

# VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**Facultat de Medicina i Odontologia**

Departament de Medicina

Programa de Medicina



ESTUDIO DEL GEN *IKZF1* Y DE MICRODELECCIONES  
INTRAGÉNICAS EN LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:

**Inés Gómez Seguí**

Dirigida por:

**Prof. Miguel A. Sanz Alonso**

**Dra. Esperanza Such Taboada**

Valencia, 2015



**MIGUEL A. SANZ ALONSO**, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Valencia, y

**ESPERANZA SUCH TABOADA**, Doctora en Biología por la Universidad de Valencia,

**CERTIFICAN:**

Que la tesis doctoral titulada: "ESTUDIO DEL GEN *IKZF1* Y DE MICRODELECCIONES INTRAGÉNICAS EN LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA", ha sido realizada bajo nuestra dirección por **Inés Gómez Seguí**, Licenciada en Medicina y Cirugía, y reúne a mi juicio condiciones suficientes para su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente para optar al grado de **Doctor**.

Fdo.: Prof. Miguel A. Sanz Alonso

Fdo.: Dr. Esperanza Such Taboada

*Valencia, 27 de octubre 2015*



## **AGRADECIMIENTOS**



Gracias Miguel, por darme la oportunidad de trabajar y crecer en tu equipo.

Gracias Esperanza, por tu intensa implicación conmigo y tu amistad.

Gracias Jose, por tu experiencia, entusiasmo y tutela  
todos estos años.

Gracias compañeras y compañeros de laboratorio por tantos buenos ratos  
juntos.

Gracias a todos los colaboradores de este proyecto, por vuestros esfuerzos  
para hacer posible esta tesis doctoral.

Gracias a cada uno de los miembros del Servicio de Hematología de la Fe, por  
enseñarme la profesionalidad en el trabajo y hacer tan agradable el "día a día".

Gracias papá, gracias mamá, gracias familia, por vuestra enorme ayuda y  
cariño incondicional.

Gracias Peti y gracias niños, por hacerme feliz.



## ÍNDICE



|  |           |
|--|-----------|
| <b>ÍNDICE</b> .....  | <b>I</b>  |
| <b>GLOSARIO DE ABREVIATURAS</b> .....  | <b>V</b>  |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....   | <b>1</b>  |
| 1.1. CONCEPTO DE LLA .....   | 3         |
| 1.1.1. Epidemiología .....   | 3         |
| 1.1.2. Etiología .....   | 3         |
| 1.1.3. Características clínicas .....  | 5         |
| 1.1.4. Alteraciones citogenéticas recurrentes.....                             | 6         |
| 1.2. CLASIFICACIÓN DE LA LLA.....  | 10        |
| 1.2.1. Clasificación FAB .....   | 10        |
| 1.2.2. Clasificación inmunológica .....  | 11        |
| 1.2.3. Clasificación de la OMS .....   | 12        |
| 1.2.4. Clasificaciones de riesgo citogenético.....                             | 15        |
| 1.3. NUEVAS ALTERACIONES MOLECULARES.....                                      | 19        |
| 1.3.1. Microdeleciones intragénicas .....                                      | 21        |
| 1.3.2. Ikaros Zinc Finger 1 (IKZF1) .....                                      | 24        |
| <b>2. HIPÓTESIS</b> .....  | <b>31</b> |
| <b>3. OBJETIVOS</b> .....  | <b>35</b> |
| <b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....   | <b>39</b> |
| 4.1. PACIENTES .....   | 41        |
| 4.2. ESTUDIO CITOGENÉTICO .....  | 42        |
| 4.2.1. Citogenética convencional .....   | 42        |
| 4.2.2. FISH.....   | 43        |
| 4.3. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES MOLECULARES .....                             | 43        |
| 4.3.1. Estudio de reordenamientos clásicos.....                                | 44        |
| 4.3.2. Estudio de la expresión cualitativa de las isoformas del gen IKZF1..... | 45        |
| 4.3.3. Estudio de microdeleciones intragénicas mediante MLPA.....              | 45        |
| 4.3.4. Estudio de mutaciones en IKZF1 .....                                    | 49        |
| 4.4. ESQUEMAS DE TRATAMIENTO .....   | 54        |
| 4.4.1. Tratamiento de pacientes pediátricos.....                               | 54        |
| 4.4.2. Tratamiento de pacientes adultos .....                                  | 58        |
| 4.5. DEFINICIONES .....  | 62        |
| 4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....  | 63        |
| <b>5. RESULTADOS</b> .....   | <b>65</b> |
| 5.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA SERIE .....                               | 67        |

