



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**CITARABINA E INHIBIDORES DE FLT3 EN
EL TRATAMIENTO DE LA LEUCEMIA
MIELOIDE AGUDA**

Autora: Rocío Clemente Caballero

Tutora: María Linares Gómez

Fecha: Convocatoria Junio 2018

Índice

1	Resumen	3
2	Abstract	3
3	Introducción	3
3.1	Leucemia mieloide aguda.....	3
3.2	Medicamentos empleados.....	4
3.2.1	Fármaco citotóxico	5
3.2.2	Inhibidor específico de membrana	6
3.3	Resistencias a las terapias.....	6
3.3.1	Características de CSC	6
3.3.2	Mecanismos generales de resistencia	7
4	Objetivos	8
5	Metodología	8
6	Resultados y Discusión	9
6.1	Citarabina.....	9
6.1.1	Mecanismo de acción de citarabina	9
6.1.2	Resistencias a citarabina.....	10
6.2	Inhibidores FLT3	12
6.2.1	Descripción del receptor FLT3	12
6.2.2	Mutaciones del gen FLT3	12
6.2.3	Inhibidores FLT3.....	14
6.2.4	Resistencias a Inhibidores FLT3	15
7	Perspectiva de futuro	16
8	Conclusiones	17
9	Bibliografía.....	19

1 Resumen

La leucemia mieloide aguda es una enfermedad cuyo tratamiento se debe adaptar a cada paciente, ajustando los medicamentos empleados al perfil genético de cada uno de ellos. Existen dos principales estrategias terapéuticas: el empleo de fármacos citotóxicos, como la citarabina; o el empleo de inhibidores específicos de membrana, como por ejemplo, los inhibidores FLT3. La citarabina, o ara-C, es un análogo de nucleósido de pirimidina que actúa inhibiendo la ADN polimerasa. Por otro lado, los inhibidores del receptor FLT3 actúan inhibiendo la función del receptor tirosina quinasa, impidiendo así la diferenciación y proliferación de los blastos.

Sin embargo, las células tumorales presentan distintos mecanismos de resistencia para evadir la actividad farmacológica de estos tratamientos. Ejemplos de ello son la deficiencia de la enzima desoxicitidina quinasa, lo que impide la activación y por tanto efecto de la citarabina sobre los blastos; o la activación de vías alternativas ante la inhibición del receptor FLT3, manteniendo así activa la proliferación tumoral de los blastos.

2 Abstract

The treatment for acute myloid leukemia is in constant evolution, due to research and the necessity to adapt the therapeutic strategy to each patient. The medicines employed depend on the genetic profile of each person. There are two main strategies: cytotoxic drugs, such as cytarabine, also known as ara-C; or specific target inhibitors, for example FLT3 inhibitors. Cytarabine is a pyrimidine nucleoside analogue which acts by inhibition of the DNA polymerase. On the other hand, FLT3 inhibitors target the tyrosine-kinase receptor, hampering the differentiation and proliferation of blast cells.

Nevertheless, tumor cells have different resistance mechanisms to avoid the drug effects. Examples of these are the deficiency of the enzyme desoxycytidine kinase, mutation which prevents the activation and therefore effect of cytarabine on blasts; or the possible activation of alternative pathways overcoming the inhibition of FLT3 receptor, allowing the blast cells to proliferate and providing them endurance.

3 Introducción

3.1 Leucemia mieloide aguda

La leucemia mieloide aguda, también conocida como leucemia mieloblástica aguda (LMA), es un trastorno clonal maligno del tejido hematopoyético en el que se altera la línea mieloide, que prolifera de forma anormal, provocando una invasión de la médula ósea. Este hecho afecta a la producción y diferenciación de las células sanguíneas, lo que desencadena una insuficiencia medular (ya que se quedan en estados prematuros de su desarrollo) e infiltración de tejidos extramedulares (1). Es una enfermedad muy agresiva de rápido avance.

Esta enfermedad afecta principalmente a adultos, pues la media de edad de los pacientes es de 64 años. Sin embargo, es el tipo de leucemia más diagnosticada durante la infancia. Se corresponde con un 15-20% de los casos de leucemia aguda infantil, el 80% de los casos en adultos (2), y el 40% de todas las leucemias en el mundo occidental. Su incidencia en Europa se estima en 3,7 casos/100.000 habitantes (3) y en 15 nuevos casos por millón de habitantes y año en España (4). Es por ello considerada una enfermedad rara cuyo tratamiento aún está en estudio y muchos de los fármacos en ensayos clínicos.

Los principales síntomas de los pacientes con LMA son:

- Sensación de cansancio, debilidad, mareos, dificultad de respirar, y palidez como consecuencia de la anemia producida por el déficit de glóbulos rojos.
- Hematomas, hemorragias de encías, nasales o de cualquier otro foco; consecuencia del déficit de plaquetas.
- Fiebre e infecciones provocadas por el déficit de granulocitos.
- Posible crecimiento de los ganglios linfáticos, hígado o bazo.
- Sintomatología específica de la infiltración del sistema nervioso central: dolor de cabeza, vómitos, somnolencia, etc.,
- Nódulos diseminados o zonas de piel engrosada si se da infiltración a nivel cutáneo.
- Inflamación de las encías y otras mucosas.
- Períodos menstruales abundantes.
- Visión borrosa y ceguera tras infiltración ocular (5, 6).

El **tratamiento** de la leucemia mieloide aguda se determinará en cada caso, teniendo en cuenta el subtipo de la enfermedad que presenten, edad, estado general del paciente y, posteriormente, la respuesta al tratamiento inicial. El 90% de personas afectadas, mayores de 65 años, fallecen por esta enfermedad, siendo la recaída después de la remisión completa el mayor responsable (7).

El objetivo principal del tratamiento es conseguir la remisión completa de la enfermedad a nivel molecular. La remisión molecular es el estadio en el que no hay marcadores biológicos a niveles detectables de la enfermedad, considerando por tanto que se ha extinguido. Para ello, el tratamiento se divide en dos fases: inducción a la remisión (etapa corta de quimioterapia intensa, cuyo objetivo es eliminar las células leucémicas - llamadas blastos - de la sangre y médula ósea hasta alcanzar la remisión completa) y post-remisión o consolidación (ciclos enfocados a eliminar células leucémicas residuales - enfermedad mínima residual - con el fin de evitar recaídas). (8)

La fase última de mantenimiento, que consiste en la administración de dosis bajas de quimioterapia durante largos periodos de tiempo (meses o años), rara vez se utiliza en los tratamientos de LMA. Su empleo es más común en otros tipos de leucemia.

Por último, mencionar que la quimioterapia puede ir seguida o no de un trasplante (autólogo o alogénico) de progenitores hematopoyéticos, que se extraen de médula ósea, sangre periférica o sangre de cordón umbilical a partir de un donante compatible.

3.2 **Medicamentos empleados**

Los medicamentos quimioterápicos más utilizados para el tratamiento de la LMA se pueden subdividir en dos tipos: fármacos citotóxicos e inhibidores específicos de diana (9).

