed by Gene-scanning; *FLT3*-ITD and *FLT3*-TKD were studied by RT-PCR and RFLP respectively. Positive cases were further characterized by sequencing analysis.

**Results:** The incidences of the studied mutations were: *NPM1*<sup>mut.</sup>: 4.2%, *CEBPA*<sup>mut.</sup>: 1.9%, *FLT3*-ITD: 10.2% and *FLT3*-TKD: 7.9%. Within the group of AML with NK the incidences were: *NPM1*<sup>mut.</sup>: 24.2%, *CEBPA*<sup>mut.</sup>: 12.1%, *FLT3*-ITD: 15.2% and *FLT3*-TKD: 6.1%. The mean age for each subgroup was: *NPM1*<sup>mut.</sup>: 13.4 years, *CEBPA*<sup>mut.</sup>: 11.6 years, *FLT3*-ITD: 13.8 years and *FLT3*-TKD: 8.0 years. *NPM1* and *CEBPA* showed significant association with NK ( $p < 0.00001$  and  $p = 0.001$ , respectively), and *FLT3*-ITD with PML-RARA ( $p < 0.0001$ ). The most frequently observed FAB subtypes were: *NPM1*<sup>mut.</sup>: M2 ( $p = 0.1322$ ), *CEBPA*<sup>mut.</sup>: M2 ( $p = 0.0281$ ), *FLT3*-ITD: M3 ( $p = 0.0002$ ) and *FLT3*-TKD: M5 ( $p = 0.3258$ ). The age of

patients with FLT3-ITD<sup>mut</sup>, NPM1<sup>mut</sup> and CEBPA<sup>mut</sup> were significantly higher (p=0.0001, p=0.0368 y p<0.00001 respectively). FLT3-TKD was the only mutation detected in 11.4% of patients younger than 1 year of age.

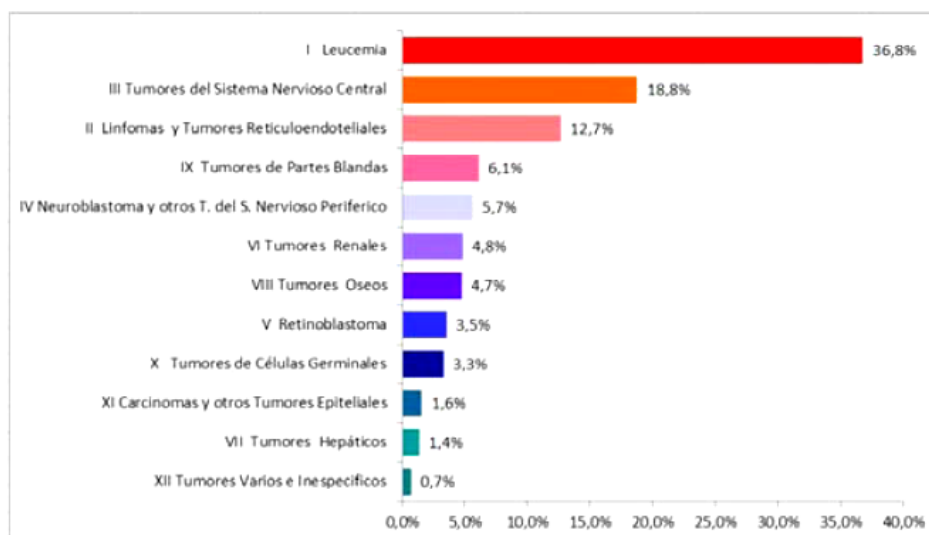
The event-free survival probabilities (pEFS) and standard error (SE) were: Total AML: 48.9(3.8)%, NPM1<sup>mut</sup>: 75.0(15.3)%, CEBPA<sup>mut</sup>: 75.0(21.7)%, FLT3-ITD: 59.6(11.1)%, FLT3-TKD: 46.0(16.2)% y NPM1<sup>mut</sup>/CEBPA<sup>mut</sup>/FLT3-ITD<sup>neg</sup>: 80.8(12.2)%(p=0.2002). The pEFS (SE) of patients NPM1<sup>mut</sup>/CEBPA<sup>mut</sup>/FLT3-ITD<sup>neg</sup> with normal karyotype was 78.8(13.4)% (p=0.0593) and for the high risk group was 80.8(12.3)% (p=0.0104).

**Conclusions:** This is the first report of the frequencies of *NPM1*, *CEBPA* and *FLT3* mutations in childhood AML in our country. The incidences of NPM1<sup>mut</sup> and CEBPA<sup>mut</sup> were significantly higher in AML with normal karyotype. Our data confirm the favorable prognosis of AML with NPM1<sup>mut</sup>/FLT3-ITD<sup>neg</sup> and/or CEBPA<sup>mut</sup>/FLT3-ITD<sup>neg</sup> genotypes, supporting the notion that they should be considered as a new AML subset with better outcome.

## **1.INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Generalidades**

Las enfermedades malignas constituyen la primera causa de muerte asociada a enfermedad en los pacientes pediátricos en la ciudad de Buenos Aires. De acuerdo con los datos del Registro Oncopediátrico Argentino (ROHA), en nuestro país la tasa de incidencia de cáncer en menores de 15 años durante el período 2000-2009 fue de 128 casos anuales por cada 1.000.000 de niños y se ha mantenido estable a lo largo de dicho período. Las leucemias constituyen la enfermedad oncológica más frecuente (36,8%), seguida de los tumores del sistema nervioso central y los linfomas (Figura 1).



**Figura 1.** Distribución de casos según la clasificación Internacional de cáncer pediátrico (ICCC-3). Período 2000-2009 (n: 12.740). ROHA.

En nuestro país, el 78% de las leucemias agudas (LA) corresponde a leucemias linfoblásticas agudas (LLA), mientras que el 22% restante a leucemias mieloblásticas agudas (LMA). Según los registros del Hospital de

Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan, los pacientes con LMA presentan en el protocolo actual una probabilidad de supervivencia libre de eventos (pSLE) a cinco años de 54% para el total de pacientes, si bien para los pacientes de bajo riesgo la pSLE alcanza el 75% y en el grupo de pacientes de alto riesgo la pSLE es de 46%.

A pesar de los grandes avances que se han logrado en los últimos años en el tratamiento y el entendimiento de la biología de las leucemias agudas pediátricas, todavía es necesario desarrollar nuevos métodos para detectar factores pronósticos que permitan predecir cuáles pacientes pueden curarse con tratamientos menos agresivos y cuáles se benefician con tratamientos más intensivos.

Distintos factores permiten definir el pronóstico de la LMA, siendo los más importantes las características genético-moleculares al momento del diagnóstico y la respuesta temprana al tratamiento después de la fase de inducción. Los niños con determinadas anormalidades genéticas recurrentes (CBFB-MYH11, RUNX1-RUNX1T1 y menos de 10% del blastos al día 15 después de la inducción, muestran un 70-80% de probabilidad de supervivencia si no presentan eventos adversos [1]. En el caso de las LMA PML-RARA+ los factores pronósticos son el recuento leucocitario inicial y la determinación de enfermedad mínima residual (EMR) por técnicas de biología molecular y también se definen dentro del grupo de pronóstico menos desfavorable.

Sin embargo el resto de los pacientes que incluye a aquellos con cariotipo normal, características citogenéticas o moleculares adversas y/o con respuesta incompleta al tratamiento presentan una pSLE de alrededor del 30-40%,



siendo la recaída de la enfermedad la causa más frecuente de fallo del tratamiento [2].

La LMA es una enfermedad heterogénea desde el punto de vista citogenético, presentando el 50-60% de los pacientes alteraciones cromosómicas recurrentes, que se relacionan con el proceso leucemogénico y que proveen una importante información pronóstica [3]. En los pacientes con LMA sin alteraciones cromosómicas evidentes a nivel cromosómico, el mecanismo fisiopatogénico de la leucemia es todavía poco claro.

Además de las translocaciones cromosómicas, en la patogénesis de la LMA han sido involucradas un gran número de otras alteraciones genéticas, incluyendo mutaciones puntuales, deleciones, e inserciones.

Se ha propuesto que la fisiopatogenia de las leucemias resulta de la adquisición de por lo menos dos tipos de alteraciones moleculares complementarias: las mutaciones de Clase I que confieren una ventaja proliferativa o de supervivencia a progenitores hematopoyéticos, incluyendo mutaciones activantes del dominio tirosina quinasa como BCR-ABL, c-kit, *FLT3* y miembros de la familia del *Ras*; y las mutaciones de Clase II que producen bloqueo de la diferenciación celular normal mediante la inactivación de reguladores de la diferenciación, incluyendo rearrreglos como PML-RARA, o mutaciones puntuales de *CBF*, *NPM1* y *CEBPA* [3,4].

En los últimos años se han identificado alteraciones genéticas dentro de las LMA: las mutaciones de *CEBPA* (proteína alfa con unión al *enhancer* /CCAAT) y *NPM1* (nucleofosmina) cuya frecuencia en pacientes adultos se encuentra alrededor del 40% y 35% respectivamente [5-7]. De acuerdo con lo reportado

en la literatura internacional, las mutaciones de estos 2 genes son mutuamente excluyentes y se presentan generalmente asociadas a las LMA de cariotipo normal [5]. Existen publicaciones previas que reportan que aproximadamente el 40% de los pacientes que presentan mutaciones en *NPM1* tendrían además mutaciones en el gen *FLT3*, especialmente duplicaciones internas en tándem [7]. Estos pacientes con ambas mutaciones, para *NPM1* y *FLT3*-ITD tendrían una menor pSLE y sobrevida global (pSG) [8]. En ausencia de otros factores pronósticos, los pacientes con LMA que presentan mutaciones en *CEBPA* o *NPM1* corresponderían a un grupo de LMA con mejor pronóstico [9-13].

La clasificación de LMA vigente, publicada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2008, ha propuesto la incorporación de las LMA con mutaciones de *CEBPA* y *NPM1* al grupo de “LMA con anomalías genéticas recurrentes” basándose en estudios clínicos, genéticos, y de valor pronóstico [14]. Describe la importancia pronóstica de estas mutaciones dentro del subgrupo de LMA con cariotipo normal y en ausencia de mutaciones en el gen *FLT3*. Tanto las mutaciones de *NPM1* como de *CEBPA* están agregadas como “entidades provisionales” indicando que se necesitan más estudios para caracterizarlas y establecerlas como una entidad única [14].

La caracterización de nuevas mutaciones asociadas a LMA de cariotipo normal como el caso de *NPM1*, permite además de definir su rol en el pronóstico de las LMA, su uso para el monitoreo de la enfermedad mínima residual, a través del seguimiento de dichas mutaciones durante el tratamiento de esta enfermedad [15-17]. Las mutaciones detectadas en *NPM1* han demostrado ser altamente estables durante el curso de la enfermedad, pudiendo ser

detectadas al momento de la recaída de la leucemia, aún muchos años después del diagnóstico inicial [11]. La detección de cantidades mínimas de enfermedad, mediante técnicas de alta sensibilidad, indetectables por los métodos convencionales como la microscopía óptica, permite individualizar aquellos pacientes que presentan mayor riesgo de sufrir una recaída de su enfermedad, y que se beneficiarían con un tratamiento de mayor intensidad [11].

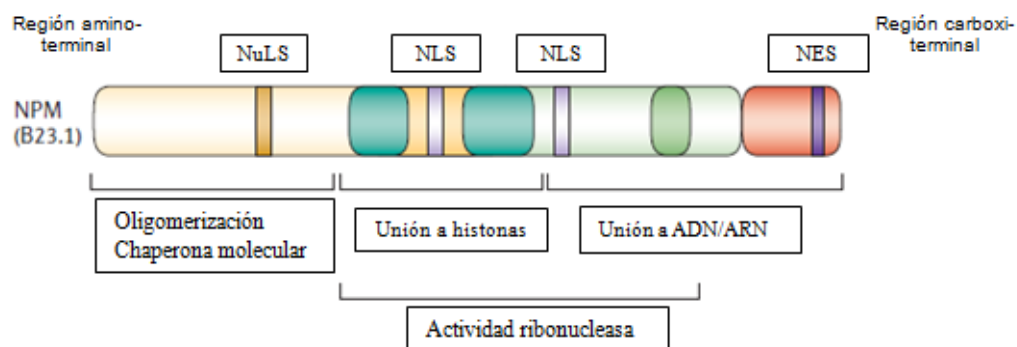
Los grandes avances en el conocimiento de los procesos moleculares involucrados en los eventos leucemogénicos, pueden además contribuir en el desarrollo de nuevas drogas dirigidas específicamente contra nuevos blancos terapéuticos con el fin de lograr la erradicación selectiva de las células leucémicas que presentan estas alteraciones moleculares, en lo que se denomina “terapias blanco”, es decir el uso de terapias individualizadas y seleccionadas de acuerdo a las características biológicas de las células leucémicas.

## **1.2 NPM1**

La nucleofosmina (*NPM1*), también llamada B23 o numatrina, es una proteína de 37 kDa codificada por el gen *NPM1*, ubicado en el cromosoma 5q35, que circula normalmente entre el núcleo y el citoplasma. Esta proteína multifuncional participa en las vías de regulación del crecimiento y proliferación celular. Puede prevenir la agregación de proteínas en el nucleolo y regula el ensamble y transporte de partículas pre-ribosomales a través de la membrana

nuclear. Está además involucrada en la regulación de la vía ARF-p53 en respuesta a la hipoxia, la irradiación UV o diferentes drogas citotóxicas [18].

La proteína NPM1 contiene varios dominios funcionales que le permiten ejercer sus diversas funciones celulares (Figura 2). En la región amino-terminal, contiene un segmento hidrofóbico involucrado en la oligomerización de la proteína y en su actividad chaperona, seguido por dos regiones ácidas que participan en su unión a histonas. En la porción central, se ubican dos dominios ácidos necesarios, junto con el dominio carboxi-terminal, para su actividad ribonucleasa. Esta última región contiene un sitio básico involucrado en la unión a ácidos nucleicos, seguido por dos residuos de triptófano (288 y 290) que son requeridos para la localización nucleolar de la proteína. Además, *NPM1* posee señales de exportación nuclear (NES), de localización nuclear (NLS) y de localización nucleolar (NuLS) [19].



**Figura 2.** Esquema de la proteína *NPM1*, indicando la ubicación de sus dominios funcionales. NES: señal de exportación nuclear, NLS: señal de localización nuclear y NuLS: señal de localización nucleolar.

Se han identificado hasta el momento dos variantes de *splicing* de *NPM1*, llamadas B23.1 y B23.2 que muestran los mismos 255 aminoácidos de la

región amino-terminal, pero los últimos 35 residuos de la región carboxi-terminal de B23.1 están ausentes en B23.2 [20].

Se ha descrito que el gen *NPM1* está involucrado en procesos de desarrollo tumoral, ya que se lo encuentra frecuentemente sobreexpresado en tumores sólidos de diferente origen histológico [21], y además participa en distintos rearrreglos cromosómicos detectados en leucemias y linfomas, que resultan en proteínas de fusión que contienen sólo la región N-terminal de la proteína como *NPM1-ALK* (*NPM1*-quinasa de linfoma anaplásico) correspondiente a la traslocación t(2;5)(p23;q35), *NPM1-RARA* (*NPM1*-receptor de ácido retinoico alfa) en la t(5;17)(q35;q12); y *NPM1-MLF1* (*NPM1*-factor de leucemia mieloide 1) en la t(3;5)(p25;q35) [22]. Finalmente, se han descrito también mutaciones en el exón 12 de *NPM1*, que afectan a la región C-terminal causando una expresión citoplasmática aberrante de la proteína en las células leucémicas.