|             |   |            |
|-------------|---|------------|
| 5.1.1.      | <i>Características demográficas y clínicas</i>  | 67         |
| 5.1.2.      | <i>Inmunofenotipo</i>   | 70         |
| 5.1.3.      | <i>Respuesta al tratamiento y supervivencia</i>   | 71         |
| 5.1.4.      | <i>Pacientes con estudio genético</i>   | 75         |
| <b>5.2.</b> | <b>ALTERACIONES CITOGENÉTICAS</b>   | <b>76</b>  |
| 5.2.1.      | <i>Alteraciones estructurales</i>   | 78         |
| 5.2.2.      | <i>Alteraciones numéricas</i>   | 81         |
| 5.2.3.      | <i>Concurrencia de alteraciones</i>   | 83         |
| 5.2.4.      | <i>Asociación de cada uno de los hallazgos citogenéticos con las características clínico-biológicas</i> | 84         |
| 5.2.5.      | <i>Grupos de riesgo citogenético</i>  | 87         |
| <b>5.3.</b> | <b>ALTERACIONES EN <i>IKZF1</i></b>   | <b>90</b>  |
| 5.3.1.      | <i>Patrón de isoformas</i>  | 90         |
| 5.3.2.      | <i>Deleciones intragénicas</i>  | 93         |
| 5.3.3.      | <i>Mutaciones exónicas</i>  | 96         |
| 5.3.4.      | <i>Correlación de las diferentes alteraciones en <i>IKZF1</i></i>                                       | 98         |
| 5.3.5.      | <i>Asociación con las características clínico-biológicas y el pronóstico</i>                            | 99         |
| <b>5.4.</b> | <b>DELECCIONES INTRAGÉNICAS EN OTROS GENES IMPLICADOS EN LA LLA</b>                                     | <b>106</b> |
| 5.4.1.      | <i>Frecuencia de deleciones intragénicas</i>  | 106        |
| 5.4.2.      | <i>Patrón de concurrencias</i>  | 109        |
| 5.4.3.      | <i>Asociación con variables demográficas y clínicas</i>   | 111        |
| 5.4.4.      | <i>Asociación con la citogenética</i>   | 112        |
| 5.4.5.      | <i>Asociación con el pronóstico</i>   | 114        |
| <b>5.5.</b> | <b>ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE LOS FACTORES PRONÓSTICO</b>  | <b>118</b> |
| 5.5.1.      | <i>Pacientes pediátricos</i>  | 118        |
| 5.5.2.      | <i>Pacientes adultos</i>  | 120        |
| <b>6.</b>   | <b>DISCUSIÓN</b>  | <b>123</b> |
| 6.1.        | <b>LIMITACIONES DEL ESTUDIO</b>   | <b>125</b> |
| 6.2.        | <b>HALLAZGOS EN EL ESTUDIO CITOGENÉTICO</b>   | <b>127</b> |
| 6.3.        | <b>ALTERACIONES DE <i>IKZF1</i></b>   | <b>132</b> |
| 6.4.        | <b>MICRODELECCIONES INTRAGÉNICAS</b>  | <b>137</b> |
| 6.5.        | <b>VALOR PRONÓSTICO DE LAS ALTERACIONES ESTUDIADAS</b>  | <b>140</b> |
| <b>7.</b>   | <b>CONCLUSIONES</b>   | <b>143</b> |
| <b>8.</b>   | <b>BIBLIOGRAFÍA</b>   | <b>147</b> |
| <b>9.</b>   | <b>TABLAS SUPLEMENTARIAS</b>  | <b>169</b> |

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- ADN** = Ácido desoxirribonucleico  
**ARN** = Ácido ribonucleico  
**CIR** = *Cumulative Incidence of Relapse*  
**EMR** = Enfermedad Mínima Residual  
**FAB** = Franco-Americano-Británica  
**FISH** = *Fluorescence in situ Hybridization*  
**ISCN** = Sistema Internacional de Nomenclatura Cromosómica  
**pb** = Pares de bases  
**LLA** = Leucemia Linfoblástica Aguda  
**LLA-Ph<sup>+</sup>** = Leucemia Linfoblástica Aguda con cromosoma Philadelphia  
**LLA-Ph<sup>-</sup>** = Leucemia Linfoblástica Aguda Philadelphia negativa  
**LMC** = Leucemia Mieloide Crónica  
**MO** = Médula Ósea  
**MRC** = Medical Research Council  
**NGS** = Next-generation Sequencing  
**OMS** = Organización Mundial de la Salud  
**PCR** = Polymerase Chain Reaction  
**QT** = Quimioterapia  
**RC** = Remisión completa  
**SLR** = Supervivencia Libre de Recaída  
**SG** = Supervivencia Global  
**SP** = Sangre Periférica  
**TPH** = Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos



## **1. INTRODUCCIÓN**



## 1.1. Concepto de LLA

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una neoplasia caracterizada por la proliferación descontrolada de precursores linfoides o linfoblastos, que pueden ser de estirpe B o T.

El término empleado en la actual clasificación de la WHO es “leucemia/linfoma linfoblástico B o T”. El término “linfoma” se utiliza cuando el proceso queda limitado a una masa, con nula o muy escasa infiltración en sangre periférica o médula ósea. Cuando la infiltración es evidente en médula ósea, se prefiere hablar de leucemia linfoblástica.