Fármacos citotóxicos:

Citarabina	Inhibidor de la ADN polimerasa
------------	--------------------------------

Fármacos inhibidores específicos de diana:

Inhibidores FLT3 (iFLT3)	Inhiben la actividad del receptor FLT3 en blastos, disminuyendo la diferenciación y proliferación de los mismos.
--------------------------	--

6-Mercaptopurina (6-MP)	Inhibidor reversible competitivo de enzimas cuyo sustrato sea la hipoxantina y el ácido inosínico, provocando la síntesis de ácidos nucleicos fraudulentos.
-------------------------	---

Metotrexato	Análogo del ácido fólico, inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa.
-------------	---

Gemtuzumab ozogamicina	Anticuerpo monoclonal con unión a la proteína CD33, presente en la mayoría de células leucémicas, impidiendo la proliferación celular.
------------------------	--

Venetoclax	Inhibidor selectivo de la proteína BCL-2 (B-cell lymphoma), proteína que participa en la vía de señalización del p53, confiriendo mayor resistencia a fármacos y supervivencia a células tumorales. Venetoclax favorece la activación de las caspasas y la muerte celular programada.
------------	---

Inhibidores de IDH	Bloquean las proteínas IDH, favoreciendo la diferenciación fisiológica de las células leucémicas, formando células normales. También conocidos como agentes de diferenciación.
--------------------	--

3.2.1 Fármaco citotóxico

El principal representante de este grupo es la **citarabina**, o **ara-C**, un análogo de nucleósido de pirimidina, con estructura de β -D-arabinofuranosilcitosina. Actúa como agente antineoplásico específico de la fase S del ciclo celular (10). En el interior celular debe tri-fosforilarse, para ser el metabolito activo que se une a la cadena de elongación del ADN por competición con el sustrato desoxicitidina trifosfato (dCTP), inhibiendo así a la ADN Polimerasa.

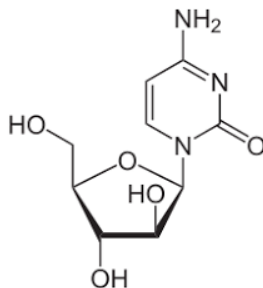


Ilustración 1: Imagen de ara-C

3.2.2 Inhibidor específico de membrana

Los representantes de inhibidor específico de membrana para la LMA son los **inhibidores de FLT3**. FLT3 (FMS-Like Tyrosine kinase) es un receptor de clase III, receptor de tirosina quinasa, que interviene en el proceso ontogenético hematopoyético, controlando la proliferación de células sanguíneas. Su función depende de factores de crecimiento tales como Stem Cell Factor e Interleucina 3, por lo que tiene un papel importante pero no absoluto (11). Afecta a la diferenciación, proliferación y apoptosis de las células hematopoyéticas. Hay fuerte evidencia de que el aumento en la expresión de FLT3 en blastos puede estar asociada a un peor pronóstico de la enfermedad (12), ya que aumenta la proliferación celular e impide la apoptosis natural de dichas células.

Debido a su importancia en la diferenciación y proliferación de células mieloides es un blanco molecular para muchas terapias (13). El desarrollo de inhibidores de FLT3 es una de las terapias con más futuro para la enfermedad, pues han demostrado inhibir la diferenciación y el crecimiento descontrolado de células hematopoyéticas. Van a actuar compitiendo por el sitio de unión del ATP dentro del dominio activo de la quinasa, impidiendo la fosforilación y por tanto la actividad del receptor.

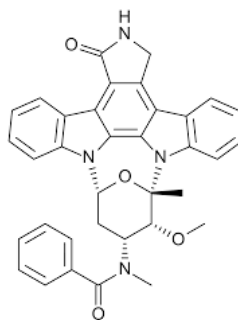


Ilustración 2: Imagen de midostaurin, inhibidor de FLT3 de primera generación

3.3 Resistencias a las terapias

3.3.1 Características de CSC

Se conoce como células madre tumorales (Cancer Stem Cells, CSC) a aquellas células tumorales capaces de resistir a los tratamientos antineoplásicos convencionales. Destaca su capacidad de sobrevivir pese a la acción farmacológica, producir una nueva población tumoral provocando una recaída en el paciente y consiguiente metástasis. Al ser células madre tienen la capacidad de producir todo tipo de células tumorales, incluidas las metastásicas.

La autoregeneración es un subtipo de división celular propio de células madre, responsable de la capacidad de dividirse de forma ilimitada y mantener el potencial para formar cualquier tipo de célula. Esta característica la poseen las CSC, pudiendo dividirse de forma asimétrica. La división asimétrica consiste en la formación de dos células, de las cuales una sigue siendo célula madre con todas sus propiedades, y una nueva célula diferenciada, cuya capacidad de multiplicarse es finita. La división ilimitada que presentan las células madre y CSC es principalmente consecuencia de la expresión de la telomerasa, enzima encargada de regenerar los telómeros al final de cada ciclo celular. En cada ciclo de división celular se pierden los últimos pares de bases del DNA, localizados en los telómeros, sin embargo, la actividad de la telomerasa revierte este efecto en aquellas células que expresan la enzima. La falta de la enzima provoca un acortamiento progresivo de los telómeros provocando que, cuando alcanza una longitud crucial, se emita una señal de daño celular que activa la apoptosis celular. Es un

mecanismo de regulación para la división limitada de las células epiteliales. Por tanto, aquellas células que expresan la telomerasa poseen los telómeros de mayor longitud con lo que evaden la apoptosis; y estas son las células madre.

Sin embargo, se ha observado que las CSC presentan telómeros muy cortos a pesar de sí expresar la telomerasa. Esto sugiere que la actividad de la enzima en las CSC no solo concierne a la elongación de los telómeros, teniendo otras funciones celulares como aumentar la movilidad celular y la proliferación celular; además de mantener a estas células con la capacidad de ser células madre (14).

A día de hoy, se desconoce el origen de estas CSC, aunque se han propuesto diferentes teorías que expliquen su formación. Una de ellas argumenta su formación a partir de células madre en las que se alteran las vías de 'de-regulation'. Defiende que deben provenir de las células madre ya que sus actividades son muy parecidas, excepto por la ausencia de muerte celular, lo que altera el balance homeostático; y defiende que no pueden surgir de células adultas puesto que estas ya no poseen la capacidad de dividirse ilimitadamente. Por otro lado, la teoría más aceptada por el momento es la que sugiere que las CSC se formen de otras células tumorales en las que se ve aumentada la vía de proliferación y división ilimitada. Incluye la activación de factores como TGF- β , Hedgehog, NF κ β , y la vía STAT3.

Aquellos tumores recurrentes que sobreviven al tratamiento inicial luego son más agresivos y su resistencia se ve aumentada, ya que las CSC nunca se eliminan, más bien se desarrollan y acumulan las mutaciones formando generaciones de CSC resistentes a tratamiento. En este hecho reside la importancia del estudio de las CSC.