Se postula que las LMA con mutación en *NPM1* podrían originarse a partir un pequeño subgrupo de *stem cells* hematopoyéticas pluripotentes que presentan la mutación en *NPM1*. Se cree que las mutaciones de *NPM1* y su localización ectópica en el citoplasma constituirían el evento leucemogénico primario. A pesar de la presencia de mutaciones en sólo uno de los alelos del gen *NPM1*, los productos mutados conservarían la capacidad de heterodimerizar con residuos carboxi-terminales de proteínas *wild-type*. Estos productos quimera de *NPM1* actuarían activando oncogenes a través de distintos mecanismos como alteración de la transcripción, bloqueo en la diferenciación y aumento de la proliferación. La alteración en la expresión de *NPM1* llevaría a interferir en su unión a ácidos nucleicos, unión a ATP, estimulación de la actividad de ADN

polimerasa y en la estabilización de p53 [22], así como también actuaría generando una estabilización inefectiva de la proteína supresora tumoral ARF conduciendo a una inactivación de la vía del ARF [21].

Hasta el presente, han sido descritas alrededor de 50 mutaciones en el exón 12 de *NPM1*, que producen un corrimiento del marco de lectura en la región que codifica para el motivo señal de exportación nuclear (NES) de la porción C-terminal de la proteína [7,11]. La mutación más frecuente, llamada mutación A, es una duplicación del tetranucleótido TCTG en posición 956-959 de la secuencia germinal de referencia (Número de acceso a *GenBank*: NM\_002520) que lleva a un reemplazo de los últimos 7 aminoácidos (WQWRKSL) por 11 residuos diferentes (CLAVEEVSLRK). Este tipo de mutación se encontraría presente en el 75-80% de los pacientes adultos con LMA con *NPM1* mutado [23,24]. Otras 3 mutaciones, llamadas B, C y D, incluyen distintas inserciones de 4 nucleótidos en posición 960, originando también un corrimiento del marco de lectura. En las mutaciones E y F, los nucleótidos GGAGG de posición 965 a 969 están deletados y presentan inserciones de dos diferentes secuencias de 9 pares de base (pb) [22]. Otras mutaciones descritas por Suzuki *et al*, incluyen la inserción de 4 nucleótidos en posición 960 resultando en el mismo corrimiento del marco de lectura que las mutaciones A-D: las mutaciones G (TTTG), H (CTTG), I (TAAG) y J (TATG) [4].

Las 10 proteínas de *NPM1* mutadas más descritas muestran pérdida de por lo menos uno de los residuos triptofano (W) de las posiciones 288 y 290, y conservan los mismos últimos 5 residuos aminoacídicos (VSLRK) (Tabla 1).

Wild type	GATCTCTG.....GCAGT... GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	DLWQWRKSL
Mutación A	GATCTCTG <b>TCTG</b> GCAGT.....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	DLCLAVEE <b>VSLRK</b>
Mutación B	GATCTCTG <b>CATG</b> GCAGT.....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	DL <b>C</b> MAVEE <b>VSLRK</b>
Mutación C	GATCTCTG <b>CGTG</b> GCAGT.....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	DL <b>C</b> VAVEE <b>VSLRK</b>
Mutación D	GATCTCTG <b>CCTG</b> GCAGT.....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	DL <b>C</b> LAVEE <b>VSLRK</b>
Mutación E	GATCTCTG.....GCAGT <b>CTTTGCCA</b> AGTCTCTTTAAGAAAATAG	DL <b>W</b> MSVEE <b>VSLRK</b>
Mutación F	GATCTCTG.....GCAGT <b>CCCTGGACA</b> AAGTCTCTTTAAGAAAATAG	DL <b>W</b> MSVEE <b>VSLRK</b>
Mutación G	GATCTCTG <b>TTTG</b> GCAGT.....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	DL <b>C</b> LAVEE <b>VSLRK</b>
Mutación H	GATCTCTG <b>CTTG</b> GCAGT.....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	DL <b>C</b> LAVEE <b>VSLRK</b>
Mutación I	GATCTCTG <b>TAAG</b> GCAGT.....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	DL <b>C</b> MAVEE <b>VSLRK</b>
Mutación J	GATCTCTG <b>TATG</b> GCAGT.....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	DL <b>C</b> KAVEE <b>VSLRK</b>

**Tabla 1.** Mutaciones en el exón 12 de *NPM1*. Se muestran las principales mutaciones descritas y sus consecuencias a nivel proteico. Número de acceso a *GenBank*: NM\_002520.

Falini *et al* han reportado que los pacientes con *NPM1* mutado tendrían baja o ausente expresión de CD34 por citometría de flujo, con un aumento de prevalencia de mutaciones de FLT3-ITD (duplicaciones internas en tándem de *FLT3*) y una buena respuesta a la terapia de inducción durante el tratamiento quimioterápico. Las LMA con *NPM1* mutado y cariotipo normal, en ausencia de FLT3-ITD, tendrían un pronóstico favorable, mientras que en caso de coexistencia con FLT3-ITD predominaría el efecto de la presencia de esta mutación, estaría asociada con un pronóstico más pobre [14].

Se han observado diferencias significativas en la distribución de las mutaciones en los subgrupos FAB. Los pacientes con mutaciones en *NPM1* corresponden predominantemente a los subtipos FAB-M2 y FAB-M5 y presentan una menor frecuencia en LMA de subtipo FAB M0, M4eo, M6 y M7; mientras que no se han detectado en el subtipo FAB-M3 [18].

Actualmente existen pocos trabajos que investiguen específicamente las mutaciones de *NPM1* en LMA pediátricas y la mayoría ha estudiado un bajo número de pacientes. Las frecuencias reportadas varían entre 6 y 12% [8,25-29]. El significado pronóstico de *NPM1* mutado en LMA pediátrica aún no es totalmente claro, aunque parece estar relacionado con mejores resultados de pSLE [9-11].

Hasta el momento, no han sido descritas posibles terapias moleculares dirigidas específicamente para LMA con *NPM1* mutado. Si bien estas células leucémicas expresan altos niveles de CD33, no se ha demostrado aún que el empleo de anticuerpos monoclonales anti-CD33, actualmente disponibles en el mercado, pueda ser beneficioso en el tratamiento quimioterápico [11].

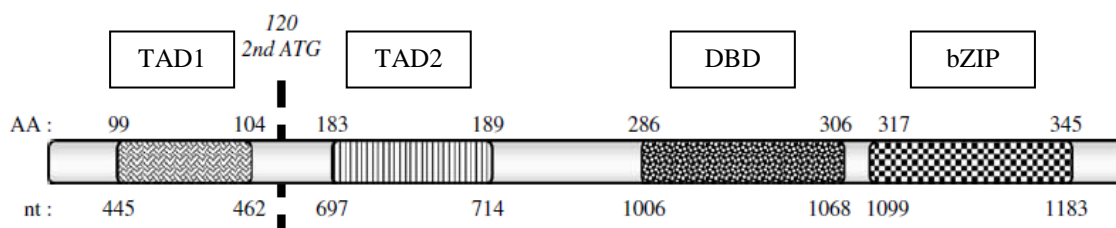
### **1.3 CEBPA**

El gen de *CEBPA* (Proteína alfa con unión al *enhancer* *CCAAT*) localizado en el cromosoma 9q13, codifica para un factor de transcripción de 42 kDa que posee en la región C-terminal un dominio básico de leucina (b-ZIP) que interviene en su dimerización y posterior unión al ADN, y 2 dominios de transactivación TAD1 y TAD2 en la zona N-terminal (Figura 3).

El gen de *CEBPA* puede ser traducido desde un primer codón de iniciación (AUG) a la isoforma normal de 42 kDa y desde el segundo AUG (nt 508–510) a la isoforma de 30 kDa, la cual carece de los primeros 119 aminoácidos que incluyen el dominio funcional TAD1. La isoforma de *CEBPA* normal, de 42 kDa, se encuentra implicada en la regulación de la proliferación y diferenciación de progenitores mieloides. La función de la isoforma de *CEBPA* de 30 kDa aún no



ha sido totalmente definida, sin embargo se ha demostrado que no posee la función normal de *CEBPA*-42 kDa y que tiene un efecto dominante negativo por lo cual podría ser parte de un mecanismo de regulación de la función normal del factor de transcripción.



**Figura 3.** Representación esquemática de los dominios funcionales de *CEBPA*. Dominio de transactivación 1 (TAD1), dominio de transactivación 2 (TAD2), dominio de unión al ADN (DBD) y dominio básico de leucina (bZIP).

Se han reportado 2 categorías de mutaciones de *CEBPA*: inserciones/delecciones con pérdida del marco de lectura entre los nucleótidos 640-880 (N-terminal) e inserciones/delecciones en marco de lectura entre los nucleótidos 1500-1600 (C-terminal) (Número de acceso a *GenBank*: U34070) [5]. Estas mutaciones no se distribuyen al azar sino que se concentran en regiones denominadas “puntos calientes” o “*hot-spots*”. Los *hot-spots* asociados a una mayor frecuencia de mutaciones están ubicados en la región codificante para TAD1, TAD2 y bZIP. Se han descrito además, casos con mutaciones bialélicas y casos con múltiples mutaciones en un mismo alelo [6]. Si bien todavía no se conoce exactamente de qué manera las mutaciones de *CEBPA* contribuyen a la leucemogénesis en las LMA, distintas publicaciones postulan dos mecanismos posibles de inhibición de la función normal de

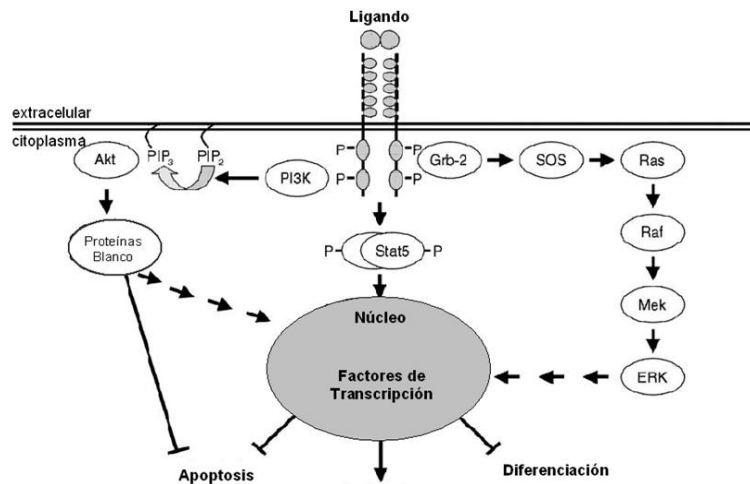
*CEBPA*: las mutaciones que alteran la región N-terminal que resultan en la expresión de la isoforma de 30 kDa, y las mutaciones que afectan a la región bZIP, alterando la unión de *CEBPA* al ADN [30].

La frecuencia de mutaciones reportadas en pacientes pediátricos con LMA se encuentran alrededor de 6 al 8 % [29,31]. Las mutaciones de *CEBPA* están más frecuentemente asociadas con los subtipos FAB M1, M2 o M4 [5,11,30]. Con respecto a las características inmunofenotípicas de los blastos, existen algunas publicaciones que asocian la presencia de mutaciones en *CEBPA* con la expresión de los marcadores CD7, CD15, CD34 y HLA-DR [30]. La LMA con cariotipo normal y *CEBPA* con ambos alelos mutados presentaría un pronóstico favorable similar al de los pacientes con LMA y *NPM1* mutado en ausencia de mutaciones en *FLT3-ITD* [11]. La influencia de las mutaciones en *FLT3-TKD* en el grupo de pacientes con *CEBPA* mutado no es aún del todo clara [14].

#### **1.4 FLT3**

El gen de *FLT3* (Receptor de tirosina-quinasa 3 similar a Fms) codifica para una proteína que pertenece a la familia de los receptores de tirosina quinasa 3. El receptor *FLT3* se encuentra presente en los precursores hematopoyéticos normales de médula ósea donde participa en el desarrollo de los progenitores de linfocitos B, de células dendríticas y de células NK, entre otras. La unión de su ligando al dominio extracelular de *FLT3* induce la dimerización de este receptor y la activación de sus dominios quinasa, su auto-fosforilación y posterior fosforilación de sus proteínas sustrato: STAT-5, PI3K, RAS, PLC,

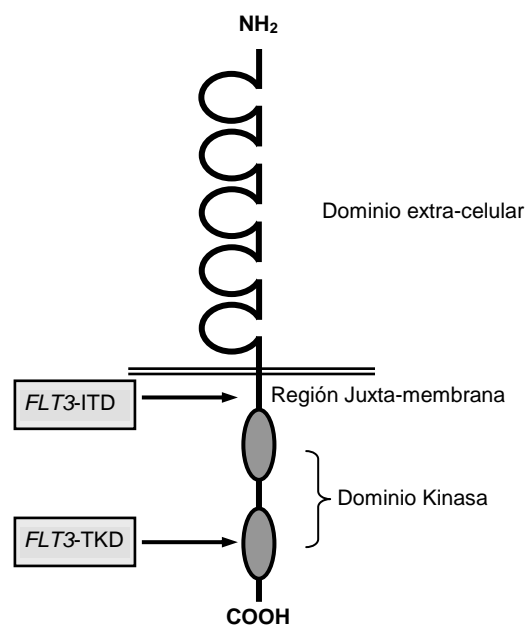
MAPK, ERK1/2, SHC, SHP2 y SHIP, todas ellas relacionadas con los mecanismos de proliferación, diferenciación y supervivencia de las células hematopoyéticas [32,33] (Figura 4).



**Figura 4.** Vías de Señalización Intracelular de *FLT3*.

Tanto *FLT3* como su ligando se encuentran sobre-expresados de manera aberrante en la mayoría de las leucemias agudas pediátricas, incluyendo las LLA precursor B, las LLA de pacientes menores de un año, LMA y crisis blásticas de Leucemia Mieloide Crónica. Además de estas alteraciones en los niveles de expresión del gen normal, muchas leucemias presentan mutaciones en el gen *FLT3* que resultan en la activación constitutiva de este receptor; esto genera señales de proliferación anormalmente elevadas que se encuentran directamente asociadas al proceso leucemogénico [33]. La mutación más frecuentemente publicada en la literatura es la duplicación interna en tándem (*FLT3-ITD*) en el dominio juxta-membrana del receptor, codificado por los exones 14 y 15 del gen *FLT3*. Dichas mutaciones resultan de la repetición en

tándem de un número variable de pares de bases de la secuencia de *FLT3* manteniendo el marco de lectura, dando como resultado una proteína de mayor longitud que la normal [34]. El segundo tipo más frecuente de mutación involucra la zona de activación (FLT3-TKD) también llamadas “*activating loop mutations*” que afectan el dominio tirosina-quinasa (TKD) de *FLT3*, codificado por el exón 20, y consisten fundamentalmente en mutaciones puntuales o deleciones que afectan al aspártico o a la isoleucina de las posiciones 835 (D835) y 836 (I836) [35] (Figura 5). También se han descrito casos esporádicos de mutaciones puntuales en el dominio juxtamembrana y en la serina de la posición 840 del TKD [36,37].