A diferencia de la leucemia mieloide aguda, no existe consenso sobre el porcentaje de blastos requerido para establecer el diagnóstico de LLA, pero la mayoría de protocolos fijan un mínimo de 20% de infiltración medular.

### 1.1.1. Epidemiología

La incidencia mundial estimada de la LLA es de 1 a 4,75 casos por cada 100.000 personas por año. En nuestro entorno, el registro de tumores de Castellón informa en su estadística de una tasa anual ajustada a la población europea de 2,7 nuevos casos por 100.000 habitantes.

Es una enfermedad predominantemente infantil, ya que el 75% de los casos ocurre en niños menores de 6 años. El registro de tumores infantiles de la Comunidad Valenciana registra una tasa ajustada de 4,2 casos por 100.000 niños de 0 a 14 años, con predominio en el sexo masculino (5,0 para los niños y 3,3 para las niñas). En adultos, este tipo de leucemia también predomina en los jóvenes de sexo masculino (edad media entre 25 y 30 años), si bien en edades avanzadas estas diferencias entre sexos se igualan. Tan sólo un 10-15% de los pacientes superan los 50 años.

### 1.1.2. Etiología

En condiciones normales, los progenitores linfoides sufren un proceso de reordenamiento clonal en los genes que codifican las inmunoglobulinas (*IGH*) o los receptores de célula T (*TCR*), según su estirpe. Aquellas células que lo realizan

correctamente, comienzan un proceso de proliferación finamente regulado para dar lugar a linfocitos B y T con las especificidades necesarias para desarrollar un sistema inmune competente. Cuando un progenitor linfoide sufre alteraciones genéticas somáticas que conllevan una proliferación desregulada, ocurre una expansión clonal que da lugar a la LLA.

Algunas de estas alteraciones pueden ser congénitas y las personas portadoras tendrían una mayor susceptibilidad individual a desarrollar una LLA. Es el caso de determinadas enfermedades congénitas, como el síndrome de Down o el síndrome de Li-Fraumeni y de otros trastornos hereditarios del sistema inmunológico como el síndrome de Bloom, el síndrome de Wiskott-Aldrich o el síndrome ataxia-telangiectasia, que confieren un riesgo aumentado de desarrollar este tipo de leucemia. Sin embargo, se estima que estos trastornos tan sólo justifican ~ 5% de los casos (Taylor & Birch, 1996).

Un caso particular es el frecuente hallazgo descrito recientemente de mutaciones en mosaicismo en la línea germinal de *TP53* en los niños diagnosticados de LLA con hipodiploidía baja (Mühlbacher *et al*, 2014). También se han descrito mutaciones germinales no asociadas a síndromes congénitos conocidos que confieren mayor susceptibilidad individual y familiar de desarrollar una LLA. Es el caso de determinadas mutaciones en el gen *PAX5*, importante factor de transcripción linfoide B, que se encuentra frecuentemente alterado de manera adquirida en la LLA. Mutaciones en este gen han sido descritas en varios casos familiares de LLA pre-B con similares alteraciones genéticas adquiridas concomitantes (Shah *et al*, 2013).

Otras alteraciones genéticas que se han relacionado con el riesgo de desarrollar una LLA son las variantes polimórficas o polimorfismos. La mayoría de estas asociaciones son modestas, y algunas de ellas han mostrado resultados contradictorios en distintos estudios. De entre los múltiples polimorfismos descritos en los estudios de asociación genómica (*genome-wide association studies*, GWAS), cinco destacan por haber sido repetidamente validados en diversas publicaciones y confirmados en meta-análisis de genes "candidatos": *ARID5B* (10q21.2), *IKZF1* (7p12.2), *CEBPE* (14q11.2), *CDKN2A* (9p21.3) y *BMI1-PIP4K2A* (10p12.31-12.2) (Treviño *et al*, 2009; Papaemmanuil *et al*, 2009; Sherborne *et al*, 2010; Xu *et al*, 2013). Además, estos genes se encuentran frecuentemente implicados en la LLA mediante alteraciones adquiridas, lo cual apoya su papel en la predisposición a este tipo de leucemia.

La contribución a la susceptibilidad de la LLA de los polimorfismos en genes de vías de detoxificación de xenobióticos, metabolismo de los folatos, o reparación del ADN se ha estudiado intensamente en las décadas pasadas mostrando resultados inconsistentes. En una revisión reciente, los polimorfismos en los genes *CYP2E1*, *GSTM1*, *NQO1*, *NAT2*, *MDR1* y *XRCC1* se mostraron capaces de modificar el riesgo de padecer LLA, especialmente si asociaban a exposiciones ambientales como pesticidas, irradiaciones, consumo de tabaco o alcohol (Dirse *et al*, 2015).

Pese a la contribución en mayor o menor medida de estas variaciones genéticas congénitas, la gran mayoría de las alteraciones genéticas halladas en la LLA son adquiridas a lo largo de la vida y se detallan en el apartado 1.1.4 de esta tesis. Las razones por las cuales éstas ocurren son casi siempre desconocidas, si bien algunos agentes medioambientales son conocidos leucemógenos, como las radiaciones ionizantes, la exposición a solventes y pesticidas, algunas drogas quimioterápicas o las infecciones por determinados virus.

