

Frecuencia de aberraciones moleculares en pacientes cubanos con leucemia mieloide aguda

Frequency of molecular disorders in Cuban patients with acute myeloid leukemia

Ana María Amor Vigil^{1*} <https://orcid.org/0000-0001-9182-2664>

Londy Lorena Hernández Miranda¹ <https://orcid.org/0000-0003-2469-3246>

Carmen Alina Díaz Alonso¹ <https://orcid.org/0000-0001-6544-0662>

Vera Ruiz Moleón¹ <https://orcid.org/0000-0003-3728-3158>

Lesbia Fernández Martínez¹ <https://orcid.org/0000-0002-8359-3061>

Ignacio Oliva Hernández² <https://orcid.org/0000-0003-1214-0660>

Heidys Garrote Santana¹ <https://orcid.org/0000-0002-8449-1278>

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

²Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología. La Habana, Cuba.

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

RESUMEN

Introducción: En el Instituto de Hematología e Inmunología se realiza el estudio molecular de las leucemias mieloides agudas (LMA). Para las leucemias mieloides agudas no promielocíticas (LPM) se determinan cuatro biomarcadores: los genes de fusión RUNX1-RUNX1T1 y CBF β -MYH11, la duplicación interna en tándem del gen FLT3 (DIT FLT3) y la mutación “A” del gen NPM1 (NPM1-A).

Objetivo: Determinar la frecuencia de estos cuatro biomarcadores, en pacientes cubanos con leucemias mieloides agudas primaria no promielocíticas.

Métodos: Se incluyeron 91 pacientes entre niños y adultos, estudiados en el Instituto durante tres años desde el debut. A partir de ARN de sangre medular se obtuvo ADN complementario por transcripción inversa; se amplificaron los fragmentos correspondientes mediante la reacción en cadena de la polimerasa y el producto se analizó por electroforesis capilar.

Resultados: El RUNX1-RUNX1T1 apareció en el 24,2 %, fue más frecuente en los pacientes pediátricos y disminuyó significativamente con la edad. El CBFβ-MYH11 solo se encontró en adultos (4,8 %). La NPM1-A con 41 % fue mayoritaria entre los adultos. La DIT FLT3 se observó en el 21,6 % y no mostró relación con la edad. NPM1-A y DIT FLT3 fueron las aberraciones con mayor presencia simultánea.

Conclusiones: Por primera vez se describe la frecuencia de los cuatro biomarcadores moleculares en los pacientes cubanos con leucemias mieloides agudas primaria no promielocíticas; su comportamiento fue similar a lo descrito por otros autores, aunque se encontraron algunas particularidades.

Palabras clave: leucemia mieloide aguda no promielocítica; biomarcadores moleculares; pacientes cubanos.

ABSTRACT

Introduction: At the Institute of Hematology and Immunology, the molecular study of acute myeloid leukemias (AML) is carried out. For nonpromyelocytic acute myeloid leukemias, four biomarkers are determined: the RUNX1-RUNX1T1 and CBFβ-MYH11 fusion genes, the internal tandem duplication of the FLT3 gene (DIT FLT3), and the “A” mutation of the NPM1 gene (NPM1-A).

Objective: To determine the frequency of these four biomarkers in Cuban patients with nonpromyelocytic primary acute myeloid leukemias.

Methods: 91 patients were included, children and adults, who were studied at the Institute for three years from their disease debut. Complementary DNA was obtained from medullary blood RNA by reverse transcription. The corresponding fragments were amplified by polymerase chain reaction and the product was analyzed by capillary electrophoresis.

Results: RUNX1-RUNX1T1 appeared in 24.2%; it was more frequent in pediatric patients and decreased significantly with age. CBFβ-MYH11 was found only in adults (4.8%). NPM1-A, accounting for 41%, represented the majority among adults. FLT3 DIT was observed in 21.6% and was not related to age. NPM1-A and DIT FLT3 were the disorders with the greatest concurrence.

Conclusions: For the first time, the frequency of the four molecular biomarkers is described in Cuban patients with primary non-promyelocytic acute myeloid leukemias. Its characterization was similar to that described by other authors, although some peculiarities were found.

Keywords: nonpromyelocytic acute myeloid leukemias; molecular biomarkers; Cuban patients.

Recibido: 30/12/2019

Aceptado: 29/06/2020

Introducción

La leucemia mieloide aguda (LMA) es un trastorno genéticamente heterogéneo, caracterizado por la adquisición somática de alteraciones genéticas y epigenéticas en células madres progenitoras hematopoyéticas que alteran sus mecanismos normales de auto-renovación, proliferación y diferenciación celular. En dependencia de las características del clon celular que prolifera se observará diferentes comportamientos clínico, hematológico y citomorfológico.^(1,2,3)