**Figura 5.** Representación esquemática de la estructura del receptor FLT3 y ubicación de las mutaciones más frecuentes.

En LMA pediátrica las mutaciones más frecuentemente encontradas son las FLT3-ITD, con prevalencias que varían entre 10 y 17% en las distintas series

publicadas y alcanzan el 30% en las LMA de cariotipo normal [11,29,38-40]. Se presentan además con mayor frecuencia en los subtipos FAB M3 y M5. Las FLT3-TKD ocurren aproximadamente en un 2 a 8% de los pacientes [29,41-43], correspondiendo ambos tipos de mutaciones a un 18-25% de las LMA pediátricas, representando una de las alteraciones moleculares más frecuentes en esta patología [44]. Por otra parte, distintos estudios han demostrado el valor de las mutaciones FLT3-ITD como factor de riesgo adverso independiente, mientras que lo mismo no ha sido demostrado para las FLT3-TKD [38,39,45,46].

Con respecto a las LLA pediátricas, las frecuencias reportadas de mutaciones en *FLT3* son muy bajas, excepto cuando se analizan leucemias en población de infantes (pacientes menores de 1 año de edad al momento del diagnóstico de la leucemia) con rearrreglos del gen *MLL*, en las cuales se ha reportado hasta un 17% de FLT3-TKD [47-49]. Teniendo en cuenta que aproximadamente un 70-80% de los casos en infantes presentan alteraciones en el gen *MLL*, ellas constituyen otro grupo de especial interés para el estudio de mutaciones en *FLT3*.

En la actualidad se han descrito varias drogas que actúan inhibiendo al receptor *FLT3* con actividad demostrada tanto en estudios sobre líneas celulares como en modelos animales, entre ellas PKC412, AG1295, CT53518, CEP-701, SU5416, SU5614, SU11248 y MLN518. Los primeros ensayos clínicos en adultos presentan resultados preliminares promisorios y se proyecta realizar ensayos clínicos en niños [46,48,50-54]. La expectativa se encuentra centrada en que la adición a los esquemas de quimioterapia clásica de drogas

que inhiban en forma selectiva la actividad proliferativa del receptor *FLT3* mutado o sobre-expresado permita aumentar la eficacia del tratamiento sin agregar efectos tóxicos no deseados.

### **1.5 Objetivos**

El presente estudio tiene como objetivos: realizar la puesta a punto de la determinación de las mutaciones de *NPM1* y *CEBPA*; estudiar la incidencia de las mutaciones de *NPM1* y *CEBPA* en pacientes pediátricos con diagnóstico de LMA; correlacionar mutaciones de *NPM1* y *CEBPA* con características clínicas, morfológicas, genéticas e inmunofenotípicas; analizar la correlación entre la presencia de mutaciones en *FLT3*, *NPM1* y *CEBPA*; y evaluar la utilidad de las mutaciones *NPM1* y *CEBPA* como factor pronóstico de evolución clínica de los pacientes con LMA, comparando la correlación entre presencia de mutaciones y probabilidad de sobrevida libre de evento y probabilidad de sobrevida libre de leucemia.

## **2. PACIENTES Y MÉTODOS**

### **2.1 Población**

El estudio de las mutaciones de *NPM1* y *CEBPA* fue realizado en muestras de ADN obtenidas de 216 pacientes con diagnóstico de LMA ingresadas al Laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Hematología y Oncología del Hospital de Pediatría Garrahan entre Marzo de 2000 y Mayo de 2014. En todos los casos el diagnóstico de LMA fue realizado de acuerdo a los criterios morfológicos, citoquímicos, de inmunofenotipo y citogenético de la clasificación de la OMS [14]. Además, en el 92% de los casos se realizaron estudios moleculares para la detección por RT-PCR de uno o más de los genes de fusión PML/RARA, RUNX1/RUNX1T1, CBFβ/MYH11 y/o MLL/MLLT3 por técnicas ya establecidas [55]. En todos los pacientes se investigaron las mutaciones en el gen *FLT3*: FLT3-ITD y FLT3-TKD.

Fueron excluidos del análisis los pacientes portadores de Síndrome de Down y aquellos con diagnóstico de sarcoma mielóide aislado (sin compromiso de médula ósea), con la finalidad de hacer más homogénea a la población en estudio.

En todos los casos se obtuvo consentimiento informado de los padres o tutores para la realización de estudios moleculares y el estudio fue aprobado por el comité de docencia e investigación de nuestra Institución (Proyecto 592 Dirección Asociada de Docencia e Investigación).

El análisis de respuesta al tratamiento y supervivencia [probabilidad de supervivencia libre de eventos (pSLE) y de supervivencia global (pSG)] fue realizado sobre una población de 201 pacientes evaluables, ya que fueron excluidos 9 pacientes con leucemias

secundarias a tratamiento quimioterápico previo (segunda enfermedad maligna) y 6 pacientes que al momento del ingreso al hospital Garrahan habían recibido tratamiento quimioterápico en otra institución. La probabilidad de sobrevida libre de leucemia (pSLL) fue estudiada en la población de 169 pacientes que alcanzaron la remisión completa (RC).

## **2.2 Definición de variables de estudio y medición de resultados**

El estudio de mutaciones en los genes *NPM1*, *CEBPA* y *FLT3* fue realizado sobre células mononucleares obtenidas por centrifugación con gradiente de densidad a partir de muestras de médula ósea (o sangre periférica cuando el recuento leucocitario fue mayor a  $100 \times 10^9/L$ ) y preservadas a  $-80^\circ C$  hasta su utilización.

Las mutaciones de *NPM1* y *CEBPA* fueron estudiadas a partir de ADN genómico en todos los casos. El ADN total correspondiente a  $10 \times 10^6$  células mononucleares fue extraído utilizando *kit* de extracción de ADN QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany).

Las mutaciones de *FLT3* fueron estudiadas a partir de ADN copia (ADNc) en todos los casos. El ARN total correspondiente a  $10 \times 10^6$  células mononucleares fue extraído utilizando el método de tiocianato de guanidina - fenol - cloroformo (Trizol®, Invitrogen). La reacción de retrotranscripción fue realizada de acuerdo a lo descrito en el protocolo BIOMED-1, a partir de  $1 \mu g$  de ARN utilizando  $0,25 \mu g$  de hexámeros al azar, 200 U de Transcriptasa Reversa (MMLV, Promega), 40 U de inhibidor de RNAsas (RNAguard, Amersham Biosciences), en un volumen final de  $20 \mu l$  [55].



Para la detección de mutaciones en *NPM1* y *CEBPA* se realizaron reacciones de PCR utilizando oligonucleótidos marcados con moléculas fluorescentes, según el detalle de la Tabla 2 [5]. Los productos de PCR fluorescentes fueron sometidos a electroforesis capilar en un secuenciador automático de ADN (Modelo ABI-Prism 3130; Applied Biosystems) y el análisis de los fragmentos fue realizado utilizando el software GeneMapper v4.0.

Gen	Región	Primer	Secuencia 5'-3'	Tamaño del producto
CEBPA	TAD1	TAD1-F	<b>6-FAM</b> -TCGGCCGACTTCTACGAGGC	326 pb
		TAD1-R	GCGCCCGGGTAGTCAAAGT	
	TAD2	TAD2-F	<b>HEX</b> -TACCTGGACGGCAGGCTGGA	251 pb
		TAD2-R	TGCAGGTGCATGGTGGTCT	
	bZIP	ZIP-F	<b>6-FAM</b> -AGAAGTCGGTGGACAAGAACAGCAA	246 pb
		ZIP-R	AGTTGCCCATGGCCTTGAC	
NPM1	NPM1	NPM1-F	<b>6-FAM</b> -AGTTAACTCTCTGGTGGTAGATGAAA	236 pb
		NPM1-R	AGGACAGCCAGATATCAACTGTTAC	

**Tabla 2.** Oligonucleótidos utilizados para la detección de mutaciones en *NPM1* y *CEBPA* mediante PCR y *GeneScanning*.

Las muestras de pacientes sin mutaciones en *NPM1* mostraron sólo un pico en la posición 236, mientras que las muestras de pacientes heterocigotas tuvieron un doble pico, uno correspondiente al alelo normal de 236 pb y otro al mutado. En el caso de *CEBPA* se observaron picos de alelos normales en las posiciones 326, 251, 246 correspondientes a los fragmentos amplificados de TAD1, TAD2 y bZIP, respectivamente, y en los casos mutados se observaron picos en posición distinta de la normal en función del número de nucleótidos delecionados o insertados. Los

casos positivos para mutación de *NPM1* y *CEBPA* fueron secuenciados para caracterizar las mutaciones utilizando el equipo de secuenciación Big Dye Terminator v1.1 (Applied Biosystems) y secuenciador automático de ADN (Modelo ABI-Prism 3130; Applied Biosystems). La detección de FLT3-ITD se realizó por amplificación de los exones 14 y 15 del gen que abarcan los dominios transmembrana y juxtamembrana de *FLT3*, utilizando 1 µl de ADNc y los *primers* R5: 5'-TGTCGAGCAGTACTCTAAACA-3' (*sense*) y R6: 5'-ATCCTAGTACCTTCCCAAACACTC-3' (*antisense*), en las condiciones descritas en la literatura [34]. La presencia de duplicaciones internas se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 9% y visualización a la luz UV previa tinción con Bromuro de Etidio. El Peso Molecular (PM) de la banda correspondiente al alelo normal fue de 366 pb; toda banda de mayor PM que el esperado fue escindida, eluída y secuenciada como se ha descrito para *NPM1* y *CEBPA*.

La detección de FLT3-TKD se realizó mediante la amplificación por PCR el exón 20 del gen *FLT3* con los *primers* 17F': 5'-CGCCAGGAACGTGCTTGT-3' (*sense*) y 17R': 5'-CATTGCCCTGACAACATAGT-3' (*antisense*), similares a los publicados [35], y posterior digestión del producto obtenido con la enzima de restricción *EcoRV*, que reconoce como sitio de corte a la secuencia normal correspondiente a los codones 835-836 de *FLT3* (GATATC). El producto de PCR tratado con *EcoRV* se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida al 9%, observándose la presencia de dos bandas de 67 y 37 pb correspondientes a la digestión del producto de PCR del alelo normal y/o una única banda de 104 pb correspondiente

al alelo mutado sin digerir. Las bandas no digeridas fueron secuenciadas para la completa caracterización de las mutaciones.

### **2.3 Procedimiento para recolección de datos**

En cada ensayo se incluyó un marcador de PM para detectar y caracterizar las mutaciones.

Para cada paciente se obtuvo un registro impreso e informático de los resultados de *GeneScanning* y de las secuencias. Los resultados de caracterización de las mutaciones fueron registrados en planillas con un número único asignado a cada paciente (UPN) y los mismos fueron correlacionados con los datos clínicos de los pacientes contenidos en la Base de Datos del grupo de tratamiento de leucemias del Servicio de Hematología y Oncología del Hospital de Pediatría Garrahan.

### **2.4 Plan de análisis: consideraciones estadísticas**

Se utilizó el programa *Statistix* versión 7.0 (*Analytical Software*, Florida, EEUU) para calcular los parámetros estadísticos descriptivos de los resultados obtenidos. Se analizaron las características diagnósticas de los pacientes con LMA (edad, sexo, recuento de leucocitos, inmunofenotipo, alteraciones citogenéticas, alteraciones moleculares, etc), con presencia o no de las mutaciones de los genes *NPM1*, *CEBPA* y *FLT3*. La asociación entre las características diagnósticas y las mutaciones estudiadas fueron analizadas a través de métodos bivariados. La significación estadística fue calculada usando chi-cuadrado o test de Fisher para las variables nominales y test de Student o test de Wilcoxon para las variables continuas numéricas. La significación estadística fue expresada como valores de p.

La pSLE (probabilidad de sobrevida libre de eventos) y pSLL (probabilidad de sobrevida libre de leucemia) fueron estimadas mediante el cálculo de Kaplan-Meier y el Error Estándar fue calculado por el método de Peto. Las curvas de sobrevida fueron comparadas a través del test de log-rank[56-58]. Las probabilidades de sobrevida reportadas se expresan como porcentaje de probabilidad estimada a 5 años  $\pm$  error estándar (EE).

#### **2.4.1 Parámetros de Sobrevida:**

Probabilidad de Sobrevida Libre de Eventos (pSLE): tiempo transcurrido desde la fecha del diagnóstico hasta la fecha del último control, o hasta la ocurrencia del primer evento adverso (respuesta nula, recaída, segunda enfermedad maligna o muerte por cualquier causa).

Probabilidad de Sobrevida Global (pSG): tiempo transcurrido desde la fecha del diagnóstico hasta la fecha del último control, o hasta la muerte por cualquier causa.

Probabilidad de Sobrevida Libre de Leucemia (pSLL): tiempo transcurrido desde la fecha de la remisión completa hasta la fecha del último control, o hasta el primer evento (recaída, segunda enfermedad maligna o muerte por cualquier causa).

#### **2.4.2 Eventos Adversos:**

Muerte: los fallecimientos de pacientes fueron clasificados como muertes durante la fase de inducción o muertes en remisión completa, según el momento del tratamiento en que ocurrió tal evento.

Respuesta Nula: falta de respuesta al tratamiento debido a resistencia primaria al mismo, luego de la administración de al menos dos ciclos de quimioterapia.

Recaída: reaparición de la enfermedad en cualquier momento luego de haber logrado la remisión completa. Se clasificaron las recaídas de acuerdo con su localización en: medular, extramedular o combinada.

Segunda enfermedad maligna: diagnóstico de una nueva neoplasia durante o luego del tratamiento de LMA. La segunda enfermedad maligna puede tratarse de una segunda leucemia o del desarrollo de un tumor sólido, para su diagnóstico es fundamental realizar la revisión detallada de ambos diagnósticos, de manera de confirmar que se trata de una enfermedad diferente a la primera neoplasia.

## **2.5 Criterios de asignación de grupos de riesgo**

Los criterios utilizados para la asignación de grupos de riesgo en el protocolo de tratamiento LMA-05, actualmente vigente en el hospital Garrahan, incluyen por un lado las alteraciones citogenéticas-moleculares con valor pronóstico y por otro lado la respuesta temprana al tratamiento, evaluada en el aspirado de médula ósea en el día 15 de la terapia.

De acuerdo a estos dos factores pronósticos los pacientes se estratifican en dos grupos: 1- pacientes con LMA de bajo riesgo o riesgo estándar y 2- pacientes con LMA de alto riesgo.

En el grupo de Bajo Riesgo o Riesgo Estándar, se incluyen los casos de LMA en los cuales se detectan las alteraciones citogenéticas RUNX1-RUNX1T1 y CBFβ-MYH11, que además presentan menos del 10% de blastos en el aspirado de médula ósea del día 15 del tratamiento, y que alcanzan la remisión completa en el día 29 de la fase de inducción.