Con todo ello, podríamos concluir que la LLA se origina de una interacción entre la susceptibilidad genética heredada y la exposición medioambiental a diferentes agentes infecciosos, tóxicos, alimentarios, que conllevarían la adquisición de nuevas alteraciones genéticas en genes involucrados en la proliferación y diferenciación de los linfocitos. Cabe destacar el hecho de que algunas translocaciones cromosómicas han sido detectadas en neonatos mucho antes del desarrollo franco de la leucemia, en ocasiones con tiempos de latencia superiores a diez años. Por otro lado, en los raros casos de gemelos univitelinos con la misma leucemia, se ha visto que éstas comparten los mismos tipos de alteraciones genéticas.

### **1.1.3. Características clínicas**

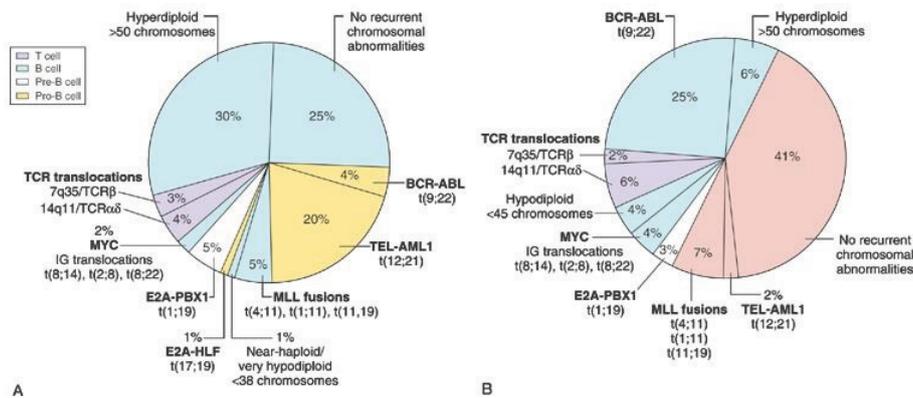
Clínicamente, el paciente con LLA suele debutar con fiebre y/o astenia y/o diátesis hemorrágica, justificada por la neutropenia, anemia y trombocitopenia secundarias al fallo medular. Los síntomas pueden preceder al diagnóstico desde unos pocos días hasta varios meses. La infiltración del torrente sanguíneo por estas células blásticas es casi la norma, aunque puede no encontrarse. Además, es frecuente la afectación extramedular, principalmente en sistema nervioso central, testículos, ganglios linfáticos, hígado y bazo, entre otros.

Clásicamente se han utilizado como factores pronóstico parámetros que hacían referencia al estado general del paciente (edad, comorbilidades) o al grado de infiltración (cifra de leucocitos, masa mediastínica, hepatoesplenomegalia). Al acercarnos más al conocimiento de esta enfermedad y al conseguir identificar estos cambios genéticos de una manera más precisa, se ha intentado asignar también valor pronóstico a las alteraciones genéticas encontradas.

#### **1.1.4. Alteraciones citogenéticas recurrentes**

Alrededor del 75% de las LLA presentan anomalías cromosómicas en el momento del diagnóstico. En la Figura 1 se muestran las principales alteraciones cromosómicas clásicas que afectan a los pacientes con LLA en el niño y en el adulto. Como se puede observar, éstas difieren en frecuencia entre los dos grupos de edad; así, por ejemplo, el cariotipo hiperdiploide es la anomalía más frecuente de la LLA infantil (30%), pero supone tan sólo un 6% de la LLA del adulto; igualmente, la t(12;21) es diez veces más frecuente en niños que en adultos; por el contrario, la t(9;22) es la alteración más frecuente en LLA del adulto (25%), pero es más bien rara en los niños (4%). Cabe destacar, que el porcentaje de pacientes en los que no se detectan alteraciones cromosómicas es muy variable y que está disminuyendo conforme aumenta la precisión en las técnicas diagnósticas y se implementa la detección molecular en un mayor número de casos (Mancini, 2005). Otras alteraciones menos frecuentes son las fusiones con *MLL* o t(11q23), ya sea t(4;11), t(1;11) o t(11;19), las translocaciones entre *MYC* e IG [t(8;14), t(2;8) o t(8;22)], las translocaciones del receptor de célula T (*RCT*) que incluyen a 7q35 y a 14q11, la t(17;19), la t(1;19), el cariotipo hipodiploide/casi triploide y otras de porcentaje inferior al 1%.

Un gran número de estas anomalías son recurrentes y se asocian con subtipos morfológicos o fenotipos específicos. En los últimos años, el extraordinario desarrollo de las técnicas citogenéticas y moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la hibridación in situ fluorescente (FISH), ha permitido la identificación precisa de muchos de estos genes implicados en la leucemogénesis. Incluso, apoyándose en estudios sobre patrones de expresión génica en LLA, se defiende la idea de que una translocación específica identifica un único subtipo de esta enfermedad (Yeoh *et al*, 2002; Ferrando *et al*, 2002). Este hecho confirma que el avance en el manejo de la LLA va ligado a una subclasificación de la misma en base a las lesiones génicas y a las rutas alteradas de la vida celular.