En LMA las CSC son la población principal en la enfermedad residual mínima, protagonizando las recaídas de los enfermos. Pueden causar re-crecimiento tumoral y metástasis, lo cual subraya la importancia de eliminar al completo estas células para proporcionar supervivencia a largo plazo junto con eliminación total de la enfermedad.

3.3.2 Mecanismos generales de resistencia

Los mecanismos que emplean estas células para resistir a los tratamientos son algunos como el estado de latencia, aumento de reparación del ADN, aumento de expulsión del fármaco al espacio extracelular, disminución de apoptosis e interacción con el microambiente, con el nicho tumoral.

El **estado de latencia** es un periodo reversible durante el cual las células se encuentran en fase G0. Así evitan la acción de los fármacos frente a ellas, como por ejemplo de los citotóxicos que actúan sobre la ADN polimerasa. Al permanecer latente esta enzima, la actividad farmacológica es nula, asegurando la supervivencia celular. Este estado de latencia prevalece hasta la llegada de un estímulo mitótico que activa su ciclo celular.

Además, durante este periodo las células permanecen indetectables hasta la recaída de la enfermedad, donde se evidencia su presencia.

En su transcurso se encuentran aumentados los valores de BMP7, TGF- β 2, and VCAM-1, mientras que disminuye el índice de proliferación Ki-67.

El estado de latencia también podría verse favorecido por la inhibición de la vía **PI3K/AKT**. En situaciones de estrés las células tienden a inhibir esta vía, lo que induce el estado de latencia y provoca una inducción de la autofagia que parece ayudar a mantener los procesos metabólicos en CSC. Así son capaces de sobrevivir durante el periodo de G0.

Se ha visto como estas células presentan un aumento en la **reparación del ADN**, además de una **disminución** de los posibles **daños** del material genético. En estas células disminuyen los radicales oxidativos (ROS), responsables del daño genético gracias a que aumenta la catalasa, la peroxiredoxina, y la glutatión peroxidasa, todas ellas con actividad antioxidante. Todo ello ayuda a mantener un ADN en perfecto estado que no se ve alterado por la acción de los fármacos antineoplásicos.

Otro mecanismo conocido para las resistencias a las terapias es la **expulsión del fármaco al espacio extracelular**. Está principalmente mediado por transportadores MDR, como pueden ser las proteínas ABCB1 y ABCG2.

La mayoría de células resistentes a los tratamientos cursan con una **disminución de la apoptosis**, reflejado en el aumento de proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2, y la disminuida actividad de las caspasas.

Por último, remarcar la importancia del entorno en el **microambiente de los tumores**, pues alteraciones en esta zona confieren resistencia a las células como veremos a continuación. Un ejemplo es el aumento del factor TGF- β (14).

4 Objetivos

Los objetivos propuestos en este estudio son:

- Conocer dos de las principales estrategias terapéuticas actuales frente a la leucemia mieloide aguda.
- Evaluar las resistencias frente a dichos tratamientos.

5 Metodología

En este trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica guiada y tutorizada de artículos científicos relacionados con la leucemia mieloide aguda y sus tratamientos. Para ello se utilizaron las bases de datos bibliográficas PubMed, ScienceDirect y Google Scholar, restringiendo las búsquedas a los artículos más recientes, en su mayoría, y excluyendo aquellos que no estuvieran escritos en inglés o español. Las palabras clave utilizadas han sido: “leucemia mieloide aguda”, “tratamiento”, “resistencias”, “inhibidores FLT3”, “citarabina”, “mutaciones FLT3”.

6 Resultados y Discusión

6.1 Citarabina

6.1.1 Mecanismo de acción de citarabina

Citosina arabinosa (ara-C) es un análogo de desoxicitidina, un fármaco antimetabolito específico de la fase S del ciclo celular, etapa de replicación del ADN. En los últimos 40 años ha sido uno de los agentes más potentes empleados en el tratamiento de LMA. Su acción depende de ser activado en el interior celular por la desoxicitidina quinasa (DCK), convirtiéndose en el metabolito activo trifosforilado (araCTP). Dicha enzima tiene una cinética saturable por lo que elevadas dosis del fármaco dejan de ser efectivas por falta de formación del metabolito activo. Una vez este se ha formado hay dos vías posibles: su metabolización o su inclusión en las células mediante transporte activo. La entrada en las células es a través de hENT1, proteína específica encargada el transporte de ara-C al interior celular. La actividad de araCTP es la de inhibir selectivamente la ADN Polimerasa, mediante su incorporación a la cadena de elongación del ADN, de modo que inhibe la enzima, provocando la muerte celular. El fármaco trifosforilado es reconocido por la ADN Polimerasa por su analogía con desoxicitidina trifosfato (dCTP), con el que compite por la incorporación a la hebra de ADN en formación (15, 16).

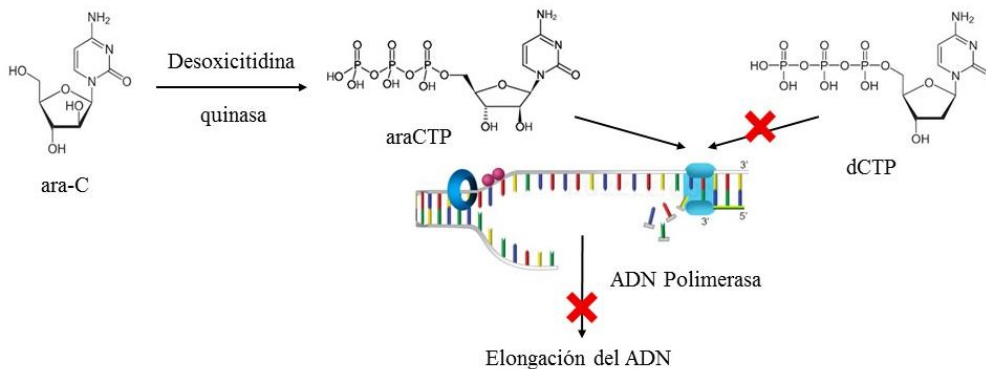


Ilustración 3: Imagen del mecanismo de ara-C

Se administra en perfusión intravenosa durante 7 días seguido de la administración de un antibiótico del grupo de las antraciclinas, generalmente daunorubicina, durante 3 días (esquema 7 + 3). La daunorubicina ha demostrado tener propiedades antitumorales mediante su unión a las dos hebras del ADN y desenrollado de la hélice. Se intercala entre pares de bases adyacentes e impide la correcta formación del material genético, lo que favorece la muerte celular. Su mecanismo de acción no se conoce completamente, y se cree puede interactuar también con la polimerasa y la topoisomerasa II, además de favorecer reacciones de oxidación-reducción que generan radicales libres, de gran toxicidad para las células, provocando su muerte.