Por otro lado, son considerados pacientes de Alto Riesgo aquellos casos de LMA en los cuales se ha descartado la presencia de las alteraciones citogenéticas del grupo de bajo riesgo, o aquellos casos de LMA en los cuales, independiente de su estudio citogenético, presenten más del 10% de blastos en la observación de la médula ósea del día 15 del tratamiento.

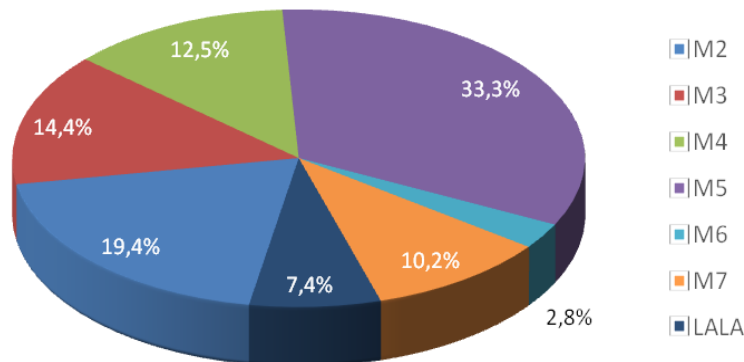
Existe además un grupo especial de LMA que corresponde a la leucemia promielocítica aguda (LPA) y que se estratifican en pacientes de bajo riesgo o riesgo estándar, cuando presentan menos de 10.000 leucocitos /mm<sup>3</sup> al momento del diagnóstico y que alcanzan la remisión molecular antes de iniciar la fase de mantenimiento. Mientras tanto, son consideradas LPA de alto riesgo aquellos casos en los cuales el recuento de leucocitos inicial es mayor de 10.000/mm<sup>3</sup> al momento del diagnóstico o que presentan EMR positiva antes del inicio de la fase de mantenimiento. Este grupo de pacientes recibe además un tratamiento individualizado debido a sus características especiales.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Población general

Entre Marzo de 2000 y Mayo de 2014, ingresaron al Laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Hematología y Oncología del Hospital de Pediatría Garrahan un total de 216 muestras de pacientes con diagnóstico de LMA, incluyendo 44 niños menores de un año de edad (infantes). La edad promedio fue de 7,0 años con un rango de 1 día hasta 17,9 años. En la Tabla 3 se describen las principales características clínicas, y distribución de subtipos FAB y alteraciones genéticas.

La distribución de los 216 pacientes con LMA de acuerdo con los subtipos FAB fue la siguiente: M2 (n=42), M3 (n=31), M4 (n=27), M5 (n=72), M6 (n=6), M7 (n=22) y leucemia aguda de linaje ambiguo (LALA) (n=16) (Gráfico 1).



**Gráfico 1:** Distribución de la población de pacientes con LMA según subtipo FAB.

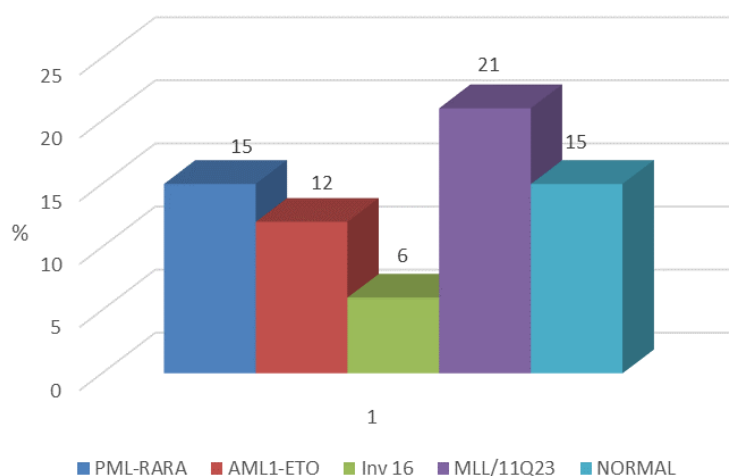
	LMA totales	NPM1 mut	CEBPA mut	FLT3-ITD	FLT3-TKD
N	216	9	4	22	17
Mediana edad [rango]	6,8 [0-17,9]	13,4 [7,3-16,7]	11,6 [8,4-14,6]	13,8 [2,2-16,8]	8,0 [0,3-14,8]
Sexo (n)					
Femenino	100	3	3	8	10
Masculino	106	6	1	14	7
Hemograma (mediana)					
WBC (10 <sup>9</sup> /L )	21,6	15,5	19,2	43,7	56,2
Hemoglobina (gr/dl)	8,1	8,2	8,3	7,4	7,7
Plaquetas (10 <sup>9</sup> /L)	32,5	83,0	37,0	22	29,0
Subtipos FAB (n)					
M2	42	4	3	5	3
M3	31			9	5
M4	27	2	1	4	1
M5	72	2		3	8
M6	6	1			
M7	22				
LALA	16			1	
Citogenético/Molecular (n)					
Normal	33	8	4	6	2
MLL/11Q23	45				4
t(15;17)(q24;q21)/PML-RARA	33			10	5
t(8;21)(q22;q22)/AML1-ETO	25			1	3
inv(16)(p13;q22)/CBFb-MYH11	12				1
ALT 7/7q-	12			1	
Otras alteraciones	50			3	1
Sin metafases	6	1		1	1

**Tabla 3:** Características de la población total de 216 pacientes estudiados y de los grupos que presentaron mutaciones en los genes analizados.

El estudio de las alteraciones moleculares recurrentes PML/RARA, RUNX1/RUNX1T1, CBFb/MYH11 y/o MLL/11q23 fue realizado en el 92% de los pacientes, los cuales se distribuyeron en función de estos transcritos de fusión del siguiente modo: PML/RARA (n: 33), AML1/ETO (n: 25), CBFb/MYH11 (n: 12) y MLL/11q23 (n: 45) (Gráfico 2). El 15% de los pacientes (n=33) presentó cariotipo



normal y ausencia de rearrreglos recurrentes. En cuanto a los pacientes menores de 1 año, la mediana de edad fue 4,5 (rango: 0,1-11,0) meses y la mediana de recuento de leucocitos fue 74,4 (rango: 2,1–500,0)  $\times 10^9/L$ . Se pudo observar que el 50% de los infantes presentaban alteraciones en el gen *MLL*.



**Gráfico 2:** Distribución de pacientes con LMA según de acuerdo con la presencia de alteraciones citogenéticas/moleculares.

Con respecto a la respuesta al tratamiento de los pacientes, el 82,4% de los pacientes incluidos en este estudio alcanzaron la remisión completa, 31 pacientes (14,4%) fallecieron durante la fase de inducción, y el 3,2% restante presentó respuesta nula al tratamiento.

El análisis de respuesta al tratamiento y sobrevida fue realizado sobre una población de 201 pacientes evaluables para pSLE, y la pSLL en la población de 169 pacientes que alcanzaron la remisión completa. En la Tabla 4 se muestran los parámetros de respuesta al tratamiento, el detalle de los eventos observados y los valores de pSLE para la población de 201 pacientes evaluables, en general y

clasificados según la presencia de las mutaciones estudiadas. El tiempo de seguimiento promedio de la población fue de 29 meses, con un rango entre 1 y 117 meses. La pSLL (EE) y sobrevida global (EE) fue de 58,0 (4,2)% y 52,0 (7,0)% respectivamente.

	Totales	NPM1 <sup>mut</sup>	CEBPA <sup>mut</sup>	FLT3-ITD	FLT3-TKD
Casos	201	9	4	20	16
Día 29 (%RC)	84,0	100,0	75,0	85,0	87,5
Muertes					
En inducción	12,9	-	25,0	15,0	12,5
En RC	7,0	11,1	-	-	-
Recaídas (%)					
MO	19,4	11,1	-	20,0	25,0
Combinadas	1,0	-	-	-	-
Otras	2,5	-	-	5,0	6,3
Totales	22,9	11,1	-	25,0	31,6
pSLE (EE) 5 años	48,9 (3,8)	75,0 (15,3)	75 (21,7)	59,6 (11,1)	46,0 (16,2)
pSLL (EE) 5 años	58,0 (4,2)	75,0 (15,3)	100,0(0,0)	70,1 (11,2)	52,6(17,9)

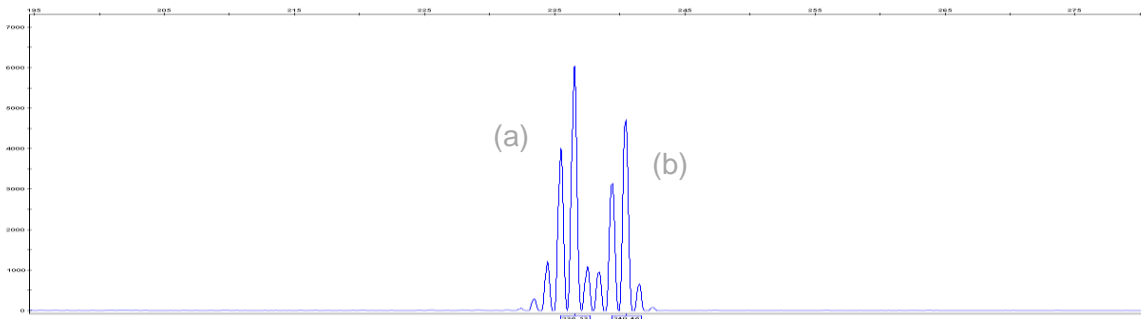
**Tabla 4:** Respuesta al tratamiento, eventos y seguimiento del total de pacientes y según presencia de las mutaciones estudiadas.

### 3.2 Mutaciones en el gen *NPM1*

Se detectaron mutaciones en el gen *NPM1* en 9 (4,2%) de los 216 pacientes estudiados mediante análisis de fragmentos (Gráfico 3). Cuatro de estos 9 pacientes presentaron la mutación de tipo A en el análisis de secuencia, (c.956\_959dupTCTG). En los 5 pacientes restantes se hallaron mutaciones no publicadas previamente: (c.961\_962insCCTTTTCCC), (c.956\_959insTGCC), (c.955\_958insATCT),(c.961\_962insTACTTTCCC)(c.961\_962indelTAGATCTCAGC AAGA) (Tabla 5).

	Secuencia genómica						Proteína	
<b>Wild Type</b>	gaccaagaggctattcaagatctct	g	gcag	t		ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DLWQWRKSL
<b>Mut A</b>	gaccaagaggctattcaagatctct	g	TCTG	gcag	t	ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DLCLAVEEVSLRK
<b>UPN 13</b>	gaccaagaggctattcaagatctct	g		gcag	t		aagtctctttaagaaaatag	286-DLWQSFSQVSLRK
<b>UPN 256</b>	gaccaagaggctattcaagatctct	g	TGCC	gcag	t	ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DLCAAVEEVSLRK
<b>UPN 286</b>	gaccaagaggctattcaagatctct	g		gcag	t		aagtctctttaagaaaatag	286-DLWQLLSQVSLRK
<b>UPN 888</b>	gaccaagaggctattcaagatctct	ATCT	g	gcag	t	ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DLYLAVEEEVSLRK
<b>UPN 1240</b>	gaccaagaggctattcaagatctct	g	gc				aagtctctttaagaaaatag	286-DLWQVSLRK

**Tabla 5:** Mutaciones detectadas en el gen *NPM1* y su consecuencia a nivel proteico. Las secuencias en rojo indican los nucleótidos insertados. Número de acceso a *GenBank*: NM\_002520.

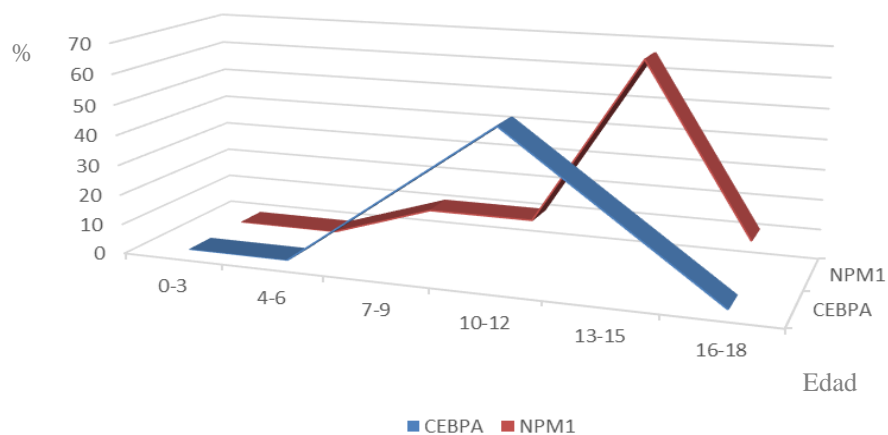


**Gráfico 3:** Electroferograma de fragmentos de PCR del estudio de *NPM1*. (a) Amplicón correspondiente al alelo normal de *NPM1*. (b) Amplicón correspondiente a inserción de 4 nucleótidos.

En 3 de las 5 mutaciones no reportadas previamente (UPN: 13, 286 y 1240), la proteína resultante conserva el triptófano en la posición 288, mientras que se observa pérdida del triptófano en posición 290 en todas las mutaciones, con inserción de los 5 residuos VSLRK finales. De los 33 pacientes con LMA que presentaron cariotipo normal, el 24,2% (n=8) presentaron mutaciones en *NPM1*, mostrando que la frecuencia de estas mutaciones es mayor en el grupo de pacientes con cariotipo normal con respecto a la población total ( $p < 0,00001$ ). El noveno caso correspondió a un paciente en el cual no se obtuvieron metafases

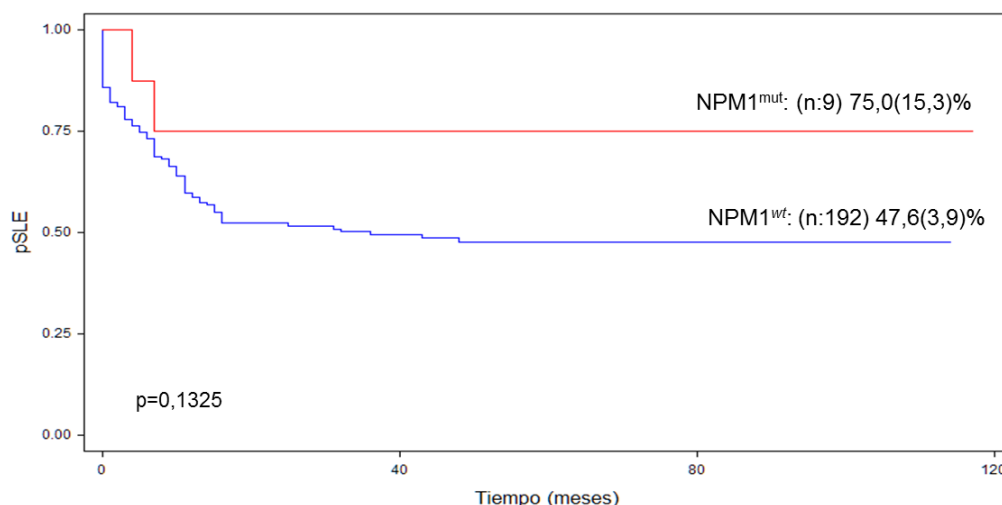
para el estudio citogenético, en el cual no se detectaron los rearrreglos recurrentes estudiados. En cuanto a la distribución de las mutaciones en función del subtipo FAB, las mutaciones de *NPM1* fueron halladas más frecuentemente en LMA-M2 (44%) aunque la asociación no fue significativa ( $p=0,1322$ ). La mediana de edad de los pacientes mutados fue de 13,4 (rango: 7,3-16,7) años, observándose una mayor incidencia de las mutaciones en pacientes de mayor edad ( $p=0,0001$ ) (Gráfico 4). Si bien las mutaciones de *NPM1* fueron detectadas más frecuentemente en niños (n: 6) que en niñas (n: 3), no se observaron diferencias significativas en cuanto a sexo y recuento leucocitarios.