**Figura 1.** Alteraciones genéticas de la leucemia linfoblástica aguda: distintas frecuencias en la edad pediátrica (A) y la edad adulta (B). Los genes afectados por las translocaciones aparecen en negrita. TCR: Receptor de Célula T. Tomada de Pui et al. (Pui *et al*, 1990).

Las alteraciones moleculares presentes en las leucemias agudas suelen afectar a genes que desempeñan un papel clave en la biología de la célula, por estar implicados en el control del ciclo celular, en la diferenciación celular o en los fenómenos de apoptosis. Los principales mecanismos por los cuales se producen estas alteraciones en los genes se detallan a continuación.

*Anomalías balanceadas: translocaciones recíprocas e inversiones*

Estas alteraciones genéticas, muy frecuentes en leucemias, consisten en la transposición unidireccional o recíproca de un fragmento de un cromosoma a otro (translocación cromosómica) o dentro del mismo cromosoma (inversión). En ellas no existen pérdidas o ganancias netas de material, los puntos de rotura son específicos y, a menudo, tienen gran relevancia clínica. Estas anomalías inducen la desregulación genómica mediante dos mecanismos:

- *Activación de un gen crítico en los procesos celulares de supervivencia o ciclo celular (protooncogén).* La translocación yuxtapone secuencias promotoras procedentes de otro cromosoma al lado de dicho gen sin modificar su estructura pero induciendo su activación.
- *Generación de un gen híbrido.* En este caso dos genes diferentes se fusionan generando un gen híbrido funcionante capaz de ser transcrito a ARN y de generar una nueva proteína. Estas proteínas contienen dominios estructurales y

funcionales que difieren de las proteínas originales. Las proteínas quiméricas tienen propiedades oncogénicas porque mantienen dominios que les permiten unirse al ADN y actuar como factores de transcripción desequilibrando la actividad del ciclo celular y el proceso de diferenciación. Este es el mecanismo más frecuente implicado en las translocaciones que aparecen en la LLA: la t(12;21)(p13q22) produce la proteína de fusión TEL-AML1 (o ETV6-RUNX1), la t(4;11)(q21q23) produce MLL-AF4, la t(1;19)(q23p13) produce E2A-PBX1 y la t(9;22)(q34;q11) produce BCR-ABL.

*Anomalías no balanceadas: deleciones, isocromosomas, cromosomas en anillo.*

Se produce una pérdida neta de material genético que conduce a la eliminación de genes críticos, generalmente genes supresores tumorales (por ejemplo: *TP53*), con la consiguiente pérdida de su función. Dada la duplicidad del ADN, el alelo residual no alterado sería capaz de mantener la función normal del gen, por lo que para tener efecto leucemogénico se necesita que la pérdida de material genético sea doble o se asocie con otros mecanismos en el segundo alelo, tales como translocación, metilación o mutación puntual. Los puntos de rotura pueden variar de un paciente a otro. En la leucemia linfoblástica aguda destacan las deleciones de 9p, 6q y 12p, en las cuales se supone la presencia de genes supresores de tumores. Por ejemplo, el gen *CDKN2A* y su homólogo funcional *CDKN2B*, situados en el brazo corto del cromosoma 9, codifican proteínas que regulan negativamente el ciclo celular inhibiendo las quinasas dependientes de ciclina (CDK) 4 y 6 y evitando la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la fase de síntesis. La inactivación de *CDKN2A* y *CDKN2B* por deleción homocigota ha sido descrita en numerosos tipos de cáncer, sugiriendo su potencial papel como genes supresores de tumores (Nobori *et al*, 1994) y es también frecuente en la LLA.

*Alteraciones numéricas de los cromosomas.*

Las aneuploidías, es decir, ganancias o pérdidas de cromosomas enteros, son anomalías importantes en la LLA, tanto por su frecuencia como por su importancia pronóstica, especialmente en la infancia.

Las células de nuestro organismo poseen una dotación cromosómica diploide (2n) con 23 pares de cromosomas, exceptuando los gametos que son haploides (n). Si

hay ganancia cromosómica, hablaremos de hiperdiploidía, que puede llegar a ser triploidía ( $3n$ ) e incluso tetraploidía ( $4n$ ). Si hay pérdida cromosómica, hablaremos de hipodiploidía, que puede incluso aproximarse a un número haploide. Puede ocurrir que el número de cromosomas total en la célula resulte 46, sin equivaler a  $2n$  porque ha habido ganancias y pérdidas cromosómicas que se han equilibrado (por ejemplo una trisomía 8 junto con una monosomía 7); en este caso hablaremos de pseudodiploidía.