Esta gran variabilidad impulsó la necesidad de establecer subgrupos según las características que se manifiestan. El primer sistema integral para clasificar a la LMA se estableció en 1976 y fue elaborado por el Grupo Cooperativo Franco-Américo-Británico (FAB).⁽⁴⁾ Esta clasificación buscaba identificar el equivalente leucémico de las células mieloides para cada estadio normal de diferenciación atendiendo a criterios morfológicos y citoquímicos. Sin embargo, a pesar de su utilidad diagnóstica y constituir la primera herramienta a la mano de los investigadores, se reconoció que la interpretación morfológica era insuficiente para establecer los grupos de riesgo de manera adecuada. El conocimiento cada vez más profundo de la biología de la LMA, puso de manifiesto la necesidad de incorporar nuevos parámetros para una correcta agrupación. De esta manera, en el año 2002 surge la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS),⁽⁵⁾ que incorpora e interrelaciona las características morfológicas, citogenéticas y moleculares, y busca ser no sólo una herramienta útil para el diagnóstico sino también para la clínica al correlacionarse de una forma más precisa con el pronóstico. En los años 2008 y 2016, la OMS ha actualizado la clasificación,^(6,7) incorporando cada vez nuevas anomalías citogenéticas y moleculares definitorias del diagnóstico diferencial de las LMA.

En este sistema de clasificación, los pacientes con translocaciones como la $t(8;21)(q22;q22)$ y $t(15;17)(q22;q21)$, así como con la inversión del cromosoma 16 [$inv(16)(p13q22)$] o translocación $t(16;16)(p13;q22)$, fueron clasificados como “LMA con anomalías citogenéticas recidivantes”. Estas aberraciones cromosómicas corresponden a las anomalías moleculares conocidas como genes de fusión RUNX1-RUNX1T1 (nombrado antes AML1-ETO), PML-RAR α y CBF β -MYH11 respectivamente. Determinar su presencia a través del estudio citogenético o molecular permite enmarcar al paciente en un subtipo específico de LMA.

Las LMA portadoras de las aberraciones cromosómicas $t(8;21)(q22;q22)$ e $inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)$, con las que se forman los reordenamientos de genes antes mencionados, son definidas como LMA CBF (CBF, sigla del inglés de factor de unión al núcleo). Esta entidad está entre los subtipos más comunes de LMA, ya que las dos aberraciones juntas aparecen aproximadamente en el 25 % de los pacientes pediátricos⁽⁸⁾ y entre el 15 % a 20 % de los adultos, con LMA *de novo*.^(8,9) Sin embargo, aunque las LMA CBF están agrupadas bajo un mismo nombre, molecularmente son bien diferentes, lo cual conduce a comportamientos clínicos particulares.⁽¹⁰⁾

La biología molecular también ha permitido encontrar anomalías que no implican rearrreglos cromosómicos. Estas son mutaciones que modifican la secuencia del ADN y que han cobrado importancia para la caracterización y la predicción de riesgo de las LMA, sobre todo en aquellas con cariotipo normal (CN). Ejemplo de ello son: la duplicación interna en tándem del gen FLT3 (DIT FLT3), las mutaciones en los genes FLT3, NPM1, CEBP α y C-KIT, y las mutaciones en marcadores epigenéticos.⁽¹¹⁾

El FLT3 es un receptor de membrana, con un dominio tirosina quinasa intracelular, que normalmente está expresado en células madres progenitoras hematopoyéticas y juega un importante papel en los estadios tempranos del desarrollo de las líneas linfóide y mieloide.⁽¹²⁾ La DIT FLT3 es la mutación más frecuente del gen que codifica al mencionado receptor y se manifiesta en una longitud variable, desde tres hasta más de 400 pares de base. La aberración está localizada en el dominio yuxta membrana y conduce a la activación constitutiva del receptor; lo cual promueve la proliferación celular y el bloqueo de la diferenciación de progenitores hematopoyéticos tempranos.⁽¹³⁾ En general, se plantea que aparece en alrededor del 25 % de todos los casos de LMA y que su frecuencia varía muy poco con la edad.⁽¹²⁾ La DIT FLT3 se relaciona con un resultado adverso en las poblaciones adultas y pediátricas con LMA. Su presencia predice

la ocurrencia de una alta tasa de recaída, lo que se traduce en una supervivencia media inferior respecto al resto de pacientes con LMA.^(14,15) Por todo lo anterior, su estudio ha adquirido un papel crítico en la estratificación de riesgo.

Las mutaciones del gen NPM1 aparecen con alta frecuencia en los pacientes con LMA, 25 a 53 %, y más aún en las LMA con CN en que pueden estar entre un 46 a 67%.⁽¹⁶⁾ Se han descrito más de 50 variantes, siendo la NPM1-A la que más se encuentra en pacientes adultos; mientras que en pacientes pediátricos se informa mayoritariamente la variante “B”.⁽¹⁷⁾ Más del 95 % de las mutaciones consisten en una inserción de cuatro pares de base en la posición 863 que generan modificaciones en el extremo C terminal de la proteína y provocan su localización aberrante en el citoplasma.⁽¹⁴⁾ Estudios *in vivo* en modelos de ratones han demostrado que NPM1 es un gen supresor de tumor haploinsuficiente y que por tanto, la pérdida de su función puede contribuir a la patogénesis de la LMA.⁽¹⁸⁾ A pesar de que las mutaciones en NPM1 se asocian a una evolución favorable, su sola presencia no determina el pronóstico ya que su asociación con otras mutaciones en genes como FLT3, DNMT3A, NRAS, IDH y PTPN11 determinan su estratificación.⁽¹⁶⁾