En 2 casos de pacientes con mutaciones en *NPM1* fue detectada además mutación en *FLT3*-ITD, uno con inserción TGCC en *NPM1* y duplicación de 48 nucleótidos (nt) en *FLT3*, y otro caso con mutación A en *NPM1* y duplicación de 73 nt e inserción de 2 nt en *FLT3*.



**Gráfico 4:** Distribución de la incidencia de mutaciones en *NPM1* y *CEBPA* en función de la edad.

Todos los pacientes que presentaron mutación en *NPM1* alcanzaron la remisión completa. Un paciente con *NPM1* y FLT3-ITD mutado presentó recaída en médula ósea y murió debido a la progresión de la enfermedad luego de la recaída. El promedio de tiempo de seguimiento de los pacientes con *NPM1* mutado fue de 46 meses, con un rango entre 2 y 117 meses. Como se muestra en el gráfico 5, la pSLE (EE) de los pacientes con mutaciones en *NPM1* fue de 75 (15,3)% al igual que la pSLL.

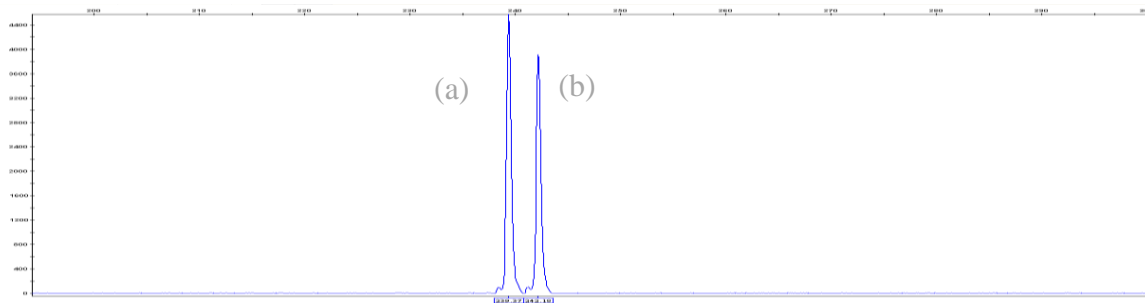


**Gráfico 5:** Curva de pSLE de acuerdo al status de *NPM1* en los 201 pacientes con LMA.

Los 9 pacientes con mutaciones en *NPM1* alcanzaron la remisión completa, y de ellos sólo 1 recayó a los 6 meses mientras que otro paciente falleció en remisión completa debido a sepsis. Los siete restantes permanecen en remisión completa continua, con una mediana de seguimiento de 23 meses. Dos de ellos han recibido trasplante de células precursoras hematopoyéticas como consolidación del tratamiento.

### 3.3 Mutaciones en el gen *CEBPA*

De los 216 pacientes estudiados para *CEBPA*, en 18 se observaron dobles picos en el electroferograma del análisis de fragmentos, uno correspondiente al alelo normal y otro al alelo mutado, como se muestra en el gráfico 6. Todas las muestras que presentaron doble pico fueron secuenciadas para confirmar y caracterizar las mutaciones.



**Gráfico 6:** Electroferograma de fragmentos de PCR del estudio de *CEBPA*. (a) Amplicón correspondiente al alelo normal de bZIP. (b) Amplicón correspondiente a la inserción de 3 nucleótidos.

Catorce de las 18 alteraciones detectadas (88% de los casos con mutaciones), correspondieron a mutaciones en el dominio TAD2 donde pudo observarse una inserción de 6 nucleótidos GCACCC en la secuencia genómica de ADN, que corresponde a un polimorfismo previamente reportado, por lo cual estos pacientes han sido excluidos del grupo de pacientes con mutación para el análisis estadístico [5]. La inserción de estos 6 nucleótidos se traduce es una duplicación histidina-prolina (Tabla 6). Las 4 mutaciones restantes, 1,9% del total de pacientes analizados, mostraron inserciones de 3 y 12 nucleótidos el dominio b-ZIP (Tabla 6), manteniendo el marco de lectura. En el UPN 1078, se observó una inserción de 12 nucleótidos entre las posiciones 1521-1522 del gen, resultando en una proteína

con inserción de 4 aminoácidos GKAT; en el paciente UPN 1146 una inserción de 3 nucleótidos entre 1502-1503 resultando en el cambio de una Valina por asparragina; en el UPN 1181 una inserción de 3 nucleótidos entre 1520-1521 lo que se traduce en una duplicación de Treonina; y finalmente el UPN 1238 una inserción 3 nucleótidos entre 1526-1527 que resulta en la secuencia NNK y pérdida de la secuencia QQ (Tabla 7).

Paciente	Hallazgos de Laboratorio		GeneScanning			Secuencia insertada <sup>#</sup>
	FAB	Cariotipo	TAD1	TAD2*	bZIP	
26	M5	MLL/11Q23	N	+6bp	N	GCACCC
189	M4	AML1-ETO	N	+6bp	N	GCACCC
383	M5	Otra alteración	N	+6bp	N	GCACCC
399	M5	AML1-ETO	N	+6bp	N	GCACCC
658	M7	Otra alteración	N	+6bp	N	GCACCC
754	M5	Normal	N	+6bp	N	GCACCC
1078	M2	Normal	N	N	+12bp	GGGAAGGCGACG
1099	M2	AML1-ETO	N	+6bp	N	GCACCC
1146	M4	Normal	N	N	+3bp	GAC
1146	M4	Normal	N	+6bp	N	GCACCC
1181	M2	Normal	N	N	+3bp	GTT
1199	M7	Otra alteración	N	+6bp	N	GCACCC
1238	M2	Normal	N	N	+3bp	GAA
1320	M2	ALT 7/7q-	N	+6bp	N	GCACCC
1648	M2	Normal	N	+6bp	N	GCACCC
1693	M5	MLL/11Q23	N	+6bp	N	GCACCC
1975	M7	Otra alteración	N	+6bp	N	GCACCC
2167	M3	PML-RARA	N	+6bp	N	GCACCC

**Tabla 6:** Descripción de los pacientes con mutaciones en *CEBPA*.

\* Inserción de 6 nucleótidos correspondientes a un polimorfismo previamente publicado.

# Numeración de secuencia de acuerdo al número de acceso a *GenBank*: U34070.

N: no mutado

UPN	Proteína
<i>wt</i>	KSRDKAKQRN.....VVETQQ.....KVLELTSDNDRLRR
1078	KSRDKAKQRN.....VVET <b>GKAT</b> QQ...KVLELTSDNDRLRR
1146	KSRKAKLQRN..... <b>N</b> VETQQ.....KVLELTSDNDRLRR
1181	KSRDKAKQRN.....VVET <b>T</b> QQ.....KVLELTSDNDRLRR
1238	KSRDKAKQRN.....VVET <b>NNK</b> .....KVLELTSDNDRLRR

**Tabla 7:** Cambios observados a nivel proteico en los 4 casos con mutaciones en el dominio bZIP del gen *CEBPA*.

La mediana de edad de los pacientes mutados fue de 11,6 (rango: 8,4-14,6) años. Al igual que en los casos con *NPM1* mutado, se observó una asociación significativa entre la presencia de mutaciones y edad de pacientes, siendo más frecuente las mutaciones en el grupo de pacientes de mayor edad ( $p=0,0368$ ) (Gráfico 4). En cuanto al subtipo FAB, tres de los cuatro pacientes pertenecían al subtipo FAB-M2 ( $p=0,0281$ ). La mediana de recuento leucocitario fue de 19,2 (rango: 7,2-340,0)  $\times 10^9/L$ . No se observaron diferencias significativas en cuanto a sexo y recuento de leucocitos.

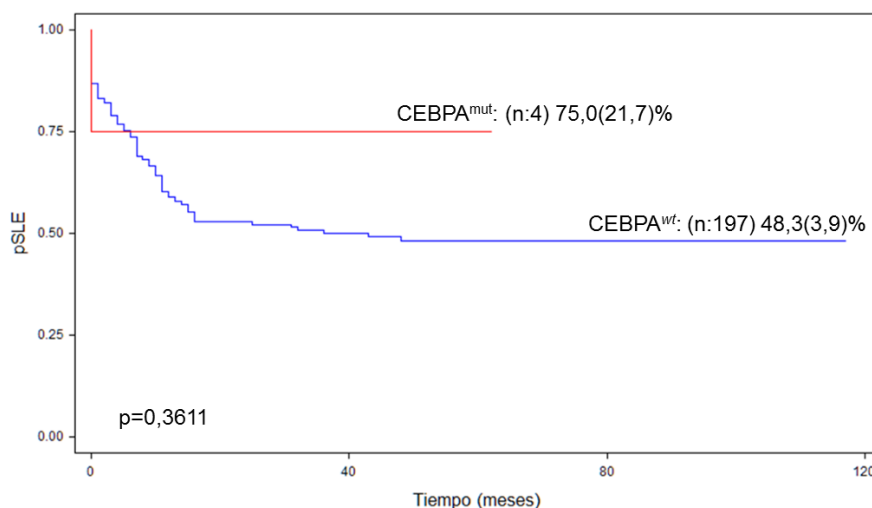
Los cuatro pacientes presentaron cariotipo normal y en ninguno de los casos se detectó alteraciones moleculares como PML/RARA, AML1/ETO, CBFb/MYH11 y/o MLL/11q23.

Si se considera la población de casos con cariotipo normal, se observa que la frecuencia de mutaciones en *CEBPA* asciende al 12,1%, resultando la frecuencia de mutaciones significativamente mayor en este grupo de pacientes ( $p<0,001$ ). En un paciente con mutación en el gen *CEBPA* se detectó además FLT3-TKD con una sustitución de aspártico por tirosina en la posición 836 de la proteína FLT3. El paciente con *CEBPA* mutado y FLT3-TKD murió durante la etapa de inducción de



tratamiento. Los 3 pacientes restantes alcanzaron la remisión completa y 2 de ellos recibieron trasplante de células precursoras hematopoyéticas. La mediana de meses de seguimiento fue de 56 meses mostrando una pSLE (EE) de 75,0(21,7)%. La pSLL fue de 100% (n: 3).

En el gráfico 7 se observan las curvas de pSLE de los pacientes con mutaciones en *CEBPA* y de los pacientes sin mutaciones en este gen.



**Gráfico 7:** Curva de pSLE de acuerdo al status de *CEBPA* en los 201 pacientes con LMA.

### 3.4 Mutaciones en el gen *FLT3*

Se detectaron mutaciones *FLT3*-ITD en 22 (10,2%) de los 216 pacientes con diagnóstico de LMA, observándose además en todos los casos la expresión del alelo normal. La secuenciación de los productos de PCR de longitud mayor que la normal mostró la presencia de fragmentos duplicados en tándem, todos ellos derivados del exón 14. La longitud de los fragmentos duplicados varió entre 15 y 111 nt (mediana: 57 nt) correspondientes a duplicaciones (mediana: 48, rango: 12-111) nt e inserciones (mediana: 6, rango: 1-18) pb. En todos los casos las

mutaciones mantuvieron el marco de lectura. En el grupo de LMA en pacientes menores de 1 año de edad no se detectaron FLT3-ITD.

Con respecto a las FLT3-TKD, fueron detectadas en 17 (7,9%) de 216 pacientes con LMA: 5 de 44 infantes (11,4%) y 12 de 172 niños mayores de un año (7,0%).

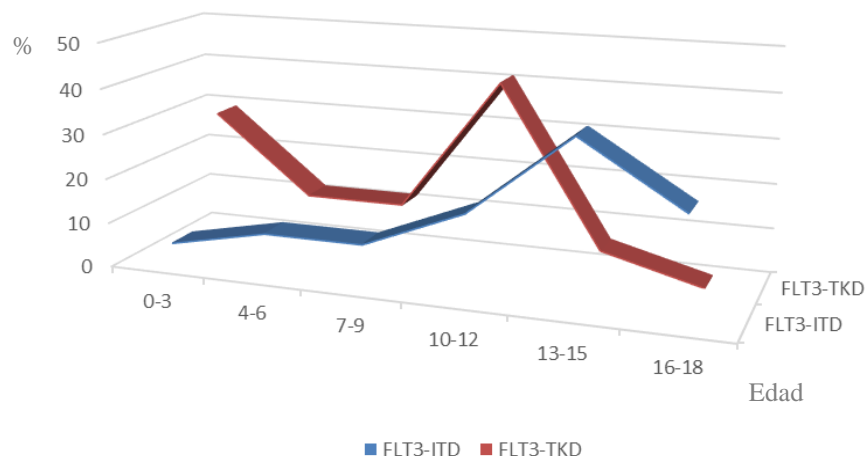
La caracterización de las mutaciones se presenta en la Tabla 8. La mutación más frecuentemente observada fue la sustitución del aspártico 836 por glutámico.

Mutación	Sustitución de nucleótidos	Frecuencia (%)
<b>D835E</b>	GAT-->GAG	47,1
<b>D835Y</b>	GAT-->TAT	17,6
<b>Del Ile</b>	del CAT	17,6
<b>D835H</b>	GAT-->CAT	11,8
<b>D835A</b>	GAT-->GCT	5,9

**Tabla 8:** Descripción de las mutaciones FLT3-TKD detectadas en el total de pacientes con LMA.

Un total de 39 de los 216 pacientes con LMA presentaron alguna de las dos mutaciones (22 FLT3-ITD + 17 FLT3-TKD), representando un 18,1% de los casos estudiados.

De los 33 casos que presentaron cariotipo normal, el 15,2% presentó mutaciones FLT3-ITD ( $p=0,3055$ ) y en el 6,1% de los pacientes se detectaron FLT3-TKD ( $p=0,6749$ ). La edad del grupo de pacientes con mutaciones FLT3-ITD fue significativamente mayor que las de los pacientes con *FLT3* no mutado ( $p<0,00001$ ), observándose un aumento gradual en función de la edad (Gráfico 8).