Dentro de las hiperdiploidías encontradas en la LLA se suele distinguir entre baja y alta hiperdiploidía, según el número de cromosomas sea inferior o superior a 50 respectivamente. La baja hiperdiploidía suele deberse a trisomías aisladas y frecuentemente aparece acompañada por otras anomalías estructurales (translocaciones, por ejemplo). Muchos de estos casos cumplen los criterios que definen el cariotipo monosómico, recientemente estudiado en la LLA (Motlló *et al.*, 2014). La alta hiperdiploidía (50-65 cromosomas) también suele asociar otras anomalías. A la hiperdiploidía, en general, se le confiere buen pronóstico, al menos en la edad pediátrica.

Recientemente se ha descrito como entidad propia la “baja hipodiploidía/casi triploidía”, ya que se cree que el mismo clon hipodiploide con 30-39 cromosomas, al sufrir endoreduplicación, se convierte en hiperdiploide cercano a la triploidía, por lo que serían dos formas de expresión de una misma enfermedad (Charrin *et al.*, 2004). Esto se ha podido demostrar analizando el patrón de ganancias y pérdidas cromosómicas, que parece ser específico, siendo los cromosomas 2, 3, 4, 7, 13, 15, 16, y 17 monosómicos en el clon hipodiploide y disómicos en el triploide, y los cromosomas que conservaban su pareja en el clon hipodiploide, siendo tetraploides en el clon hiperdiploide. Además, en el estudio de ADN mediante citometría de flujo se observan dos picos aneuploides en la mayoría de pacientes. Esta entidad se caracterizaría por tener fenotipo B, bajo recuento leucocitario al diagnóstico y un mal pronóstico. El patrón de ganancia/pérdida cromosómica es lo que puede ayudar a distinguir esta entidad de la hiperdiploidía cuando no se evidencian dos picos aneuploides en el citómetro, cuestión importante por la diferencia en cuanto a pronóstico de estos dos subtipos de LLA.

La hipodiploidía se define estrictamente como un número de cromosomas inferior a 46. Lo más frecuente es hallar 45 cromosomas, y un número inferior o igual a 44 es la definición práctica que se suele emplear. La casi haploidía es rara en la LLA. A la hipodiploidía se le suele conferir un mal pronóstico en general.

El mecanismo por el cual el desequilibrio genético creado por una aneuploidía contribuye a la leucemogénesis no ha sido todavía satisfactoriamente explicado en el ámbito molecular.

#### *Amplificación de genes*

Tales como “*double minutes*” (dm), que son regiones de ADN extracromosómicas que incluyen amplificación de oncogenes, por ejemplo, *MLL*. Otro ejemplo son las amplificaciones intracromosómicas del cromosoma 21 (iAMP21), en las que se encuentra la ganancia de al menos tres copias de amplias regiones del cromosoma 21, incluyendo el gen *RUNX1* (Harrison *et al*, 2013).

## **1.2. Clasificación de la LLA**

Se emplean principalmente tres clasificaciones según la herramienta que se utilice para realizar el diagnóstico. Así, el grupo de trabajo Franco–Americano–Británico (FAB) propuso la clasificación morfológica utilizando el microscopio y el grupo europeo para la caracterización inmunológica de las leucemias (EGIL) propuso la clasificación inmunofenotípica utilizando la citometría de flujo. Sin embargo, ha sido la OMS la que, integrando estos datos junto con los aportados por el estudio citogenético y de biología molecular, ha propuesto una clasificación separando los subtipos de LLA que suponen entidades específicas con un pronóstico característico. Esta última clasificación es la que mejor atiende al concepto de LLA como entidad heterogénea en la que se engloban diferentes enfermedades con distinta biopatología y comportamiento. A continuación se detallan estas tres clasificaciones.

### **1.2.1. Clasificación FAB**

En 1976 el grupo de trabajo Franco–Americano–Británico (FAB) propuso esta clasificación atendiendo a criterios citomorfológicos y citoquímicos (Bennett *et al*, 1976). Hoy en día está prácticamente en desuso, si bien cabe destacar que ya diferenció a la leucemia de Burkitt (LLA-L3), ya que ésta, además de características clínicas y genéticas propias, también posee una morfología típica. Brevemente, los tres grupos que distinguen son:

- LLA-L1: Los linfoblastos son pequeños, con escaso citoplasma, nucleolos no visibles o de difícil visualización y médula ósea de aspecto monomorfo. Constituye la variedad más frecuente en el niño.
- LLA-L2: La variedad L2 está constituida por blastos grandes, con abundante citoplasma y nucleolos visibles. Puede haber una doble población celular en médula ósea, coexistiendo linfoblastos pequeños del tipo L1 con los de tipo L2. Es la variante más frecuente en el adulto.
- LLA-L3: Las células se caracterizan por un citoplasma intensamente basófilo con vacuolas prominentes. Las abundantes mitosis dibujan en la biopsia de médula ósea un “patrón de cielo estrellado”. Es una variante de LLA de células B, caracterizada por la translocación t(8;14) u otras variantes menos frecuentes.