Esta estrategia terapéutica de administración de citarabina junto con daunorubicina ha sido empleada desde hace más de 40 años. Se ha comparado con otras variantes, como distintos intervalos en la administración de cada fármaco o con la posible adición de un tercer fármaco, pero no logran mejorar la supervivencia de los pacientes, siendo el esquema 7 + 3 el que proporciona los mejores resultados (17). Por otro lado, un estudio reciente comparó la eficacia en la administración de ara-C junto con daunorubicina (A + D) o con idarubicina (A + I) para la LMA, y los resultados obtenidos fueron muy favorables para la idarubicina. La idarubicina es también una antraciclina, pero su mecanismo de acción difiere al de la daunorubicina. Inhibe la síntesis del material genético mediante interacción con la topoisomerasa II. Aquellos

pacientes que recibían A + I presentaban una menor resistencia y sobre todo una mayor remisión completa de la enfermedad (18). Esto sugiere que nuevos fármacos podrían obtener mejores resultados que los conseguidos con A + D (7 + 3), a pesar de haber sido el tratamiento general más eficaz empleado hasta la fecha. Lo que se mantiene evidente es el esquema de tratamiento 7 + 3 como la mejor opción, sin modificar los días de administración ni el número de fármacos.

Uno de los inconvenientes de la citarabina es su rápida metabolización por la citidina desaminasa, enzima que cataboliza rápidamente su transformación en el metabolito inactivo β -D-arabinofuranosiluracilo. Por ello, la citarabina suele administrarse simultáneamente con tetrahidrouridina (THU), un inhibidor reversible de la citidina desaminasa. THU es un análogo estructural al estado de transición de la citarabina, y va a competir por su unión a la enzima. Dado que la citidina desaminasa presenta mayor afinidad por el inhibidor que por el sustrato, gracias a esta asociación se consigue mayor duración de los efectos de la citarabina al retrasar la degradación de la misma.

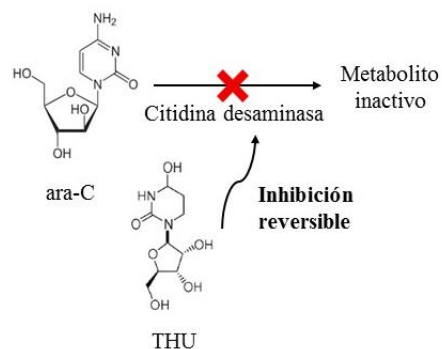


Ilustración 4: Imagen del mecanismo de THU junto con ara-C

6.1.2 Resistencias a citarabina

Los mecanismos de resistencia a citarabina pueden subdividirse en alteraciones en el transporte, como mutaciones en hENT1, o puntos de unión nucleósido-membrana defectuosos (defective membrane nucleoside binding sites), que provocan una menor entrada del fármaco en las células diana por transporte defectuoso; o alteraciones que afectan a la inhibición de la ADN polimerasa, como mutaciones de DCK, que impiden la fosforilación y por tanto activación de ara-C, o aumento de dCTP, disminución del ratio mitótico, etc. Todos ellos provocan la pérdida de funcionalidad del fármaco y por tanto su ineffectividad terapéutica (15). Estas alteraciones pueden tener su origen en mutaciones génicas o cromosomales, cross-over mitóticos o amplificaciones genéticas específicas.

Tras el tratamiento las células resistentes aumentan en proporción ya que las que no lo son desaparecen de forma selectiva por los fármacos empleados, y además el tratamiento puede provocar mutaciones en las células sanas, convirtiéndolas en resistentes, hecho que favorece el aumento proporcional de células resistentes (19).

Se demostró que uno de los mecanismos más frecuentes de resistencia en los blastos de pacientes de LMA clínicamente resistentes a citarabina es la **deficiencia de desoxicitidina quinasa** (15, 16). Esta enzima cataliza la formación del metabolito activo, por lo que una disminución en los niveles de la proteína provoca una menor concentración de araCTP en la célula diana. Esto implica una menor inhibición de la ADN Polimerasa, y por tanto la actividad farmacológica de la citarabina se ve disminuida. La actuación de la citarabina es directamente dependiente de su trifosforilación, ya que la ADN polimerasa solo reconoce sustratos trifosforilados.

Se han comparado los niveles enzimáticos entre células resistentes y sensibles a ara-C, obteniendo solo una diferencia significativa con la mencionada enzima, DCK; y no con otras como por ejemplo la desoxicitidina desaminasa. No aparece una variación significativa entre células resistentes y sensibles, con que no se le puede relacionar con mecanismos de resistencia (16). Solo los niveles de DCK se encuentran con diferencia significativa entre ambos tipos de

células estudiados, habiendo mayor concentración de DCK en células sensibles a ara-C. Se deduce una relación directa entre la disminución de DCK y la resistencia a ara-C, fácilmente explicada con el mecanismo de acción del fármaco y la importancia de la enzima.

Por otro lado, existen células resistentes que muestran un **aumento de dCTP**, lo que se traduce en una mayor concentración de sustrato análogo con el que compite la citarabina en su unión a la ADN polimerasa. Esto afecta a la actividad del fármaco, pues una misma dosis de antimetabolito va a tener que competir con mayor cantidad de dCTP, lo que de manera directa provoca que la citarabina va a inhibir en menor proporción la elongación del ADN, resultando en una resistencia de la célula al fármaco (20).

De Saint Vincent y Buttin describen dos posibles fenotipos de células resistentes a citarabina derivadas de sencillas mutaciones genéticas:

- Cepas resistentes a altas dosis de ara-C, consecuencia de una mutación genética recesiva que provoca una deficiencia de la desoxicitidina quinasa citoplasmática. Una mutación recesiva no se espera que sea expresada en células hijas y por tanto consideran de menor relevancia.
- Cepas resistentes a bajas concentraciones de ara-C, relacionado con un aumento de desoxicitidina trifosfato (dCTP). Resultó que también eran resistentes al efecto citotóxico producido por exceso de timidina (dT).

Estos resultados se obtienen en su estudio llevado a cabo en células de ovario de hámster chino (CHO), por lo que los resultados podrían variar al extrapolarse a células humanas (20). La importancia de estas mutaciones reside en aquellas de carácter dominante, ya que son las transmisibles a células hijas y que por tanto pueden asegurar la resistencia a citarabina en generaciones futuras de células cancerosas, acumulándose las mutaciones durante largos periodos de tratamiento a base de ara-C. Es un descubrimiento importante ya que arroja más luz sobre los mecanismos de resistencia, sugiriendo que la disminución de DCK es una adaptación que puede ocurrir en una célula ante la elevada concentración de ara-C durante el tratamiento. Sin embargo, al ser de carácter recesivo, es una adaptación 'individual' con bajo poder hereditario. Por su parte, el aumento de dCTP es debido a una mutación de carácter dominante por lo que se puede encontrar en células que participan en las recaídas de la enfermedad. Esto encamina a estudiar dicha mutación en las células tumorales que presente el paciente en la recaída, ya que podría modificarse la estrategia terapéutica a seguir.