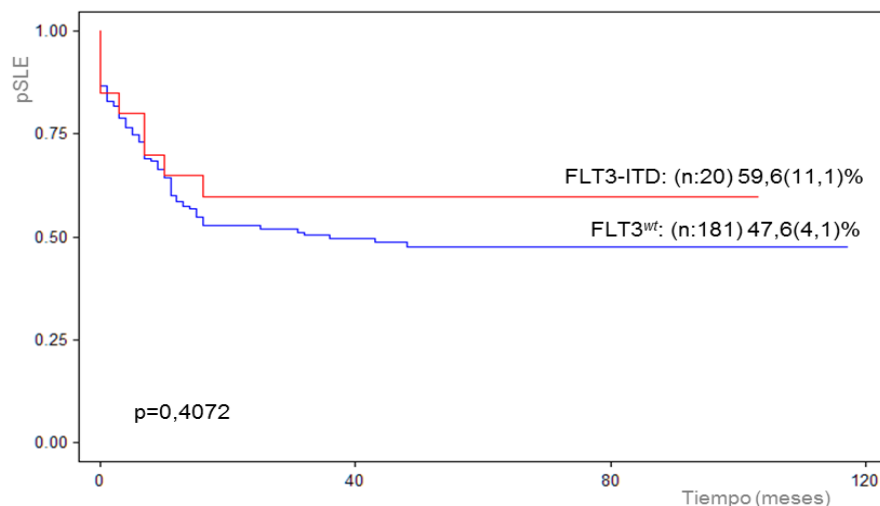
**Gráfico 8:** Porcentaje de incidencia de mutaciones en FLT3 según rangos de edad

La mediana de recuento leucocitario del grupo FLT3-ITD fue mayor que la del grupo *FLT3* no mutado, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. Con respecto a los subtipos FAB, se observó una alta frecuencia de FLT3-ITD en el subtipo FAB-M3 (n: 10, 50%) ( $p=0,0002$ ). En cuanto a los transcritos de fusión estudiados, se halló una asociación significativa entre la presencia del transcrito PML-RARA y el grupo de pacientes con duplicaciones internas en tándem ( $p=0,0001$ ).

En cuanto a la presencia de FLT3-TKD, se observó que 4 pacientes (23,5%) presentaban además alteraciones en el gen *MLL*, aunque la asociación con esta anomalía no fue estadísticamente significativa. Ocho de los 17 pacientes con FLT3-TKD pertenecían al subtipo FAB-M5 ( $p=0,3258$ ). No se observaron diferencias significativas en cuanto a edad, sexo y recuento leucocitario entre los pacientes con FLT3-TKD y los pacientes no mutados.

En la Tabla 4 se puede observar la respuesta al tratamiento, eventos y seguimiento de los pacientes con FLT3-ITD y FLT3-TKD con una media de seguimiento de 32 meses para ambos grupos.

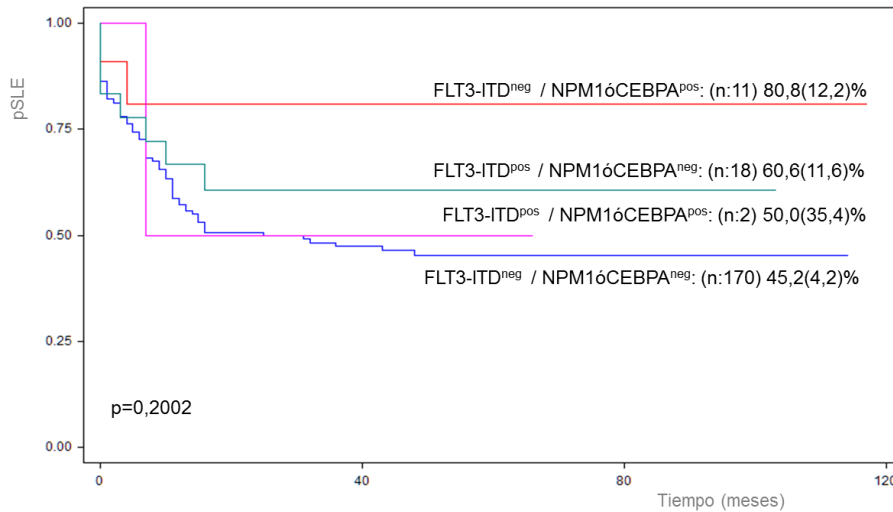
En el gráfico 9 podemos observar las curvas de pSLE de los pacientes con FLT3-ITD y los pacientes sin mutaciones en este gen. La pSLE de los pacientes con FLT3-TKD no mostró diferencias significativas a la encontrada en los pacientes que no presentaron esta mutación (pSLE: FLT3-TKD: 46,0(16,2)% vs FLT3-no TKD: 48,8(4,0)%,  $p=0,6208$ ).



**Gráfico 9:** curva de pSLE de los 201 pacientes con LMA según el status de FLT3-ITD.

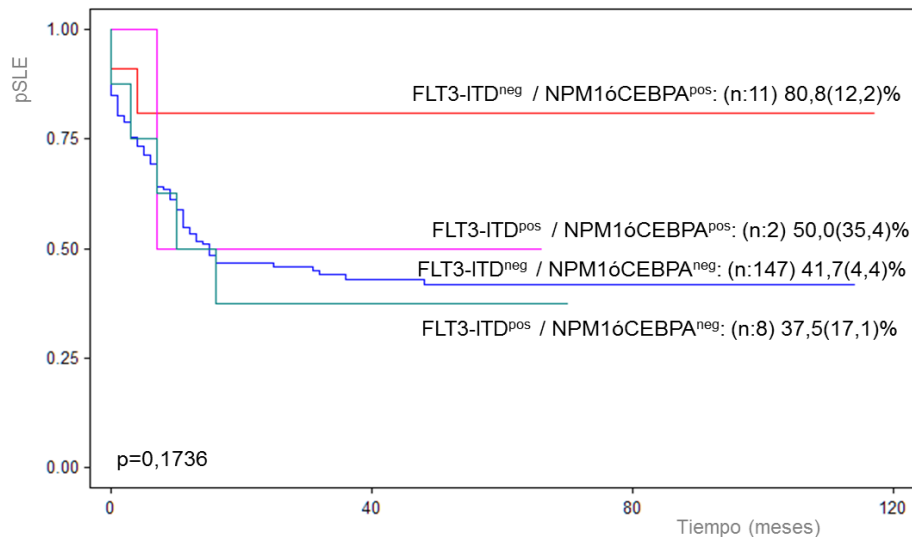
### 3.5 Evaluación del significado pronóstico de los genotipos combinados de FLT3-ITD, *NPM1* y *CEBPA*

En el gráfico 10 se observa la pSLE de los 201 pacientes con LMA según el genotipo combinado de la presencia de FLT3-ITD y *NPM1* y/o *CEBPA* mutados.



**Gráfico 10:** Curvas de pSLE del total de pacientes según status de FLT3-ITD y *NPM1* y/o *CEBPA*.

En el gráfico 11 se observa la pSLE de los 168 pacientes con diagnóstico de LMA según el genotipo combinado de la presencia de FLT3-ITD y *NPM1* y/o *CEBPA* mutados, excluyendo los pacientes con leucemia promielocítica.



**Gráfico 11:** curva de pSLE del total de pacientes excluyendo aquellos con diagnóstico de LPA según status FLT3-ITD y *NPM1* y/o *CEBPA*.

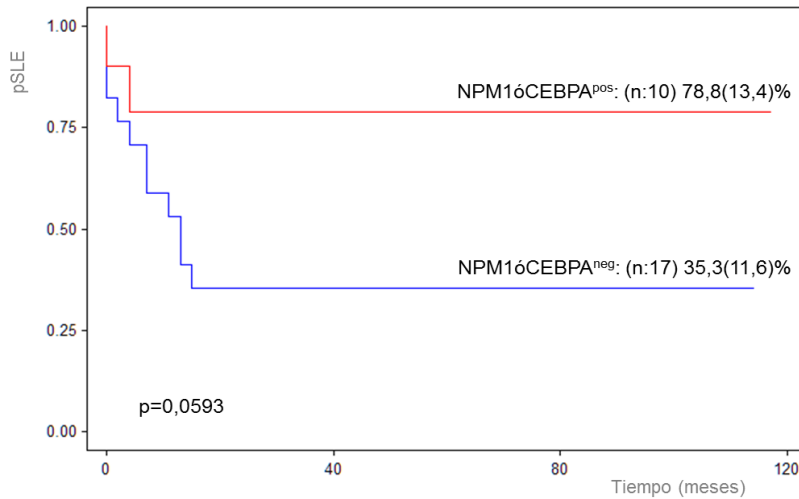
### 3.6 Análisis de mutaciones en *NPM1*, *CEBPA* y *FLT3* en pacientes de cariotipo normal y grupo de alto riesgo

Como hemos descrito previamente, el 15% de los pacientes incluidos en este estudio presentan cariotipo normal. Cuando analizamos las mutaciones en *NPM1*, *CEBPA* y *FLT3* podemos observar que en el caso de *NPM1*, *CEBPA* y *FLT3*-ITD la frecuencia observada es mayor que en la población total estudiada (Tabla 9).

Mutaciones (%)				
	<i>NPM1</i>	<i>CEBPA</i>	<i>FLT3</i> -ITD	<i>FLT3</i> -TKD
Total de pacientes	4,2	1,9	10,2	7,9
Cariotipo normal	24,2	12,1	15,2	6,1
	<b>p&lt;0,00001</b>	<b>p=0,0001</b>	p=0,3055	p=0,6749

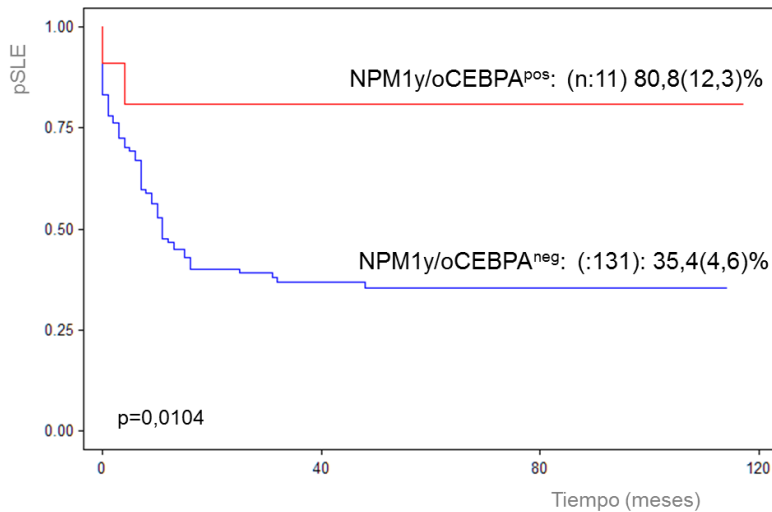
**Tabla 9:** Frecuencia de mutaciones en los 216 pacientes con LMA y en la población de cariotipo normal.

De los 33 pacientes con cariotipo normal, el 81,8% alcanzó la remisión completa. Como se muestra en el gráfico 12, se observa una diferencia significativa en la pSLE entre los pacientes con *NPM1* y/o *CEBPA* mutados y los pacientes que no presentan ninguna de estas mutaciones, todos ellos *FLT3*-ITD negativos.

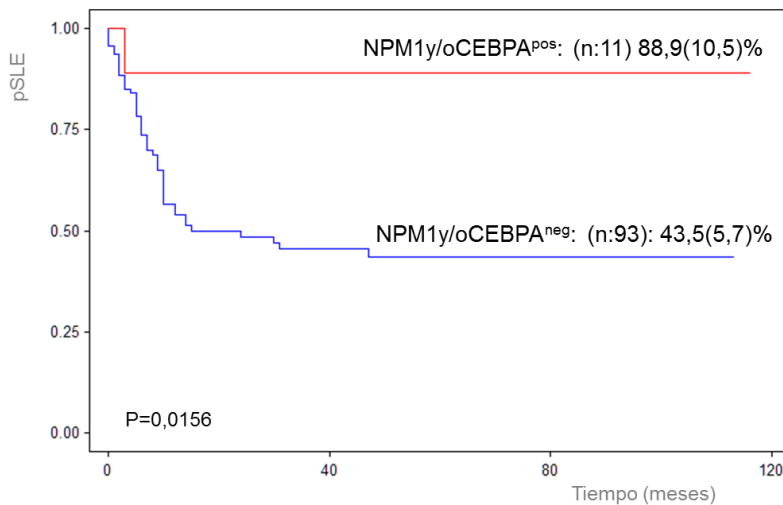


**Gráfico 12:** Curva de pSLE de los pacientes con cariotipo normal y ausencia de FLT3-ITD, según status de *NPM1* y/o *CEBPA*.

Si analizamos al grupo de pacientes de alto riesgo, es decir aquellos pacientes que no presentan las alteraciones recurrentes RUNX1-RUNX1T1 o CBFMB-MYH11 con buena respuesta en el día 15 del tratamiento (excepto las LMA M3), podemos observar que los valores de pSLE y pSLL fueron significativamente superiores en el grupo de pacientes con *NPM1* y/o *CEBPA* mutado respecto a los de pacientes que no presentan dichas mutaciones, excluyendo del análisis los casos FLT3-ITD positivos (Gráficos 13 y 14).



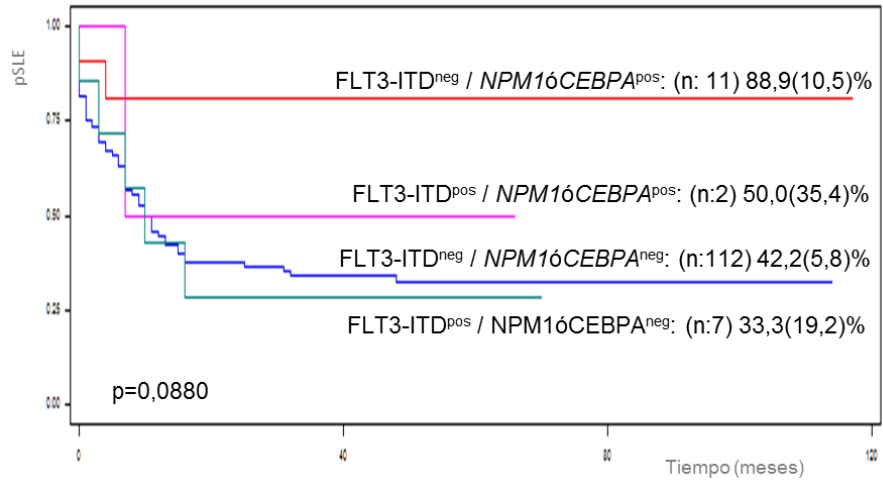
**Gráfico 13:** Curva de pSLE de los pacientes de riesgo alto y ausencia de FLT3-ITD, según status de *NPM1* y/o *CEBPA*.



**Gráfico 14:** Curva de pSLL de los pacientes de riesgo alto y ausencia de FLT3-ITD, según status de *NPM1* y/o *CEBPA*.

Si observamos la pSLE de los pacientes en función del status de FLT3-ITD y *NPM1* y/o *CEBPA* encontramos que se identifica un grupo, *NPM1*y/o *CEBPA* mutado con FLT3-ITD negativo con una pSLE superior al grupo que no presenta estas mutaciones (Gráfico 15).





**Gráfico 15:** Curva de pSLE de los pacientes de riesgo alto según status de FLT3-ITD y NPM1 y/o CEBPA.

#### **4. DISCUSIÓN**

En este estudio fue posible evaluar, en forma retrospectiva, la incidencia e impacto clínico y pronóstico de la presencia de mutaciones en los genes *NPM1*, *CEBPA* y *FLT3* en pacientes pediátricos con diagnóstico de LMA de nuestra Institución.