### **1.2.2. Clasificación inmunológica**

La caracterización de las leucemias por su inmunofenotipo mediante el citómetro de flujo es crucial para conocer la estirpe celular (B o T) y su estadio madurativo, ya que las células blásticas, al igual que las células linfoides normales, expresan antígenos (tanto de superficie como intracitoplasmáticos) que van variando según el estadio madurativo en el que se encuentren. Las células blásticas de la LLA suelen asemejarse mucho a su correspondiente célula no patológica, expresando, el momento en el que se ha producido el bloqueo madurativo. Sin embargo, el inmunofenotipo de las células de una LLA tiene generalmente alguna característica inesperada para el estadio de maduración que expresa, lo cual permite distinguirla de la población normal.

Para la caracterización del inmunofenotipo B o T en la LLA, los mejores antígenos en cuanto a sensibilidad y especificidad son el CD19 y el CD3 citoplasmático, respectivamente (McKenna, 2001). Las células linfoides B inmaduras se pueden distinguir de las maduras por la expresión de CD34 y TdT, así como ausencia de CD20 y de inmunoglobulinas de superficie. Las células linfoides T inmaduras se reconocen por la expresión de CD3, TdT o CD1a, así como ausencia de CD3 en superficie (Craig & Foon, 2008).

En 1995, el Grupo Europeo para la caracterización Inmunológica de las Leucemias (EGIL) definió cuatro subgrupos para la LLA-B y cuatro para la LLA-T según la expresión de unos pocos antígenos y es, aún hoy, la clasificación

inmunológica que se sigue utilizando (Bene *et al*, 1995). Estos subgrupos se resumen a continuación en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Clasificación inmunológica de la LLA según el EGIL.

| LLA-B      |     |      |      |      |     |     |     |     |
|------------|-----|------|------|------|-----|-----|-----|-----|
|            | TdT | CD10 | CD19 | CD20 | Igμ |     |     |     |
| Pro-B      | +   | -    | +    | -    | -   |     |     |     |
| B Común    | +   | +    | +    | -    | -   |     |     |     |
| Pre-B      | +/- | +/-  | +    | +/-  | +c  |     |     |     |
| B madura   | -   | -    | +    | +    | +s  |     |     |     |
| LLA-T      |     |      |      |      |     |     |     |     |
|            | TdT | CD1a | CD2  | CD3  | CD4 | CD8 | CD5 | CD7 |
| Pro-T      | +   | -    | -    | +c   | -   | -   | -   | +   |
| Pre-T      | +   | -    | +/-  | +c   | -   | +/- | +/- | +   |
| T Cortical | +/- | +    | +/-  | +c/s | +   | +   | +/- | +   |
| T Madura   | +/- | -    | +    | +s   | +   | +   | +   | +   |

Igμ: cadena mu de las inmunoglobulinas, c: citoplasmática, s: superficie.

### 1.2.3. Clasificación de la OMS

La Organización Mundial de la Salud (OMS) editó en 2008 una nueva clasificación para las neoplasias hematológicas en la que dedica el capítulo 9 a estas neoplasias que agrupa, como se ha dicho anteriormente, bajo el término leucemias/linfomas linfoblásticos (Swerdlow *et al*, 2008). Estas neoplasias estarían caracterizadas por la proliferación de células inmaduras de estirpe linfóide con similares características clínicas y rasgos morfológicos, pero se pueden diferenciar entidades con características propias. Esta clasificación es la única que integra una aproximación multidisciplinar de la leucemia, utilizando la morfología, la citometría, la citogenética y la biología molecular para caracterizar a cada subtipo.

Las distintas categorías se detallan a continuación y están recogidas en la Tabla 2:

- Leucemia/Linfoma linfoblástico con anomalías genéticas recurrentes:
  - a) *LLA-B con t(9;22)(q34;q11.2);BCR-ABL1*: es una neoplasia de linfoblastos B que suele tener inmunofenotipo de LLA-B común (positividad para el TdT, CD10 y CD19). Frecuentemente asocia la expresión de antígenos mieloides (CD33 y CD13). Además de la t(9;22) (también llamado cromosoma Philadelphia) que produce el gen

de fusión BCR-ABL1, pueden haber otras anomalías asociadas, aunque el mal pronóstico de este subgrupo parece atribuido a la t(9;22) propiamente.

b) *LLA-B con t(v;11q23);reordenamiento MLL*: muestra inmunofenotipo pro-B frecuentemente. Puede haber una subpoblación de monoblastos acompañando a los blastos linfoides. Este gen se puede fusionar con distintos genes, aunque el más frecuente es *AF4* en el cromosoma 4q21. Otras posibilidades son *ENL* en el cromosoma 19p13 (frecuente en LLA-T) y *AF9* en el cromosoma 9p22 (asociado también a leucemia mieloide). Aquellos pacientes con deleciones de 11q23 sin reordenamientos no se incluyen en este grupo.

c) *LLA-B con t(12;21)(p13;q22);TEL-AML1(ETV6-RUNX1)*: en esta entidad, los blastos tienen fenotipo pre-B o común y suelen expresar además CD34 y antígenos mieloides, especialmente CD13. Relacionada con pronóstico favorable en la infancia, especialmente si se asocia a otros factores de buen pronóstico.