En los últimos años se han identificado alteraciones en los genes implicados en la regulación epigenética, que se consideran una tercera clase de mutaciones y muestran efectos en la diferenciación celular y la proliferación. Estas mutaciones, que pueden ser identificadas en el 40 % de los casos de LMA, actúan sobre genes que tienen relación con la metilación del ADN como el DNMT3A, el TET2, el IDH-1 y el IDH-2.⁽¹⁾

Para la determinación de muchas de las anomalías es necesaria la secuenciación, lo cual limita generalizar su estudio debido a su alto costo. Sin embargo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por su sigla en inglés) como técnica sensible, específica, rápida, sencilla y de relativamente bajo costo, ha permitido introducir el estudio molecular como herramienta de rutina para el diagnóstico clínico. Debido a la frecuencia con que aparecen y la importancia que tienen para el pronóstico, se han diseñado protocolos de PCR para la detección de algunas aberraciones moleculares que inicialmente requerían ser secuenciadas, entre ellas la DIT FLT3⁽¹⁹⁾ y la NPM1-A (mutación “A” del gen NPM1).⁽²⁰⁾

Desde el año 1985 en el Instituto de Hematología e Inmunología “Dr. José Manuel Ballester Santovenia” (IHI) se ha introducido progresivamente el estudio molecular de las hemopatías malignas.⁽²¹⁾ Actualmente, los pacientes con LMA se benefician de la determinación por PCR de cinco de las anomalías más importantes para la definición diagnóstica y pronóstica de esta

entidad. Anteriormente, se ha reportado la incidencia del gen de fusión PML-RAR α en la LPM⁽²²⁾ y del RUNX1-RUNX1T1,⁽²³⁻²⁴⁾ en pacientes cubanos con LMA. En el más reciente de los citados informes, se correlacionó la presencia simultánea del RUNX1-RUNX1T1 con otras alteraciones moleculares (CBF β -MYH11, DIT FLT3 y NPM1-A). Sin embargo, no ha sido informada la frecuencia con que aparecen los genes de fusión RUNX1-RUNX1T1 y CBF β -MYH11, la DIT FLT3 y la mutación NPM1-A en pacientes con LMA.

El objetivo de esta investigación fue determinar la frecuencia de estos cuatro biomarcadores, en pacientes cubanos con leucemias mieloides agudas primaria no promielocíticas.

Métodos

Se estudiaron 91 pacientes entre julio de 2013 a julio de 2016. Se tuvieron en consideración los protocolos de tratamiento establecidos según la edad al debut, los pacientes fueron clasificados en cuatro grupos etarios: menores de dos años, de dos a menos de 18 años, de 18 a 60 años y mayores de 60.

A partir de sangre medular se aisló ARN y se obtuvo ADN complementario mediante transcripción inversa. Se amplificaron los fragmentos correspondientes a cada alteración molecular mediante PCR a partir de tres protocolos diferentes: uno para los genes de fusión RUNX1-RUNX1T1 y CBF β -MYH11,⁽²⁵⁾ otro para la DIT FLT3⁽¹⁹⁾ y un tercero para la mutación NPM1-A.⁽²⁰⁾ Los programas de amplificación fueron los recomendados en cada protocolo y el análisis del producto de la PCR se realizó mediante electroforesis capilar en todos los casos. Para el procesamiento y análisis de los datos se empleó el programa Epidat 3.1. Las cuatro alteraciones moleculares no fueron estudiadas en todos los pacientes, por lo que el análisis se realizó de acuerdo al número de pacientes en que fue estudiada cada una de ellas.

Resultados

En la tabla 1 se muestra la frecuencia total con que se encontraron las cuatro alteraciones moleculares respecto al total de pacientes estudiados en cada una de ellas.

Tabla 1 - Frecuencia general de las alteraciones moleculares

Alteración molecular	n	Positivos	%
RUNX1-RUNX1T1	91	22	24,2
CBFβ-MYH11	63	3	4,8
DIT FLT3	88	19	21,6
NPM1-A	61	25	41,0

% de pacientes positivos respecto a la "n" para cada alteración

La distribución por edades y el promedio de edad por grupo se muestra en la tabla 2. La edad promedio entre los pacientes fue de 30 años y el rango de edad estuvo entre dos meses y 87 años.

Tabla 2 - Distribución de los pacientes por edad

Grupo etario	Edad rango/promedio	No. de pacientes	%
< 2 años	2 m-1 a / 7 m	2	2,2
2 a < 18 años	2-17 a / 12 a	21	23,1
18 a 60 años	19-59 a / 38 a	50	54,9
> 60 años	63-87 a / 69 a	18	19,8

m: meses, a: años

La figura 1 muestra la distribución por edad en las alteraciones moleculares. No se muestra el grupo de niños menores de dos años (n= 2). Los porcentajes fueron calculados de acuerdo al total de pacientes en que cada alteración molecular pudo ser estudiada.