Las mutaciones en *NPM1* fueron detectadas en un 4,2% de los casos con LMA, observándose una frecuencia ligeramente menor con respecto a los resultados publicados previamente en otras series de pacientes pediátricos donde las incidencias varían entre un 6-8% [8,25,28,29]. Es probable que la menor frecuencia observada se deba a la composición de la población estudiada, ya que el 20% de nuestros pacientes son niños menores de 1 año, ya que el hospital Garrahan es un centro de derivación nacional que recibe a este grupo particular de pacientes, por la complejidad requerida para su tratamiento. Si excluimos a los pacientes menores de un año del análisis de incidencia, podemos observar que la frecuencia de *NPM1* mutado asciende al 5,2%. La mutación A, reportada como la más frecuentemente hallada en todas las series, fue detectada en el 44,4% de los casos y pudieron identificarse 5 nuevas mutaciones no publicadas previamente. Todas las mutaciones detectadas en este estudio resultan en la pérdida del triptófano en posición 290 y sustitución de los aminoácidos del extremo carboxi-terminal de la proteína por los residuos VSLRK, alterando el dominio de exportación nuclear de *NPM1* y ocasionando de este modo la localización citoplasmática anómala de la proteína [22].

En nuestra serie de pacientes se observó un aumento significativo de la incidencia de mutaciones en *NPM1* con la edad, no detectándose mutaciones en niños

menores a 6 años. Esto está en acuerdo con estudios reportados por otros autores, que demostraron la ausencia de detección en pacientes menores a 3 años y una tendencia a detectar mayor incidencia de mutaciones en *NPM1* con el aumento de la edad [8,28,59]. De hecho, la incidencia reportada de estas mutaciones en LMA de pacientes adultos asciende a aproximadamente un tercio del total de casos [7,22]. Las mutaciones en *NPM1* se presentaron más frecuentemente en el subtipo FAB-M2 y no se observaron diferencias significativas en cuanto a sexo y recuento de leucocitos. Similar a lo reportado en adultos [22,60], nuestros resultados muestran que en niños con LMA la frecuencia de mutaciones en *NPM1* asciende significativamente en el grupo de pacientes con LMA y cariotipo normal, lo cual se encuentra en concordancia con los resultados publicados por otros grupos de trabajo [8,11,18,25]. Adicionalmente, la detección de mutaciones en *NPM1* ha demostrado utilidad como blanco de EMR, ya que las mutaciones en *NPM1* son muy estables a lo largo de la evolución de la LMA y por lo tanto podrían ser utilizadas para evaluar respuesta en el seguimiento del tratamiento de los pacientes adultos con LMA [15-17].

Las mutaciones en *CEBPA* fueron detectadas en el 1,9% de los casos con LMA, todas correspondientes a inserciones de nucleótidos en el dominio b-ZIP, manteniendo el marco de lectura. Encontramos además una inserción de 6 nucleótidos en el dominio TAD2 en 6,5 % de los pacientes estudiados, una mutación que ha sido reportada como un polimorfismo [61]. En todos los casos de nuestro estudio que presentaron *CEBPA* mutado detectamos el alelo normal además del alelo mutado, de manera que no detectamos pacientes con resultados

de *CEBPA* doble mutado tal como se describen en algunos trabajos en LMA de adultos [6,10]. En forma similar a lo descrito para los pacientes con alteraciones en *NPM1*, la frecuencia de las mutaciones en *CEBPA* fue significativamente mayor en pacientes con cariotipo normal y en los pacientes de mayor edad [10]. También observamos una asociación significativa con el subtipo FAB-M2. No se observaron diferencias entre los grupos de pacientes con y sin mutaciones en cuanto a sexo y recuento leucocitario, al igual que lo reportado en la bibliografía, [6,10].

Dada la alta incidencia publicada de pacientes con mutaciones en *NPM1* o *CEBPA* que mostraron además mutaciones en *FLT3* y teniendo en cuenta el reportado impacto pronóstico adverso de las mutaciones FLT3-ITD [3,11,41], decidimos incluir en este estudio la investigación y descripción de las alteraciones más frecuentemente encontradas en *FLT3*. Las mismas fueron detectadas en el 18,1 % de los casos, de los cuales el 10,2% correspondieron a FLT3-ITD y 7,9% a FLT3-TKD. De acuerdo a lo esperado, no se detectó coexistencia de ambas mutaciones de *FLT3* en ningún caso. La población de pacientes con mutaciones en *FLT3* presentó un mayor promedio de valores de recuento leucocitario, aunque esta diferencia no fue significativa. Como ya ha sido demostrado, la activación constitutiva del receptor mutado de *FLT3* activa moléculas de señalización intracitoplasmática como la proteína quinasa MAPK, STAT5, Ras y la quinasa Akt, las cuales participan en los procesos de proliferación y supervivencia celular, permitiendo explicar el aumento en el recuento leucocitario encontrado en estos pacientes [62,63]. Nuestros resultados mostraron, además, un aumento de incidencia de mutaciones en FLT3-ITD con la edad, no así para FLT3-TKD.

Cuando analizamos los resultados publicados en series de LMA de pacientes adultos hallamos incidencias de duplicaciones internas en tándem del 20 al 30% [3,63], mientras que en series pediátricas la incidencia disminuye notablemente [64], lo cual concuerda con nuestros hallazgos. De todas las mutaciones estudiadas en el presente trabajo, la única detectada en pacientes menores de 1 año fue FLT3-TKD, que se presentó con mayor frecuencia en el grupo de pacientes con alteraciones en el gen *MLL*, aunque esta asociación no fue significativa. Pudimos observar que FLT3-ITD se asoció significativamente con el subtipo FAB-M3 (y presencia del transcripto de fusión PML-RARA). En cuanto a FLT3-TKD, se encontró con mayor frecuencia en los casos con morfología correspondiente al subtipo FAB-M5.

En 2 pacientes se detectaron mutaciones en *NPM1* y FLT3-ITD, y en un caso coexistencia de mutación en el dominio b-ZIP de *CEBPA* junto con FLT3-TKD.

Con respecto al valor pronóstico de estas alteraciones, varios estudios han demostrado el impacto favorable de la presencia de las mutaciones en los genes de *NPM1* y *CEBPA* en pacientes adultos con LMA [9-13]. Asimismo, la presencia de FLT3-ITD se correlaciona con peor pronóstico de la enfermedad [3,11,41,65], mientras que no se ha demostrado que la presencia de FLT3-TKD tenga influencia en el pronóstico de las LMA pediátricas.

Nuestros resultados concuerdan con lo reportado, mostrando los grupos con *NPM1* mutado una mayor probabilidad de SLE que el grupo de pacientes que no presentó esta mutación (75,0% vs 47,6%,  $p=0,1325$ ). En cuanto a los 4 pacientes con alteraciones en *CEBPA*, 3 de ellos alcanzaron la remisión completa y el

restante falleció durante la etapa de inducción de tratamiento. De todos modos, el número de pacientes es muy pequeño para sacar conclusiones definitivas acerca de su valor pronóstico. Además, los estudios publicados en los últimos años sugieren que el pronóstico favorable reportado en los pacientes con *CEBPA* mutado en LMA correspondería sólo a aquellos pacientes con ambos alelos de *CEBPA* mutado [10,11].

Cuando analizamos los resultados de pSLE de la población total de pacientes y en distintos grupos de acuerdo con el genotipo combinado de las mutaciones en FLT3-ITD, *NPM1* y/o *CEBPA*, pudimos observar que claramente se identifica un grupo de pacientes con mejor pronóstico correspondiente a los pacientes con ausencia de FLT3-ITD y presencia de mutación en *NPM1* y/o *CEBPA* [pSLE(EE): 80,8(12,2)%, p=0,2002].

Considerando la alta prevalencia de mutaciones en *NPM1* y *CEBPA* en LMA con cariotipo normal, analizamos la posible significancia pronóstica de estas alteraciones dentro de este grupo específico de pacientes. Las mutaciones se asociaron significativamente a un mejor pronóstico en el grupo de pacientes que presentaron el genotipo descrito: mutación en *NPM1* o en *CEBPA* pero ausencia de FLT3-ITD [pSLE (EE): 78,8(13,4)% vs 35,3(11,6)%; p=0,0593].

Asimismo, para aquellos pacientes definidos dentro del grupo de riesgo alto, los pacientes mutados en *NPM1* y/o *CEBPA* y ausencia de FLT3-ITD presentaron un pronóstico significativamente mejor que el resto de los pacientes demostrado en términos de la pSLE y pSLL observadas [pSLE (EE): 80,8(12,3)% vs 35,4(4,6)%, p=0,0104 y pSLL (EE): 88,9(10,5)% vs 43,5(5,7)%, p=0,0156].

Cuando analizamos los 168 pacientes con LMA excluyendo aquellos con PML/RARA o subtipo FAB-M3, se observa una diferencia significativa en la pSLE del subgrupo con el genotipo asociado a mejor pronóstico con respecto al resto de los pacientes (pSLE(EE): 80,8(12,2)%,  $p=0,1736$ ). Esto se debe a que dentro de este grupo de LMA debe considerarse un evento particular distintivo: las recaídas moleculares, ya que implican una intensificación en el tratamiento.

Nuestros resultados sugieren que el subgrupo de pacientes con *NPM1* y/o *CEBPA* mutado y ausencia de FLT3-ITD presenta una mayor probabilidad de supervivencia, con un pronóstico favorable dentro de grupo de las LMA consideradas de alto riesgo, permitiéndonos sustentar la propuesta de la OMS 2008 de considerar a estos pacientes como un nuevo subtipo de LMA. Considerando la importancia de la definición de un genotipo resultante de la combinación de mutaciones en *NPM1*, *CEBPA* y FLT3-ITD para definir el pronóstico de los niños con LMA, sería recomendable evaluar la presencia de estas mutaciones como parte de la práctica cotidiana para todos los pacientes al momento del diagnóstico. En el grupo de alto riesgo, la identificación de un subgrupo de pacientes con mejor pronóstico, tal como el observado en los pacientes mutados para *NPM1* y *CEBPA* (FLT3-ITD negativo) permitiría considerar la posibilidad de disminuir la intensificación en el tratamiento quimioterápico a fin de disminuir la morbi-mortalidad en este grupo particular de pacientes. Es de destacar que cualquier disminución en la intensidad del tratamiento debe ser tomada con mucha precaución, sin dejar de considerar que la excelente respuesta de la LMA en este grupo de pacientes se ha obtenido administrando un esquema de tratamiento intenso.

Adicionalmente, en aquellos pacientes con presencia de FLT3-ITD podría considerarse la utilización en el futuro de drogas inhibidoras de tirosina quinasa que están siendo experimentadas en diferentes ensayos clínicos de pacientes pediátricos con LMA [51-54].

El presente reporte contribuye al avance en la caracterización de las mutaciones en *NPM1* y *CEBPA* con la intención de lograr un mejor entendimiento de su participación en los eventos leucemogénicos, y además, consideramos que realiza un aporte significativo en la evaluación del valor pronóstico de estas nuevas mutaciones para lograr una mejor adecuación de la terapia en los pacientes pediátricos con LMA.



## **5.CONCLUSIONES**

El estudio de las mutaciones del gen *NPM1* y *CEBPA* permitirá mejorar la caracterización molecular de las LMA, continuar estudiando la prevalencia de dichas mutaciones en las LMA en nuestro país y confirmar su utilidad como factor pronóstico de riesgo.

Consideramos que el análisis de las mutaciones de *NPM1* y *CEBPA* debería ser incorporado a las determinaciones incluidas de rutina en el diagnóstico de LMA con el fin de proveer una información genética más completa de los pacientes. Evaluar la utilidad pronóstica de las mutaciones de estos genes puede hacer posible su aplicación en la toma de decisiones terapéuticas. Es posible que en futuros protocolos de tratamiento esta información sea incluida en la estratificación de los pacientes en grupos de riesgo para una mejor adecuación del tratamiento.

El presente estudio ha permitido identificar además, marcadores moleculares, que podrían ser utilizados para la determinación de la EMR posibilitando así el monitoreo de los pacientes durante el tratamiento.

La detección de las mutaciones en los genes estudiados en este trabajo, permitiría identificar a un grupo de pacientes que se beneficiarían con terapias dirigidas a blancos moleculares específicos, actualmente en desarrollo. En conclusión, la investigación sistemática de la detección de mutaciones en los genes *NPM1*, *CEBPA* y *FLT3* como parte del diagnóstico y caracterización de la LMA pediátrica contribuirá a optimizar los resultados del tratamiento en nuestra Institución.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Felice MS, Rossi JG, Gallego MS, Alfaro EM, Zubizarreta PA, Fraquelli LE, Alonso CN, Gutter MR, Scopinaro MJ. No advantage of a Rotational Continuation Phase in Acute Lymphoblastic Leukemia in Childhood treated with a BFM back-bone therapy. *Pediatr Blood Cancer*; 2011;57:47-55.
2. Armendariz H, Fernández Barbieri MA, Freigeiro D, Lastiri F, Felice MS, Dibar E from the Argentine Group for the Treatment of Acute Leukemia (GATLA). Treatment strategy and long term results in pediatric patients treated in two consecutive AML-GATLA Trials. *Leukemia* 2005 Dec;19(12):2139-42.
3. 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, and Döhner H. Mutations and Treatment Outcome in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2008;358:1909-18.
4. Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, Tomita A, Yamaji S, Suzuki R, Kodera Y, Miyawak S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Ueda R, Kinoshita T, Emi N, Naoe T. Clinical characteristics and prognostic implications of *NPM1* mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 2005;106:2854-2861.
5. Lin LI, Lin TC, Chou WC, Tang JL, Lin DT, Tien HF. A novel fluorescence-based multiplex PCR assay for rapid simultaneous detection of CEBPA mutations and NPM mutations in patients with acute myeloid leukemias. *Leukemia* 2006;20:1899–1903.

6. Leroy H, Roumier C, Huyghe P, Biggio V, Fenaux P, Preudhomme C. CEBPA point mutations in hematological malignancies. *Leukemia* 2005;19:329–334.
7. Brunangelo Falini, Maria Paola Martelli, Niccolò Bolli, Paolo Sportoletti, Arcangelo Liso, Enrico Tiacci, and Torsten Haferlach. Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): is it a distinct entity?. *Blood*. 2011;117(4):1109-1120.
8. Patrick Brown, Emily McIntyre, Rachel Rau, Soheil Meshinchi, Norman Lacayo, Gary Dahl, Todd A. Alonzo, Myron Chang, Robert J. Arceci, and Donald Small. The incidence and clinical significance of nucleophosmin mutations in childhood AML. *Blood*. 2007;110:979-985.
9. Susanne Schnittger, Claudia Schoch, Wolfgang Kern, Cristina Mecucci, Claudia Tschulik, Massimo F. Martelli, Torsten Haferlach, Wolfgang Hiddemann, and Brunangelo Falini. Nucleophosmin Gene Mutations are Predictors of Favourable Prognosis in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. *Blood*. 2005 Dec 1;106(12):3733-9.
10. Erdogan Taskesen, Lars Bullinger, Andrea Corbacioglu, Mathijs A. Sanders, Claudia A. J. Erpelinck, Bas J. Wouters, Sonja C. van der Poel-van de Luytgaarde, Frederik Damm, Jurgen Krauter, Arnold Ganser, Richard F. Schlenk, Bob Lowenberg, Ruud Delwel, Hartmut Dohner, Peter J. M. Valk, and Konstanze Dohner. Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression features of AML with *CEBPA* mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for *CEBPA* double mutant AML as a distinctive disease entity. *Blood*. 2011;117(8):2469-2475.