Otro factor que explica la aparición de resistencias al tratamiento con ara-C es el **ratio mitótico**. Ara-C es un fármaco específico de la fase S del ciclo celular, por lo que una alteración en el ratio mitótico que implique menor velocidad de división celular provoca directamente una menor sensibilidad al fármaco. Así parece que los blastos disminuyen su velocidad de división para evadir la actuación del fármaco sobre ellos (16). Es un mecanismo de resistencia ya que un ciclo celular más lento en los blastos disminuye en número la cantidad de veces que los blastos van a encontrarse en fase S, ya que se alargan las demás fases del ciclo celular. Esto disminuye el tiempo posible de actuación del ara-C, y por tanto una resistencia de la célula frente al fármaco. Bien se sabe que muchos fármacos citotóxicos actúan sobre células cuya división celular esta anormalmente aumentada, característica general de células tumorales.

Por último, es de gran importancia el tiempo de retención del fármaco en las células objetivo. Se ha demostrado relación directa entre la duración de araCTP en el interior de las células y la remisión de la enfermedad (15), ya que un mayor tiempo en el interior celular sugiere mayor actividad farmacológica. Dos posibles mecanismos de resistencia están relaciones en este hecho:

- Alteraciones en las proteínas hENT1, ya sea por pérdida de afinidad como por menor expresión de la proteína, que tienen como consecuencia menor concentración de araCTP en los blastos por disminución en la entrada del fármaco a la célula.
- La presencia de proteínas que expulsan el fármaco al exterior celular, que disminuyen de forma instantánea la concentración de araCTP en la célula.

6.2 Inhibidores FLT3

6.2.1 Descripción del receptor FLT3

FLT3 (FMS-Like Tyrosine kinase) es un receptor transmembrana de tirosina quinasa, clase III, activado por ligando. Favorece la diferenciación y proliferación celular, teniendo un papel muy importante en el desarrollo de ambas líneas, linfoide y mieloide (21). El gen FLT3 codifica para la proteína que forma el receptor, constituido por cinco dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina en la región extracelular, un dominio yuxtamembrana, dos dominios tirosina quinasa separados por un dominio de inserción de quinasa y un dominio C-terminal en la región intracelular (22). FLT3 va disminuyendo en las células según se diferencian. Debido a la alteración de los blastos y la no diferenciación que caracteriza la enfermedad, el receptor FLT3 se mantiene expresado en las células, ejerciendo su función de proliferación. (23)

El ligando de FLT3, conocido como FL se expresa en muchos tejidos como el timo, bazo, médula ósea, sangre periférica, ovarios, próstata, placenta, etc; presentando los niveles más altos en células mononucleares de sangre periférica. FL se une al receptor por los dominios extracelulares, lo activa, y se desencadena la fosforilación de SHC1 y AKT1, cuya cascada de señalización concluye en mTOR. También se activa la vía RAS/RAF con la consiguiente activación de MAPK1/ERK2 y/o MAPK3/ERK1 (21), y otras vías de señalización como PI3K/AKT, y JAK/STAT 5 que todas ellas llevan la proliferación e inmortalización de las células por impedir la apoptosis natural (24, 25).

Además, FL exógeno incrementa la proliferación de blastos en pacientes con las mutaciones FLT3-ITD y FLT3-TKD (24).

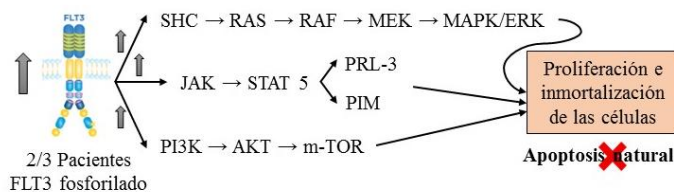


Ilustración 5: Mecanismo del receptor FLT3 en blastos.

6.2.2 Mutaciones del gen FLT3

El gen FLT3 suele encontrarse mutado en un alto porcentaje de pacientes con LMA (30% de pacientes de nuevo diagnóstico), siendo las mutaciones más comunes la duplicación en tándem interna (ITD) y la mutación en el dominio de tirosina quinasa (TKD).

La importancia de estas mutaciones en el receptor FLT3 es por su efecto como mecanismo de resistencia a los tratamientos. Por ello es de gran importancia realizar test genéticos en el

diagnóstico temprano de la enfermedad, enfocados a detectar la presencia o ausencia de mutaciones. Se deberían llevar a cabo test genéticos a lo largo de todo el tratamiento, para comprobar la posible evolución de las mutaciones y usar esta información prospectivamente, de forma que las decisiones terapéuticas sean más ajustadas. De este modo se podría llevar a cabo una estrategia terapéutica dirigida y por tanto de mayor eficacia. No obstante, este área necesita más investigación ya que existen algunos obstáculos como la interpretación de los datos y valores de referencia aún por definir, y son esenciales para desarrollar un método común de diagnóstico. Según aumente la conciencia sobre la importancia del receptor FLT3 y la disponibilidad de sus inhibidores, irán aumentando los test diagnósticos (24, 25).

La mutación ITD aparece en el dominio yuxtamembrana, y es la más común, detectándose en un 20-25% de los casos. Por otro lado, la mutación TKD aparece en los dominios tirosina quinasa, y consiste en un cambio de aspártico por tirosina. Su incidencia es menor al 10% en los pacientes con LMA. En comparación con pacientes exentos de mutación, aquellos que presentan las mutaciones FLT3-ITD tienen un peor pronóstico, con mayor riesgo de recaída y menor supervivencia general. Sin embargo, la relación de FLT3-TKD con el pronóstico de los pacientes no está bien definido, pues el volumen de estudios llevados a cabo es menor (26), y algunos indican que las mutaciones FLT3-TKD son las responsables de las resistencias a los inhibidores (23). Ambas van a promover una fosforilación constitutiva del receptor, lo que conlleva una activación independiente de ligando. Esto aumenta la proliferación y supervivencia de blastos.

Las mutaciones FLT3-ITD han sido más estudiadas. Se sabe que causan la pérdida de función auto-inhibitoria, lo que conlleva la activación de las vías de señalización proliferativas (21, 27). Se ha descrito que dicha mutación activa principalmente la vía STAT5, importante para el crecimiento celular, lo cual puede explicar el rol de FLT3-ITD en el crecimiento excesivo de células leucémicas. Por otro lado, se cree que la señalización de STAT5 y la activación de RAC1 podrían estar implicadas en el aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), provocando inestabilidad genómica y aumento de daño en el ADN. En tal caso, explicaría el mal pronóstico que tienen los pacientes con LMA con FLT3-ITD (24).

La importancia de la mutación FLT3-ITD reside en su capacidad de multiplicarse. Supone una ventaja para la célula que la presenta, ya que posee una proliferación aventajada, va a multiplicarse y volverse el clon dominante, generando una expansión de sí misma en un microambiente. Esto se sabe ya que el 75% de pacientes con FLT3-ITD al inicio del tratamiento continúa presentando la mutación en la recaída, lo que sugiere que es muy difícil de eliminar (sobrevive al tratamiento), considerándola por tanto dominante. Esto hace pensar que sea conductora de la enfermedad ('driver mutation'), o al menos responsable de la recaída, período cuya evolución parece depender mucho más de la señalización de FLT3 (23, 25).