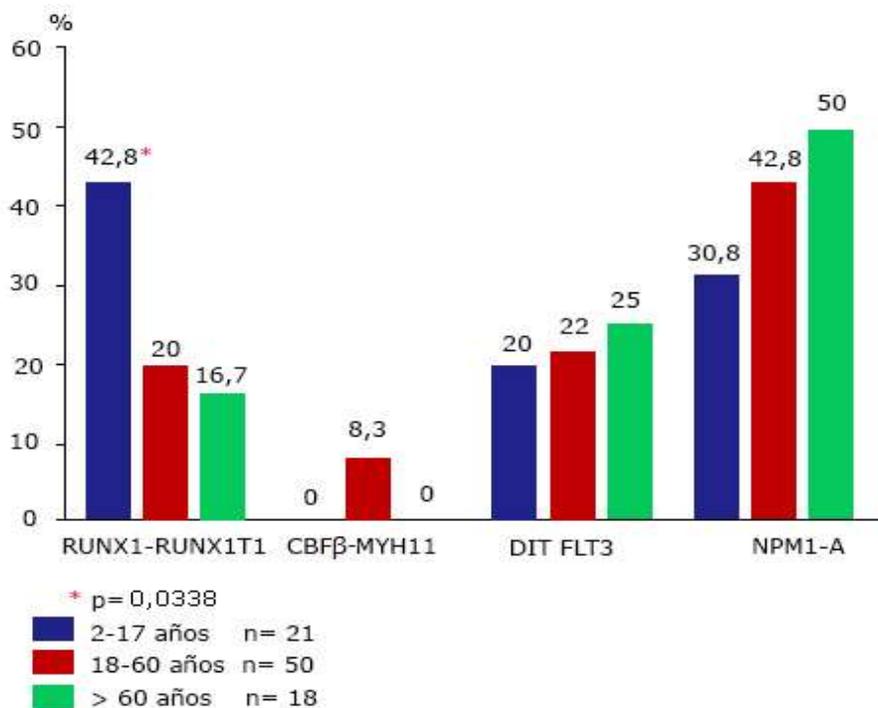


Fig. - Frecuencia de las alteraciones moleculares RUNX1-RUNX1T1, CBFβ-MYH11, DIT FLT3 y NPM1-A en pacientes con LMA primaria no promielocítica clasificados en 3 grupos etarios.

El análisis estadístico reveló que solo la presencia del RUNX1-RUNX1T1 tuvo relación con la edad (Fig.). Su frecuencia disminuyó en la medida que la edad aumentó y la diferencia fue significativa ($p= 0,0338$) entre el grupo de niños y los adultos. La diferencia entre ambos grupos de adultos, aunque mostró tendencia a disminuir hacia edades mayores, no fue significativa. El gen de fusión CBFβ-MYH11 solo se encontró entre los adultos menores de 60 años. Mientras que la DIT FLT3 tuvo una presencia casi uniforme en los tres grupos analizados. En el caso de la NPM1-A, aunque se observó una tendencia a aumentar con la edad, las diferencias no fueron significativas ($p> 0,05$). Su presencia fue mayoritaria entre los pacientes adultos. Mientras que en el grupo de niños la aberración más frecuente fue el gen de fusión RUNX1-RUNX1T1.

En algunos pacientes se observó la existencia simultánea de alteraciones. En 15 pacientes hubo más de una alteración. La NPM1-A y la DIT FLT3 aparecieron simultáneamente en nueve pacientes, resultando ser la combinación más frecuente. En algunos de los pacientes portadores del RUNX1-RUNX1T1 aparecieron también la NPM1-A ($n= 3$) o la DIT FLT3 ($n= 2$). Un paciente fue positivo a estas tres alteraciones. Mientras que el gen de fusión CBFβ-MYH11 se observó siempre como alteración única.

Discusión

El estudio molecular de las LMA permite ajustar el diagnóstico a las recomendaciones de la clasificación más actual para de esta manera aplicar medidas terapéuticas de acuerdo a cada paciente. También permite la estratificación según el riesgo y, a largo plazo, realizar una correlación con la respuesta al tratamiento para evaluar el pronóstico y la supervivencia.

Se conoce que la LMA se manifiesta mayormente en adultos y entre ellos es más frecuente en los mayores de 60 años.^(26,27,28) Sin embargo, en el presente estudio la mayor cantidad de adultos tuvo menos de 60 años. Es posible que muchos de los pacientes de avanzada edad, debido al alto riesgo que para ellos representa la LMA,⁽²⁷⁾ no alcancen a ser estudiados. Como era esperado, la cantidad total de pacientes pediátricos fue menor al total de adultos; tal fue así que la baja incidencia de niños menores de dos años no permitió realizar su análisis. Sólo pudo ser analizado el grupo de niños de dos años en adelante. Debe señalarse que esta investigación incluyó sólo a los pacientes con estudio molecular por lo que la muestra no representa la incidencia de la LMA en Cuba.