11. Martelli MP, Sportoletti P, Tiacci E, Martelli MF, Falini B. Mutational landscape of AML with normal cytogenetics: Biological and clinical implications. *Blood Reviews* 2013;27:13–22.
12. Schneider F, Hoster E, Unterhalt M, Schneider S, Dufour A, Benthaus T, et al. NPM1 but not FLT3-ITD mutations predict early blast cell clearance and CR rate in patients with normal karyotype AML (NK-AML) or high-risk myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood* 2009;113:5250-3.
13. Becker H, Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, Mrozek K, Margeson D, et al. Favorable prognostic impact of NPM1 mutations in older patients with cytogenetically normal de novo acute myeloid leukemia and associated gene- and microRNA-expression signatures: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2010;28:596-604.
14. Swerdlow SH, Campos E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4<sup>th</sup> Edition. 2008.
15. W-C Chou, J-L Tang, S-J Wu, W Tsay, M Yao, S-Y Huang, K-C Huang, C-Y Chen, C-F Huang and H-F Tien. Clinical implications of minimal residual disease monitoring by quantitative polymerase chain reaction in acute myeloid leukemia patients bearing nucleophosmin (NPM1) mutations. *Leukemia*.2007;21:998–1004.
16. P Gorello, G Cazzaniga, F Alberti, MG Dell’Oro, E Gottardi, G Specchia, G Roti, R Rosati, MF Martelli, D Diverio, F Lo Coco, A Biondi, G Saglio, C Mecucci and B Falini. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. *Leukemia*.2006;20:1103–1108.

17. Krönke J, Schlenk RF, Jensen KO, Tschürtz F, Corbacioglu A, Gaidzik VI, Paschka P, Onken S, Eiwen K, Habdank M, Späth D, Lübbert M, Wattad M, Kindler T, Salih HR, Held G, Nachbaur D, von Lilienfeld-Toal M, Germing U, Haase D, Mergenthaler HG, Krauter J, Ganser A, Göhring G, Schlegelberger B, Döhner H, Döhner K. Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group. *J Clin Oncol.* 2011;29(19):2709-16.
18. Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer T, Schaich M, Ehninger G. Prevalence and prognostic impact of *NPM1* mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2006;107:4011-4020.
19. Sari Kurki, Karita Peltonen, Leena Latonen, Taija M. Kiviharju, Paivi M. Ojala, David Meek, and Marikki Laiho. Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. *Cancer Cell.* 2004;5:465-475.
20. Chang JH and Olson MO. Structure of the gene for rat nucleolar protein B23. *J. Biol. Chem.* 1990;265:18227–18233.
21. Silvia Grisendi, Cristina Mecucci, Brunangelo Falini and Pier Paolo Pandolfi. Nucleophosmin and cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2006;6:493-505.
22. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, La Starza R, Diverio D, Colombo E, Santucci A, Bigerna B, Pacini R, Pucciarini A, Liso A, Vignetti M, Fazi P, Meani N, Pettrossi V, Saglio G, Mandelli F, Lo-Coco F, Pelicci PG, Martelli MF. Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. *N Engl J Med* 2005;352:254-66.

23. Jeon Y, Seo SW, Park S, Park S, Kim SY, Ra EK, Park SS, Seong MW. Identification of two novel NPM1 mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Ann Lab Med* 2013;33:60-64.
24. Pradeep Singh Chauhan, Rakhshan Ihsan, L. C. Singh, Dipendra Kumar Gupta, Vishakha Mittal, and Sujala Kapur. Mutation of NPM1 and FLT3 Genes in Acute Myeloid Leukemia and Their Association with Clinical and Immunophenotypic Features. *Dis Markers*. 2013;35(5):581–588.
25. Cazzaniga G, Dell' Oro MG, Mecucci C, Giarin E, Masetti R, Rossi V, Locatelli F, Martelli MF, Basso G, Pession A, Biondi A, Falini B. Nucleophosmin mutations in childhood acute myelogenous leukemia with normal karyotype. *Blood* 2005;106:1419-1422.
26. Chou WC, Tang JL, Lin LI, Yao M, Tsay W, Chen CY, Wu SJ, Huang CF, Chiou RJ, Tseng MH, Lin DT, Lin KH, Chen YC, Tien HF. Nucleophosmin mutations in de novo acute myeloid leukemia: the age-dependent incidences and the stability during disease evolution. *Cancer Res* 2006;66:3310-3316.
27. Thiede C, Creutzig E, Reinhardt D, Ehninger G, Creutzig U. Different types of NPM1 mutations in children and adults: evidence for an effect of patient age on the prevalence of the TCTG-tandem duplication in NPM1-exon 12. *Leukemia*. 2007;21:366-367.
28. Maria Braoudaki, Chrissa Papathanassiou, Katerina Katsibardi, Natalia Tourkadoni, Kalliopi Karamolegou, Fotini Tzortzatou-Stathopoulou. The frequency of NPM1 mutations in childhood acute myeloid leukemia. *Journal of Hematology & Oncology* 2010;3:41-45.
29. Brian V. Balgobind, Iris H.I.M. Hollink, Susan T.C.J.M. Arentsen-Peters, Martin Zimmermann, Jochen Harbott, H. Berna Beverloo, Anne R.M. von Bergh,

Jacqueline Cloos, Gertjan J.L. Kaspers, Valerie de Haas, Zuzana Zemanova, Jan Stary, Jean-Michel Cayuela, Andre Baruchel, Ursula Creutzig, Dirk Reinhardt, Rob Pieters, C. Michel Zwaan, and Marry M. van den Heuvel-Eibrink. Integrative analysis of type-I and type-II aberrations underscores the genetic heterogeneity of pediatric acute myeloid leukemia. *Haematologica*.2011;96(10):1478-1487.

30. Lin LI, Chen CY, Lin DT, Tsay W, Tang JL, Yeh YC, Shen HL, Su FH, Yao M, Huang SY, Tien HF. Characterization of CEBPA mutations in acute myeloid leukemia: most patients with CEBPA mutations have biallelic mutations and show a distinct immunophenotype of the leukemic cells. *Clinical Cancer Research* 2005;11:1372–1379.

31. Matsuo H, Kajihara M, Tomizawa D, Watanabe T, Saito AM, Fujimoto J, Horibe K, Kodama K, Tokumasu M, Itoh H, Nakayama H, Kinoshita A, Taga T, Tawa A, Taki T, Tanaka S, Adachi S. Prognostic implications of CEBPA mutations in pediatric acute myeloid leukemia: a report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Blood Cancer J*. 2014 Jul 11;4:e226.

32. Gilliland G and Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 2002;100:1532-42.

33. Stirewalt DL and Radich JP. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer* 2003;3:650-65.

34. 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;10:1911-18.

35. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Saito H, Ueda R, Ohno R, Naoe T. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3. *Blood* 2001;97:2434-9.
36. Chou WC, Tang JL, Wu SJ, Tsay W, Yao M, Huang SY, Huang KC, Chen CY, Huang CF, Tien HF. Clinical implications of minimal residual disease monitoring by quantitative polymerase chain reaction in acute myeloid leukemia patients bearing nucleophosmin (NPM1) mutations. *Leukemia* 2007;21:998–1004.
37. Bene MC, Castoldi C, Knapp W, Ludwig W, van't Veer et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. EGIL. *Leukemia* 1995;9:1783-1766.
38. 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.
39. Meshinchi S, Alonzo TA, Stirewalt DL, Zwaan M, Zimmerman M, Reinhardt D, Kaspers GJ, Heerema NA, Gerbing R, Lange BJ, Radich JP. Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML. *Blood* 2006;108:3654-61.
40. Kottaridis PD, Gale RE, Linch DC. FLT3 mutations and leukemia. *Br. J. Haematol.* 2003;122:523–38.
41. Elyamany G, Awad M, Fadalla K, Albalawi M, Al Shahrani M, Al Abdulaaly A. Frequency and Prognostic Relevance of FLT3 Mutations in Saudi Acute Myeloid Leukemia Patients. *Adv Hematol.* 2014;2014:141360.



42. Al-Kzayer LF, Uyen Ie TN, Al-Jadiry MF, Al-Hadad SA, Al-Badri SA, Ghali HH, Ameen NA, Liu T, Matsuda K, Abdulkadhim JM, Al-Shujairi TA, Matti ZI, Hasan JG, Al-Abdullah HM, Al-Ani MH, Saber PA, Khalil HM, Inoshita T, Kamata M, Koike K, Sakashita K. Analysis of class I and II aberrations in Iraqi childhood acute myeloid leukemia using filter paper cards. *Ann Hematol.* 2014 Jun;93(6):949-55.
43. Ghosh K, Swaminathan S, Madkaikar M, Gupta M, Kerketta L, Vundinti B. FLT3 and NPM1 mutations in a cohort of AML patients and detection of a novel mutation in tyrosine kinase domain of FLT3 gene from Western India. *Ann Hematol.* 2012;91(11):1703-12.
44. Greaves M. Childhood leukemia. *British Medical Journal* 2002;324:283-7.
45. Zwaan CM, Meshinchi S, Radich JP, Veerman AJP, Huismans DR, Hahlen K, Zimmermann M, Reinhardt D, Harbott J, Creutzig U, Kaspers GJL, Griesinger F. FLT3 internal tandem duplication in childhood acute myeloid leukemia: prognostic significance and relation to cellular drug resistance. *Blood* 2002;100:33a.
46. 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;98:1752-9.
47. Armstrong SA, Kung AL, Mabon ME, Silverman LB, Stam RW, Den Boer ML, Pieters R, Kersey JH, Sallan SE, Fletcher JA, Golub TR, Griffin

JD, Korsmeyer SJ. Inhibition of FLT3 in MLL: Validation of a therapeutic target identified by gene expression based classification. *Cancer Cell* 2003;3:173-83.

48. Taketani T, Taki T, Sugita K, Furuichi Y, Ishii E, Hanada R, Tsuchida M, Sugita K, 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;103:1085-8.

49. Alonso C, Rubio Longo P, Luppó S, Medina A, Gallego M, Scopinaro M, Felice M. Nuevos blancos terapéuticos en leucemia aguda pediátrica: Caracterización de las mutaciones del gen FLT3. *Medicina Infantil* .2007;14:116-123.

50. Brown P, Small D. FLT3 Inhibitors: a paradigm for the development of targeted therapeutics for paediatric cancer. *Eur J Cancer* 2004;40:707-21.

51. O'Farrell AM, Abrams TJ, Yuen HA, Ngai TJ, Louie SG, Yee KW, Wong LM, Hong W, Lee LB, Town A, Smolich BD, Manning WC, Murray LJ, Heinrich MC, Cherrington JM. SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. *Blood* 2003;101:3597-605.

52. Metzelder SK, Schroeder T, Finck A, Scholl S, Fey M, Götze K, Linn YC, Kröger M, Reiter A, Salih HR, Heinicke T, Stuhlmann R, Müller L, Giagounidis A, Meyer RG, Brugger W, Vöhringer M, Dreger P, Mori M, Basara N, Schäfer-Eckart K, Schultheis B, Baldus C, Neubauer A, Burchert A. High activity of sorafenib in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia synergizes with allo-immune effects to induce sustained responses. *Leukemia*.2012;26(11):2353–2359.

53. Zarrinkar PP, Gunawardane RN, Cramer MD, Gardner MF, Brigham D, Belli B, Karaman MW, Pratz KW, Pallares G, Chao Q, Sprankle KG, Patel HK, Levis

M,Armstrong RC, James J, Bhagwat SS. AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2009;114(14):2984–2992.

54. Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, Galinsky I, Estey E, Nimer SD, Grandin W, Lebowitz D, Wang Y, Cohen P, Fox EA, Neuberg D, Clark J, Gilliland DG, Griffin JD. 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.

55. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, Díaz MG, Malec M, Langerak AW, San Miguel JF, Biondi A. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1999;13:1901-28.

56. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of American Statistics Association* 1958;53:457-481.

57. Peto R, Pike MC, Armitage P, Breslow NE, Cox DR, Howard SV, Mantel N, McPherson K, Peto J, Smith PG. Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation on each patient. II. Analysis and examples. *Br J Cancer* 1977;35:1-39.

58. Tarone RE, Wara J. On distribution-free test for equality of survival distribution. *Biometrika* 1997; 64:156-160.

59. Friederike Schneider, Eva Hoster, Stephanie Schneider, Annika Dufour, Tobias Benthous, Purvi M. Kakadia, Stefan K. Bohlander, Jan Braess, Achim Heinecke, Maria C. Sauerland, Wolfgang E. Berdel, Thomas Buechner,

Bernhard J. Woermann, Michaela Feuring-Buske, Christian Buske, Ursula Creutzig, Christian Thiede, Michel C. Zwaan, Marry M. van den Heuvel-Eibrink, Dirk Reinhardt, Wolfgang Hiddemann, Karsten Spiekermann. Age-dependent frequencies of NPM1 mutations and FLT3-ITD in patients with normal karyotype AML (NK-AML). *Ann Hematol* 2012;91:9–18.

60. Konstanze Döhner, Richard F. Schlenk, Marianne Habdank, Claudia Scholl, Frank G. Rücker, Andrea Corbacioglu, Lars Bullinger, Stefan Fröhling, Hartmut Döhner and for the AML Study Group (AMLSG). Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*.2005;106:3740-3746.

61. Wouters BJ, Louwers I, Valk PJ, Lowenberg B, Delwel R. A recurrent in-frame insertion in a C/EBPA transactivation domain is a polymorphism rather than a mutation that does not affect gene expression profiling-based clustering of AML. *Blood* 2007;109: 389–390.

62. Pradeep Singh Chauhan, Rakhshan Ihsan, L. C. Singh, Dipendra Kumar Gupta, Vishakha Mittal, and Sujala Kapur. Mutation of NPM1 and FLT3 Genes in Acute Myeloid Leukemia and Their association with Clinical and Immunophenotypic Features. *Disease Markers* 2013;35(13):581–588.

63. Christian Thiede, Christine Steudel, Brigitte Mohr, Markus Schaich, Ulrike Schakel, Uwe Platzbecker, Martin Wermke, Martin Bornhauser, Markus Ritter, Andreas Neubauer, Gerhard Ehninger, and Thomas Illmer. 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.

64. Ekchol Mukda, Katsarin Pintaraks, Rachchadol Sawangpanich, Surapon Wiangnon, Samart Pakakasama. FLT3 and NPM1 Gene Mutations in Childhood Acute Myeloblastic Leukemia. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2011;12:1827-1831.
65. Bora G. Park, Hyun-Sook Chi, Seo-Jin Park, Sook Kyoung Min, Seongsoo Jang, Chan-Jeoung Park, Dae-Young Kim, Jung-Hee Lee, Je-Hwan Lee, Kyoo-Hyung Lee. Clinical Implications of Non-A-Type *NPM1* and *FLT3* Mutations in Patients with Normal Karyotype Acute Myeloid Leukemia. *Acta Haematol* 2012;127:63–71.