En las recaídas es muy importante el concepto de evolución clonal, puesto que nuevas mutaciones que no hubo durante la etapa inicial de la enfermedad pueden haber aparecido o incluso haber mutado las que ya se detectaron en la primera fase de la enfermedad, afectando al pronóstico y tratamiento. En un 20% de los casos la mutación presente en la recaída es distinta a la inicial, o incluso una nueva mutación. En un 8% de los casos en la recaída aparece una FLT3-ITD que antes no estaba presente, frente a un 2% de probabilidad de presentar FLT3-TKD en la recaída. En comparación, un mayor porcentaje de mutaciones FLT3-TKD se pierden y no vuelven a presentarse en la recaída, respecto a las ITD. Esto sugiere que las FLT3-TKD

son más quimiosensibles, por lo que se eliminan tras el tratamiento. Un alto porcentaje de pacientes con FLT3-ITD en el primer diagnóstico de la enfermedad la sigue manteniendo en la recaída. Las mutaciones FLT3-ITD que aparecen *de novo* en la recaída podrían explicarse como errores en el diagnóstico inicial, en el que no se detecten las mutaciones FLT3-ITD que ya estaban presentes. Así pasan inadvertidas hasta la recaída, cuando su expresión es ya a niveles detectables. Esto refuerza la idea de carácter dominante y ventaja de supervivencia puesto que se mantienen sin ser eliminadas en el tratamiento en su mayoría. Esta propiedad se acentúa en la recaída ya que tras la quimioterapia las condiciones de supervivencia para otras células son más difíciles, pero aquellas con la mutación ITD demuestran mantenerse y en esta situación se encuentran en mayor proporción. Distintos autores lo explican como un proceso de selectividad natural. Todo ello hace que la mutación FLT3-ITD sea muy negativa para los pacientes, con muy mal pronóstico y menor esperanza de vida, reforzado por la dificultad de eliminarla (25). Hay estudios que remarcan la importancia de combinaciones de mutaciones por encima de mutaciones individuales, pero es un terreno menos estudiado por el momento.

A pesar del mal pronóstico con las mutaciones ITD, los avances conseguidos con los inhibidores de FLT3 han aumentado la esperanza terapéutica. Un estudio comparó la supervivencia general y el tiempo transcurrido hasta la recaída de la enfermedad entre pacientes con LMA FLT3-ITD desde el 2000 hasta 2014, concluyendo que gracias a la introducción de los inhibidores FLT3 en los tratamientos, ambos parámetros han mejorado para los pacientes (28). Los inhibidores FLT3 son capaces de eliminar dichas mutaciones en los blastos circulantes, pero no en aquellos de médula ósea. Esto se debe a mecanismos de resistencias específicos del microclima que veremos más adelante (29).

6.2.3 Inhibidores FLT3

Los inhibidores de FLT3 (iFLT3) son inhibidores de tirosina quinasa. Van a competir por el sitio de unión del ATP dentro del dominio activo de la quinasa, impidiendo la fosforilación y por tanto la activación del receptor. Estos fármacos han demostrado ser efectivos, además de capaces de inducir la apoptosis de los blastos (24). Están subdivididos en dos generaciones:

Primera generación	Midostaurin Lestaurtinib Sunitinib Sorafenib
Segunda generación	Quizartinib Crenolanib PLX3397 ASP2215

Los fármacos de primera generación son poco específicos, actuando también sobre otras quinasas como el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, el receptor de factor de crecimiento endotelial, KIT, y la quinasa Janus 2; y todos ellos también estimulan el crecimiento celular (9). Puede interpretarse como una ventaja ya que al actuar sobre otras quinasas van a disminuir la aparición de resistencias (23); no obstante, esto provoca alta toxicidad, y baja eficacia en pacientes con FLT3 sin mutar, obligando a investigar una segunda generación. Los resultados de la primera generación solo son buenos si se usan combinados con quimioterapia, no en monoterapia (25). La segunda generación está formada por fármacos mucho más potentes y selectivos que los anteriores, y por tanto menos tóxicos. No están exentos de toxicidad, también presentan efectos adversos, sin embargo, son más selectivos que los

anteriores, lo que permite utilizar altas dosis de fármaco ofreciendo mejores resultados al tratamiento (23, 25). Esta mayor selectividad promete una mayor eficacia en LMA con FLT3 mutado. El futuro de estos inhibidores en combinación con la quimioterapia promete dar buenos resultados (24). Presentan mayor eficacia en tratamiento dual que solos en monoterapia. Una potente inhibición de FLT3-ITD ha demostrado lograr la apoptosis de estos blastos (23).

Estos inhibidores pueden dividirse en dos subgrupos. Ambos van a actuar siempre sobre la conformación activa. Los de tipo I son inhibidores que actúan fijándose al sitio de unión del ATP o a un lugar próximo. Son efectivos frente a mutaciones ITD y TKD. Aquellos de tipo II actúan uniéndose al lugar adyacente al sitio de unión de ATP, por lo que son efectivas contra mutación ITD pero no frente a las TKD (25).

Esta subdivisión conlleva a la resistencia cruzada, que explica como si una célula es resistente a un inhibidor lo será a los demás del mismo grupo (23).

6.2.4 Resistencias a Inhibidores FLT3

La respuesta al tratamiento con los inhibidores de FLT3 es lenta debido a la amplia aparición de resistencias, muchas de ellas aún desconocidas. La primera causa de resistencia son las mutaciones, generalmente del receptor FLT3, aunque también aparecen en otras quinasas. Otros mecanismos de resistencias al tratamiento son mediante la activación de vías alternativas de señalización que promueven la proliferación de blastos (23, 25).

Las **mutaciones en FLT3** van a aparecer principalmente en el sitio de unión para el ATP en la tirosin quinasa, lo que altera el estado conformacional y por tanto la afinidad de los inhibidores a FLT3. Una mutación puntual en el sitio de unión es suficiente para resistir al tratamiento y aumentar la fosforilación del receptor, que por consiguiente aumenta la actividad de sus vías (upregulation) (24). Se traduce en un aumento de la proliferación celular.

Actualmente se están desarrollando moléculas en la nueva generación de iFLT3 (entre ellos crenolanib) activos frente a las mutaciones y capaces de inhibir el receptor FLT3 a pesar de las resistencias derivadas de mutaciones. El futuro parece bastante prometedor y con buenas expectativas para una enfermedad que, de otro modo, es muy agresiva y con una baja probabilidad de supervivencia (24). No obstante, la mejor medida actual es usar una combinación de regímenes en el tratamiento (25).