Desde el año 2002 la OMS incluyó, entre otros, dos subtipos específicos de LMA caracterizados por los genes de fusión RUNX1-RUNX1T1 y CBF β -MYH11. Como se conoce, estos se forman a partir de aberraciones cromosómicas estructurales y su presencia identifica un grupo de LMA denominado: LMA CBF. Aunque las LMA CBF se asocian a una evolución favorable; su coexistencia con otras anomalías citogenéticas y moleculares, así como otros elementos clínicos específicos influyen de manera diferente en la evolución de estos pacientes.^(29,30) De aquí que para predecir el riesgo en las LMA CBF, es importante realizar un análisis integral clínico, genético y molecular. Se ha encontrado que las fusiones que afectan el CBF pueden aparecer a cualquier edad pero tienen mayor incidencia en niños y adultos jóvenes.⁽³¹⁾

RUNX1-RUNX1T1

En este informe el gen de fusión RUNX1-RUNX1T1 fue más frecuente en la edad pediátrica y así lo describen también otros autores.^(30,32,33) La diferencia, que fue significativa entre niños y adultos, se corresponde con lo reportado por *Bolouri* y otros,⁽³⁴⁾ respecto a que aparece un pico de frecuencia en la edad pediátrica que disminuye con la edad.

En general, se plantea que el gen de fusión RUNX1-RUNX1T1 está presente aproximadamente entre el 5 % y 12 % de todos los casos de LMA.^(32,35,36) El porcentaje superior encontrado, tanto para el total de pacientes, como cuando fueron estratificados de acuerdo a la edad, pudiera estar relacionado con la no inclusión de pacientes con el subtipo LPM. Similar al presente es el caso del estudio de *Kihara* y otros,⁽³⁷⁾ que notifican una frecuencia del 20,8 % en un estudio en adultos donde no incluyen a la LPM, como en la presente investigación.

CBFβ-MYH11

La escasa presencia del gen de fusión CBFβ-MYH11 en este trabajo estuvo en correspondencia con lo descrito por otros autores.^(38,39,40,41) El CBFβ-MYH11 apareció con una frecuencia similar a la encontrada por *Slovak* y otros,⁽³⁹⁾ pero otros autores refieren frecuencias menores.^(40,41) En este sentido, *Vaskova* y otros⁽³⁸⁾ no encontró alteración en 90 pacientes adultos. Otros autores informaron frecuencias muy parecidas entre el RUNX1-RUNX1T1 y el CBFβ-MYH11. Sin embargo, en el presente estudio se encontró una frecuencia mucho menor del CBFβ-MYH11 respecto al RUNX1-RUNX1T1, lo que marca una diferencia con lo planteado en la literatura.

En los pacientes pediátricos de este trabajo, el comportamiento de la fusión CBFβ-MYH11 difiere de otros autores que sí lo encuentran.

NPM1

La presencia de mutaciones en el gen NPM1 osciló en un rango de entre 25 % a 53 % en todas las LMA.⁽¹⁸⁾ Los artículos coinciden en que estas son las que con mayor frecuencia aparecen en esta entidad. Ejemplo de esto es el estudio realizado recientemente por *Yusoff* y otros,⁽¹⁴⁾ los cuales estudiaron las mutaciones en los genes FLT3 y NPM1 de pacientes con LMA. Mediante la secuenciación del gen NPM1 encontraron que el 27,1 % de los pacientes presentaba alguna mutación; el porcentaje que resultó mayor al encontrado para las mutaciones en el gen FLT3 (DIT-FLT3 y mutaciones en el dominio tirosina quinasa de FLT3). En el presente trabajo, en que solo se estudió la NPM1-A, esta resultó ser la aberración más frecuente en el total de pacientes. Al analizar por grupos etarios, esta fue igualmente mayoritaria en los pacientes adultos; este hallazgo coincide con la literatura que identifica a la variante “A” como la que más se encuentra en pacientes adultos.⁽¹⁷⁾ Sin embargo, de manera similar a otros informes, no ocurrió lo mismo en los pacientes pediátricos; para estos se plantea que la mutación “B” y no la “A” es la que más se manifiesta.⁽¹⁷⁾

DIT FLT3

La DIT FLT3 puede aparecer en todos los subtipos de LMA. Se reportan frecuencias de aparición diferentes, desde un 20 hasta 37 % en el adulto.^(14,42,43,44,45,46,47,48,49) Mientras que en niños algunos autores encuentran frecuencias algo menores (entre el 10 y el 20 %, aproximadamente),^(50,51,52) otros plantean que su frecuencia varía muy poco con la edad⁽¹²⁾ y notifican que la DIT FLT3 aparece en alrededor del 25 % de todos los casos de LMA.^(12,53)

La presencia casi uniforme de la DIT FLT3 que se observó, así como la magnitud de las frecuencias en los tres grupos etarios está en correspondencia con la mayoría de autores, sobre todo con aquellos que encuentran que su frecuencia varía muy poco con la edad.

Coexistencia de alteraciones moleculares

La coexistencia de alteraciones moleculares apoya la hipótesis de “doble impacto” (conocida en inglés como “*two-hits*”) acerca de la leucemogénesis en la LMA.⁽⁵⁴⁾ Esta plantea que el desarrollo de la entidad requiere la presencia de más de una alteración molecular, casi siempre de una mutación de Clase I que aportan ventajas proliferativas o de supervivencia como la DIT FLT3, con otra de Clase II (RUNX1-RUNX1T1, CBFβ-MYH11 y NPM1, entre otras) que alteran la diferenciación celular y la apoptosis. No obstante, también pueden coexistir las de Clase II entre sí.

Duployez y otros,⁽⁸⁾ en un estudio de mutaciones en las LMA CBF encontraron concomitancia en más del 90 % de los pacientes. El fenómeno lo observaron tanto en presencia del RUNX1-RUNX1T1 como del CBFβ-MYH11 y sus pacientes presentaron desde dos hasta seis aberraciones juntas. En la presente investigación no se dispuso del estudio de las cuatro alteraciones en todos los pacientes por lo que no es válido analizar cuantitativamente el comportamiento de la concomitancia. Sin embargo, vale destacar la ocurrencia del fenómeno, pues apoya la hipótesis multifactorial de la leucemogénesis de la LMA. La concomitancia de la mutación NPM1-A y la DIT FLT3, de Clase II y I respectivamente, fue la más frecuente. Precisamente acerca de esta combinación *Liu* y otros⁽⁵⁵⁾ plantean que las mutaciones en NPM1, además de estar asociadas frecuentemente a CN, también lo están con frecuencia a la DIT FLT3. Respecto a esto, *Falini* y otros,⁽⁵⁶⁾ describieron en 2005 que alrededor del 40 % de las LMA con NPM1 mutado también presentan la DIT FLT3. Como se mencionó, la concomitancia de tres o más alteraciones moleculares está descrita;⁽⁵⁷⁾ en este estudio se presentaron tres en un paciente, el RUNX1-RUNX1T1, la NPM1-A (ambas de Clase II) y la DIT FLT3. Aunque no se encontró

coexistencia del gen de fusión CBF β -MYH11 (mutación de Clase II) con otra alteración otros autores sí la reportan; ejemplo de ello es su asociación con mutaciones en los genes KRAS, NRAS y KIT encontrada por *Paschka* y otros.⁽⁵⁸⁾

Con anterioridad, ha sido descrita la coexistencia del gen de fusión RUNX1-RUNX1T1 con las aberraciones CBF β -MYH11, DIT FLT3 y NPM1-A en un grupo de pacientes cubanos con LMA.⁽²⁴⁾ Sin embargo, el presente análisis no se centró solo en los pacientes positivos al RUNX1-RUNX1T1; por tanto, este representa el primer reporte de frecuencia de las cuatro aberraciones en pacientes cubanos con LMA no LPM.

Por primera vez se describe la frecuencia de los cuatro biomarcadores moleculares en pacientes cubanos con leucemias mieloides agudas primaria no promielocíticas; su comportamiento fue similar a lo descrito por otros autores, aunque se encontraron algunas particularidades.

Referencias bibliográficas

1. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. *Blood Cancer J.* 2016;6(7):e441.
2. Mendez LM, Posey RR, Pandolfi PP. The Interplay Between the Genetic and Immune Landscapes of AML: Mechanisms and Implications for Risk Stratification and Therapy. *Front. Oncol.* 2019;9:1162.
3. Damiani D, Tiribelli M. Molecular landscape in adult acute myeloid leukemia: where we are where we going? *J Lab Precis Med.* 2019;4:17.
4. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) cooperative group. *Br J Haematol.* 1976;33(4):451-8.
5. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood.* 2002;100(7):2292-302.
6. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al., The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009;114(5):937-51.

7. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-405.
8. Duployez N, Marceau-Renaut A, Boissel N, Petit A, Bucci M, Geffroy S, et al. Comprehensive mutational profiling of core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2451-9.
9. Sinha C, Cunningham LC, Liu PP. Core binding factor AML: New prognostic categories and therapeutic opportunities. *Semin Hematol*. 2015;52(3):215-22.
10. Opatz S, Bamopoulos SA, Metzeler KH, Herold T, Ksienzyk B, Bräundl K, et al. The clinical mutanome of core binding factor leukemia. *Leukemia*. 2020;34(6):1553-62.
11. Gu R, Yang X, Wei H. Molecular landscape and targeted therapy of acute myeloid leukemia. *Biomarker Res*. 2018;6:32.
12. Daver N, Schlenk RF, Russell NH, Levis MJ. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia*. 2019;33:299-312.
13. Muñoz D, Prada-Arismendy J, Castillo E. El Papel de FLT3 como Biomarcador en Leucemia Mieloide Aguda. *Arch Med*. 2018;14(1):1-9.
14. Yusoff YM, Seman ZA, Othman N, Kamaluddin NR, Esa E, Zulkipli NA, et al. Identification of FLT3 and NPM1 Mutations in Patients with Acute Myeloid Leukaemia. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019;20(6):1749-55.
15. Cao T, Jiang N, Liao H, Shuai X, Su J, Zheng Q. The FLT3-ITD mutation and the expression of its downstream signaling intermediates STAT5 and Pim-1 are positively correlated with CXCR4 expression in patients with acute myeloid leukemia. *Sci Rep*. 2019;9:12209.
16. Wang M, Yang C, Zhang L, Schaar DG. Molecular Mutations and Their Cooccurrences in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *Stem Cells Int*. 2017;2017(6962379):1-11.
17. Thiede C, Creutzig E, Reinhardt D, Ehniger 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(2):366-7.
18. Sportoletti P, Grisendi S, Majid SM, Cheng K, Clohessy JG, Viale A, et al. Npm1 is a haploinsufficient suppressor of myeloid and lymphoid malignancies in the mouse. *Blood*. 2008;111(7):3859-62.