La **activación de vías alternativas** ocurre de forma paralela a la aparición de mutaciones. Se produce una activación constante de las vías MAPK y STAT5, lo que contribuye a la resistencia. Una de las vías que puede verse aumentada es la de STAT5, cuya cascada de señales va a activar quinasas Pim que van a fosforilar BAD (proteínas pro-apoptóticas). Esta fosforilación provoca que queden secuestradas en el citoplasma y por tanto la actividad que predomina en la célula es la de Bcl2 (proteínas anti-apoptóticas). Se ha visto como un número notable de células mutadas y resistentes a los inhibidores presentan elevada actividad de Pim, altos niveles de BAD fosforilada y por tanto protección frente a la apoptosis.

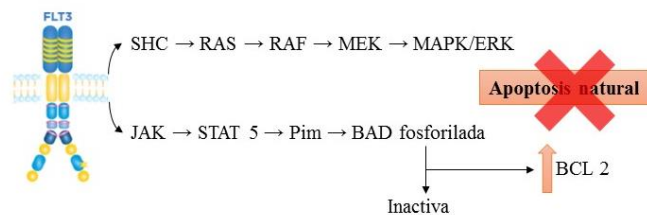


Ilustración 6: Vías alternativas activadas como mecanismo de resistencia frente a FLT3.

De esta manera, a pesar de la inhibición de las vías cuyo promotor sea el receptor FLT3, la célula mantiene otras rutas que favorecen la proliferación celular, disminuyendo la eficacia terapéutica de los fármacos iFLT3.

Además, si la célula expresa altos niveles de Bcl2 por otras vías va a desarrollar resistencia a la apoptosis, haciendo importante el estudio de inhibidores específicos de estas proteínas (23).

Otros hechos que favorecen la resistencia de estas células a los tratamientos son las condiciones del **microambiente de la médula ósea**. Por ejemplo, la alta concentración de ligando de FLT3 en la proximidad de los blastos disminuye la eficacia del tratamiento. Estudios in vitro muestran que altos niveles del ligando pueden conseguir una actividad constante de la vía FLT3/MAPK, lo que mantiene las señales de proliferación y supervivencia en los blastos, a pesar de que existan niveles de inhibidores FLT3 activos (23, 29).

Además, parece que en este microclima existe una actividad metabólica similar a la de los hepatocitos, donde se metabolizan los sustratos de CYP3A4, entre ellos los inhibidores FLT3, cuyos niveles van a disminuir. Son unas condiciones específicas que pueden encontrarse en el microambiente de la médula ósea y no en sangre periférica, lo que conlleva una ineffectividad del tratamiento en médula ósea, donde sobreviven dichos clones (23). Es por ello que la enfermedad mínima residual suele concentrarse en médula ósea, donde encontramos alta proporción de blastos resistentes a los tratamientos.

Del mismo modo, un aumento del metabolismo hepático de CYP3A4 provoca niveles plasmáticos insuficientes de los inhibidores FLT3, lo que afecta a nivel sistémico (25).

Por tanto, para eliminar LMA residual, principalmente constituida por clones FLT3-ITD, se necesitan medidas terapéuticas adicionales a los inhibidores FLT3, como terapia dirigida frente al microclima de la médula ósea, o a las proteínas Bcl2, junto con una potente activación de la respuesta inmune (23).

7 Perspectiva de futuro

En cuanto a la citarabina es necesario aumentar el estudio de la aparición de resistencias, ya que es uno de los fármacos empleados de mayor antigüedad, pero del que solo hay unos pocos mecanismos de resistencia descritos con exactitud. Podría conseguirse una mayor eficacia terapéutica si se conocieran mejor, posibilitando la asociación de citarabina con otros fármacos que potencien la acción de la misma al conseguir superar dichos mecanismos de resistencia. Un ejemplo de ello es la asociación de la citarabina con THU, pero podrían aparecer nuevas asociaciones para pacientes en los que se diagnostique alguna alteración que cause resistencia. Así mismo, continuar con la investigación de la idarubicina en el tratamiento conjunto con ara-C (A + I) ya que los resultados obtenidos hasta el momento son prometedores, e incluso con otros antibióticos, de la clase de las antraciclinas principalmente, que puedan mejorar el pronóstico para los pacientes.

Por otro lado, los inhibidores de FLT3 son un grupo de fármacos más recientes y cuyo empleo en la terapia de los pacientes está más condicionado por un diagnóstico genético en el que se determinen las alteraciones de los blastos. Es por ello que como estrategias de futuro aparece el uso de agentes hipometilantes, por ejemplo 5-azacitidina, en combinación con los inhibidores puesto que podrían dar buenos resultados. Esta asociación se propone ya que los agentes hipometilantes aumentan la sensibilidad celular frente a los inhibidores FLT3. Siguiendo esta línea de terapia combinada, en el futuro podrían asociarse los inhibidores FLT3 con otros inhibidores de la vía ERK/MAPK/MEK que pueden actuar a distintos niveles. Estudios recientes han demostrado la efectividad de esta asociación gracias al sinergismo mediante la inhibición multi-quinasa (23). Con ello se impide la activación de dicha vía, que tiene como consecuencia una disminución de la diferenciación y proliferación anormal de los blastos. Además, parece disminuir la aparición de resistencias a los inhibidores FLT3.

Finalmente, proponer el estudio de fármacos que actúen a nivel de las Pim quinazas inhibiendo su actividad, que es la de fosforilar y por tanto inactivar las proteínas pro-apoptóticas BAD. De este modo se mantendría la acción pro-apoptótica en los blastos. Y también fármacos que impidan directamente la expresión de Bcl2, proteína anti-apoptótica que confiere a las células supervivencia ilimitada.

8 Conclusiones

Tras la revisión bibliográfica realizada se han obtenido las siguientes conclusiones:

- La citarabina y los inhibidores FLT3 son dos fármacos de alta eficacia en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda, avalada por numerosos estudios, ensayos clínicos, y resultados en la práctica diaria. No obstante, la remisión completa se alcanza en muy bajo porcentaje de casos, por lo que la enfermedad no deja de ser mortal, aumentando la urgencia por un tratamiento completamente eficaz.
- A pesar de los buenos resultados obtenidos con ambos fármacos, es importante continuar investigando nuevas combinaciones y pautas de los mismos (ara-C e iFLT3), así como nuevos fármacos, para lograr disminuir el número de decesos cuya causa es esta enfermedad.
- Los blastos presentan diversos mecanismos de resistencia con los que consiguen disminuir el efecto farmacológico que el tratamiento ejerce sobre ellos. La gran mayoría de ellos se deben a mutaciones génicas de fácil identificación mediante un diagnóstico que incluya análisis genético, especialmente importante en las recaídas, aunque se recomienda realizar estos análisis a lo largo de todo el proceso para estudiar la evolución genética del paciente. Es por ello importante incluir este tipo de análisis en el protocolo general del diagnóstico de la enfermedad, ya que conocer el perfil genético del paciente modifica la estrategia terapéutica a seguir.
Además, es necesario un avance para establecer valores de referencia y un método común para interpretar los datos obtenidos tras dicho examen genético, que se encuentran aún sin definir.
- Se debe continuar y fomentar la investigación de nuevas moléculas que actúen contrarrestando las resistencias que aparezcan para poder administrarlas en combinación con el tratamiento principal elegido para el paciente. Así su adición

permitirá que el tratamiento mantenga la eficacia deseada, fomentando la terapia combinada para eliminar la LMA.