19. Noguera NI, Breccia M, Divona M, Diverio D, Costa V, De Santis S, et al. Alterations of the FLT3 gene in acute promyelocytic leukemia: association with diagnostic characteristics and analysis of clinical outcome in patients treated with the Italian AIDA protocol. *Leukemia*. 2002;16(11):2185-9.
20. Ottone T, Ammatuna E, Lavorgna S, Noguera NI, Buccisano F, Venditti A, et al. An allele-specific RT-PCR assay to detect type A mutation of the nucleophosmin-1 gene in acute myeloid leukemia. *J Mol Diag*. 2008;10(3):212-6.
21. Garrote H, Lavaut-Sánchez K, Amor AM, Díaz C, Fernández L, Ruiz V, et al. Cinco décadas de la biología molecular y la citogenética aplicadas a la hematología cubana. *Rev Cub Hematol Inmunol Hemoter*. 2017;33(1):1-8.
22. Martínez G, Cayado N, Muñiz A, Espinosa E, Dorticós E, González A, et al. Diagnóstico molecular de la leucemia aguda promielocítica: resultados preliminares. *Rev Cub Hematol Inmunol Hemoter*. 2000;16(2):125-31.
23. Garrote H, Amor AM, Díaz CA, Suárez Y, Arencibia A. RUNX1-RUNX1T1: comportamiento en pacientes con leucemia mieloide aguda en nuestro medio. *Rev Cub Hematol Inmunol Hemoter*. 2015;31(4):417-25.
24. Garrote H, Amor AM, Díaz CA, Fernández L, Ruiz V, Machín S, et al. Caracterización del gen de fusión RUNX1-RUNX1T1 en pacientes cubanos con leucemia mieloide aguda, 2000-2016. *Rev Cub Hematol Inmunol Hemoter*. 2018;34(3):1-16.
25. Van Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of BIOMED-1 Concerted Action. *Leukemia*. 1999;13(12):1901-28.
26. Liesveld JL, Lichtman MA. Acute myelogenous leukemia. En: Kaushansky K, Lichtman MA, Prchal JT, et al., editores. *Williams Manual of Hematology*. 9th ed. United States of America: cGraw-Hill Education; 2016. p.1060-85.
27. Almeida AM, Ramos F. Acute myeloid leukemia in the older adults. *Leukemia Res Rep*. 2016;6:1-7.
28. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, et al (eds). *SEER Cancer Statistics Review, 1975–2017*, National Cancer Institute. Bethesda, MD. [acceso 29/02/2020] Disponible en: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2017/

29. Opatz S, Bamopoulos SA, Metzeler KH, Herold T, Ksienzyk B, Bräundl K, et al. The clinical mutastome of core binding factor leukemia. *Leukemia*. 2020;34:1553-62.
30. Sinha C, Cunningham LC, Liu PP. Core binding factor AML: New prognostic categories and therapeutic opportunities. *Semin Hematol*. 2015;52(3):215-22.
31. Schwaller J, Mercher T. Pediatric acute myeloid leukemia (AML): from genes to models towards targeted therapeutic intervention. *Front Pediatr*. 2019;7:401.
32. Reikvam H, Hatfield KJ, Kittang AO, Hovland R, Bruserud O. Acute myeloid leukemia with the t(8;21) translocation: clinical consequences and biological implications. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:104631.
33. Shiba N, Yoshida K, Shiraishi Y, Okuno Y, Yamato G, Hara Y, et al. Whole-exome sequencing reveals the spectrum of gene mutations and the clonal evolution patterns in paediatric acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2016;175(3):476-89.
34. Bolouri H, Farrar JE, Triche T, Ries RE, Lim EL, Alonzo TA, et al. The molecular landscape of pediatric acute myeloid leukemia reveals recurrent structural alterations and age-specific mutational interactions. *Nat Med*. 2018;24(1):103–12.
35. Krauth MT, Eder C, Alpermann T, Bacher U, Nadarajah N, Kern W, et al. High number of additional genetic lesions in acute myeloid leukemia with t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1: frequency and impact on clinical outcome. *Leukemia*. 2014;28(7):1449-58.
36. Kaushansky K, Lichtman MA, Prchal J, Levi MM, Press O, Burns L, et al. Acute Myelogenous Leukemia. In: William's Hematology. 9th Ed. New York: Mc Graw-Hill; 2016.
37. Kihara R, Nagata Y, Kiyoi H, Kato T, Yamamoto E, Suzuki K, et al. Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients. *Leukemia*. 2014;28(8):1586-95.
38. Vaskova J, Dubayova K, Cakanova G, Luckova I, Bochova I, Novotna G, et al. Incidence and Prognostic Value of Known Genetic Aberrations in Patients with Acute Myeloid Leukemia – a Two Year Study. *Klin Onkol*. 2015;28(4):278-83.
39. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood*. 2000;96(13):4075-83.

40. Leith CP, Kopecky KJ, Godwin J, McConnell T, Slovak ML, Chen IM, et al. Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group Study. *Blood*. 1997;89(9):3323-9.
41. Grimwade D, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, Harrison CJ, et al. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*. 2001;98(5):1312-20.
42. Infante MS, Piris MA, Hernández-Rivas JA. Alteraciones moleculares en leucemia mieloide aguda y sus implicaciones clínicas y terapéuticas. *Med Clin*. 2018;151(9):362-7.
43. Blau O. Gene Mutations in Acute Myeloid Leukemia- Incidence, Prognostic Influence, and Association with Other Molecular Markers. Guenova M y Balatzenko G. eds. *Leukemias- Updates and New Insights*. Croatia: Intech Open; 2015. p.75-100.
44. Wang L, Lin D, Zhang X, Chena S, Wang M, Wang J. Analysis of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in Chinese acute leukemia patients. *Leuk Res*. 2005;29(12):1393-8.
45. Auewarakul CU, Sritana N, Limwongse C, Thongnoppakhun W, Yenchitsomanus P. Mutations of the FLT3 gene in adult acute myeloid leukemia: determination of incidence and identification of a novel mutation in a Thai population. *Cancer Gen Cytogen*. 2005;162(2):127-34.
46. Burnatt G, Licínio MA, Gaspar PC, Ferreira AS, Reis ML, Rabello de Moraes AC, et al. Analysis of the presence of FLT3 gene mutation and association with prognostic factors in adult and pediatric acute leukemia patients. *Braz J Pharm Sci*. 2017;53(2):e16105.
47. Marcucci G, Haferlach T, Dohner H. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol*. 2011;29(5):475-86.
48. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374(23):2209-21.
49. Patnaik MM. The importance of FLT3 mutational analysis in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymph*. 2018;59(10):2273-86.

50. Meshinchi S, Stirewalt DL, Alonzo TA, Boggon TJ, Gerbing RB, Rocnik JL, et al. Structural and numerical variation of FLT3/ITD in pediatric AML. *Blood*. 2008;111(10):4930-3.
51. Mercher T, Schwaller J. Pediatric Acute Myeloid Leukemia (AML): From Genes to Models Toward Targeted Therapeutic Intervention. *Front Pediatr*. 2019;7:401.
52. Wu, X, Feng X, Zhao X, Ma F, Liu N, Guo H, et al. Prognostic significance of FLT3-ITD in pediatric acute myeloid leukemia: a meta-analysis of cohort studies. *Mol Cell Biochem*. 2016;420:121-8.
53. Levis M. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:220-6.
54. Conway O'Brien E, Prideaux S, Chevassut T. The epigenetic landscape of acute myeloid leukemia. *Adv Hematol*. 2014;2014(103175):1-15.
55. Liu Y, He P, Liu F, Shi L, Zhu H, Zhao J, et al. Prognostic significance of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia: A meta-analysis. *Mol Clin Oncol*. 2014;2(2):275-81.
56. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*. 2005;352(3):254-66.
57. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJP. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood*. 2016;127(1):29-41.
58. Paschka P, Du J, Schlenk RF, Gaidzik VI, Bullinger L, Corbacioglu A, et al. Secondary genetic lesions in acute myeloid leukemia with inv(16) or t(16;16): a study of the German-Austrian AML Study Group (AMLSSG). *Blood*. 2013;121(1):170-7.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

- Ana María Amor Vigil: Estuvo al frente de la investigación, elaboró la base de datos y participó en la revisión de historias clínicas. Realizó el estudio molecular que comprendió la extracción del material genético, las PCR y las electroforesis. Redactó el documento a publicar y realizó su corrección final.

- Londy Lorena Hernández Miranda: Participó en la revisión de historias clínicas, la elaboración de la base de datos y el procesamiento y análisis de los mismos. Esta publicación es parte de lo que fue su Trabajo de Culminación de la Especialidad de Hematología. Revisó y aprobó el texto final del artículo.
- Lic. Carmen Alina Díaz Alonso: Realizó el estudio molecular que comprendió la extracción del material genético, las PCR y las electroforesis. Revisó y aprobó el texto final del artículo.
- Vera Ruiz Moleón: Realizó el estudio molecular que comprendió la extracción del material genético, las PCR y las electroforesis. Revisó y aprobó el texto final del artículo.
- Lesbia Fernández Martínez: Realizó el estudio molecular que comprendió la extracción del material genético, las PCR y las electroforesis. Revisó y aprobó el texto final del artículo.
- Ignacio Oliva Hernández: Realizó el procesamiento estadístico. Revisó y aprobó el texto final del artículo.
- Heidys Garrote Santana: Autora principal del proyecto de investigación y del protocolo aprobado para su realización. Estuvo al frente de la investigación al comienzo de esta e inició la elaboración de la base de datos. Realizó la revisión crítica del contenido de la publicación y la aprobación de la versión final.