- Mencionar que es complicado evitar la aparición de resistencias a los tratamientos, ya que son mecanismos de adaptación propios de las células para su supervivencia. Por ello es importante conocer la aparición de dichos mecanismos y actuar frente a ellos, puesto que durante el tratamiento se espera que aparezcan. Esto se conseguirá aumentando la investigación y conociendo todas las posibles rutas que siguen los blastos para resistir a los efectos terapéuticos; junto con una evaluación continua del paciente a lo largo de la enfermedad.

9 Bibliografía

- (1) de Lima M, da Silva D, Freund A, Dacoregio J, Costa T, Costa I et al. Acute Myeloid Leukemia: analysis of epidemiological profile and survival rate. *Jornal de Pediatria*. 2016;92(3):283-289.
- (2) Leucemia mieloide aguda [Internet]. Lls.org. 2019. Disponible en: https://www.lls.org/sites/default/files/file_assets/sp_aml.pdf
- (3) Visser O, Trama A, Maynadié M, Stiller C, Marcos-Gragera R, De Angelis R et al. Incidence, survival and prevalence of myeloid malignancies in Europe. *European Journal of Cancer*. 2012;48(17):3257-3266.
- (4) Leucemia mieloide aguda del adulto [Internet]. Fundación Josep Carreras contra la Leucemia. 2019. Disponible en: <https://www.fcarreras.org/es/leucemiamieloideaguda> .
- (5) Cold F. What Is Acute Myeloid Leukemia? What Causes It? [Internet]. WebMD. 2019. Disponible en: <https://www.webmd.com/cancer/lymphoma/acute-myeloid-leukemia-symptoms-treatments> .
- (6) Sanches F, Nitsch T, Vilela M, Sgarbieri V. Comparison of biochemical and immunological profile of pediatric patients with acute myeloid leukemia in relation to healthy individuals. *Jornal de Pediatria*. 2015;91(5):478-484.
- (7) Ferrara F, Schiffer C. Acute myeloid leukaemia in adults. [Internet]. *The Lancet*. 2019. Disponible en: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(12\)61727-9/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(12)61727-9/fulltext)
- (8) Quimioterapia para la leucemia mieloide aguda [Internet]. Cancer.org. 2019. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/leucemia-mieloide-aguda/tratamiento/quimioterapia.html> .
- (9) Terapia dirigida para la leucemia mieloide aguda [Internet]. Cancer.org. 2019. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/leucemia-mieloide-aguda/tratamiento/terapia-dirigida.html> .
- (10) Spain V. Citarabina [Internet]. Vademecum.es. 2019. Disponible en: <https://www.vademecum.es/principios-activos-citarabina-l01bc01>
- (11) Muñoz D, Prada-Arismendy J, Castillo E. El Papel de FLT3 como Biomarcador en Leucemia Mieloide Aguda [Internet]. *Archivosdemedicina.com*. 2019. Disponible en: <http://www.archivosdemedicina.com/medicina-de-familia/el-papel-de-flt3-como-biomarcador-en-leucemia.pdf> .
- (12) Ozeki K, Kiyoi H, Hirose Y, Iwai M, Ninomiya M. Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2004;103(5):1901-1908.
- (13) Kovalenko M, Gazit A, Bohmer A, et al. Selective platelet-derived growth factor receptor kinase blockers reverse sis-transformation [Internet]. *Cancerres.aacrjournals.org*. 1994. Disponible en: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/54/23/6106.full.pdf> .
- (14) Steinbichler T, Dudás J, Skvortsov S, Ganswindt U, Riechelmann H, Skvortsova I. Therapy resistance mediated by cancer stem cells. *Seminars in Cancer Biology*. 2018;53:156-167.
- (15) Reese N, Schiller G. High-Dose Cytarabine (HD araC) in the Treatment of Leukemias: a Review. *Current Hematologic Malignancy Reports*. 2013;8(2):141-148.
- (16) Tattersall M, Ganeshguru K, Hoffbrand A. Mechanisms of Resistance of Human Acute Leukaemia Cells to Cytosine Arabinoside. *British Journal of Haematology*. 1974;27(1):39-46.
- (17) Lichtman M. A historical perspective on the development of the cytarabine (7days) and daunorubicin (3days) treatment regimen for acute myelogenous leukemia: 2013 the 40th anniversary of 7+3. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2013;50(2):119-130.

- (18) Wiernik P, Banks P, Case Jr D, Arlin Z, Periman P, et al. Cytarabine Plus Idarubicin or Daunorubicin as Induction and Consolidation Therapy for Previously Untreated Adult Patients With Acute Myeloid Leukemia. *Blood Journal*. 2019;1992(79):313-319.
- (19) Ferguson L, Hill C, Morecombe P. Induction of resistance to 6-thioguanine and cytarabine by a range of anticancer drugs in Chinese hamster AA8 cells. *European Journal of Cancer*. 1992;28(4-5):736-742.
- (20) Robert de Saint Vincent B, Buttin G. Studies on 1-fl-D-arabinofuranosyl cytosine-resistant mutants of Chinese hamster fibroblasts: III. Joint resistance to arabinofuranosyl cytosine and to excess thymidine? A semidominant manifestation of deoxycytidine triphosphate pool expansion. *Somatic Cell Genetics*. 1979;5(1):67-82.
- (21) FLT3 - Receptor-type tyrosine-protein kinase FLT3 precursor - Homo sapiens (Human) - FLT3 gene & protein [Internet]. Uniprot.org. 2019. Disponible en: <https://www.uniprot.org/uniprot/P36888> .
- (22) Yamamoto Y. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*. 2001;97(8):2434-2439.
- (23) Ghiaur G, Levis M. Mechanisms of Resistance to FLT3 Inhibitors and the Role of the Bone Marrow Microenvironment. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2017;31(4):681-692.
- (24) Hassanein M, Almahayni M, Ahmed S, Gaballa S, El Fakih R. FLT3 Inhibitors for Treating Acute Myeloid Leukemia. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. 2016;16(10):543-549.
- (25) Daver N, Schlenk R, Russell N, Levis M. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia*. 2019;33(2):299-312.
- (26) Port M, Böttcher M, Thol F, Ganser A, Schlenk R, Wasem J et al. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication, nucleophosmin 1, and CEBPA gene mutations for acute myeloid leukemia patients with normal karyotype and younger than 60 years: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Hematology*. 2014;93(8):1279-1286.
- (27) Gilliland D, Griffin J. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*. 2002;100(5):1532-1542.
- (28) Badar T, Kantarjian H, Nogueras-Gonzalez G, Borthakur G, Garcia Manero G, Andreeff M et al. Improvement in clinical outcome of FLT3ITD mutated acute myeloid leukemia patients over the last one and a half decade. *American Journal of Hematology*. 2015;90(11):1065-1070.
- (29) Smith B, Levis M. Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2004;103(10):3669-3676.