d) *LLA-B con hiperdiploidía*: neoplasia linfoide de línea B en cuyos blastos se encuentran más de 50 cromosomas, y generalmente menos de 66, típicamente sin asociar otras alteraciones estructurales. Existe cierta controversia sobre si esta entidad y su pronóstico viene definida por qué cromosomas se han adquirido más que por el número de cromosomas ganados en total, de manera que aquellos con trisomía 4, 10 y 17 tendrían el mejor pronóstico.

e) *LLA-B con hipodiploidía*: sus blastos poseen menos de 45 cromosomas, hasta incluso cariotipos cercanos a la haploidía (23-29 cromosomas). El clon leucémico puede sufrir endorreduplicación, duplicando los cromosomas y resultando en un cariotipo casi diploide o hiperdiploide. En estos casos, el índice de ADN hallado por citometría y la FISH pueden ser de utilidad. Los cariotipos cercanos a la haploidía podrían tener peor pronóstico, aunque aún hay cierta controversia en este punto.

f) *LLA-B con t(5;14)(q31;q32);IL3-IGH*: subtipo muy poco frecuente, tanto en niños como en adultos, que asocia una eosinofilia importante como población reactiva. Este dato debe hacernos sospechar esta enfermedad incluso ante la ausencia de blastos en sangre periférica. Sus blastos son también de LLA-B común y la translocación conlleva una sobreexpresión de IL3, causante de la eosinofilia.

g) *LLA-B con t(1;19)(q23;p13.3);E2A-PBX1(TCF3-PBX1)*: esta entidad tiene fenotipo pre-B y característicamente expresan CD9 de manera intensa, así como ausencia o muy poca expresión de CD34. Relativamente frecuente en niños. El gen de fusión reside en el cromosoma 19, y el cromosoma derivativo 1 se puede perder en algunos casos, resultando en una translocación no balanceada. Aunque se le confería

un pronóstico adverso, parece haber sido superado con los nuevos tratamientos más agresivos.

– Leucemia/Linfoma linfoblástico B no especificado de otro modo: en esta categoría se incluyen todas las LLA que no demuestren alguna de las anomalías genéticas anteriormente especificadas. Prácticamente todas las LLA-B tienen reordenamientos clonales de las regiones DJ del gen *IGH*, pero además también pueden tener reordenamientos del receptor de células T (*RCT*). Otras anomalías genéticas que se pueden encontrar son: del(9p), del(6q), del(12p), t(17;19)(E2A-HLF) y amplificación intracromosómica de *RUNX1* (*iAMP21*), entre otras.

– Leucemia/Linfoma linfoblástico T: estas neoplasias son más frecuentes en la adolescencia y en el sexo masculino. Típicamente debutan con gran hiperleucocitosis y, a menudo, con grandes masas mediastínicas o en otra localización. En cuanto al inmunofenotipo, se puede observar coexpresión de antígenos mieloides como CD13 y CD33 hasta en un tercio de los casos, y menos frecuentemente CD79a (antígeno de línea B). Prácticamente siempre se demuestran reordenamientos en el receptor de célula T (*RCT*), y, al igual que en la LLA-B, pueden encontrarse simultáneamente reordenamientos del gen *IGH*. Las anomalías citogenéticas más frecuentes son las que involucran a 14q11.2 (*RCT* alpha/delta), 7q35 (*RCT* beta) y 7p14-15 (*RCT* gamma), con multitud de genes coparticipantes en la translocación como por ejemplo *HOX11* (*TLX1*) en el locus 10q24, *HOX11L2* (*TLX3*) en el locus 5q35, *MYC* en el locus 8q24.1 y *TAL1* en el locus 1p32, entre otros. Además de translocaciones también se pueden hallar deleciones, siendo la más importante del(9p), que provoca la pérdida del gen supresor de tumores *CDKN2A*. Su pronóstico es muy variable: parece tener mejor pronóstico que la LLA-B en el adulto y peor en el niño, si bien estos resultados se correlacionan probablemente con otros factores pronósticos asociados a este tipo de leucemia.

– Leucemia de Burkitt: dentro de las neoplasias de célula B maduras (o linfomas B) e incluido en el capítulo del linfoma de Burkitt, la OMS recoge en un apartado la variante leucemia de Burkitt o leucemia linfocítica aguda-L3 según la clasificación FAB. Se recoge en este apartado porque la concibe como una fase leucémica en el contexto del linfoma Burkitt, con grandes masas linfomatosas, y que, en aisladas ocasiones, puede debutar con enfermedad en médula y sangre periférica exclusivamente. Suele tener afectación del sistema nervioso central al diagnóstico y su gran quimiosensibilidad hace que se produzca frecuentemente síndrome de lisis tumoral con el inicio de la terapia. Morfológicamente se caracteriza por células de mediano tamaño con citoplasma intensamente basófilo que contiene vacuolas lipídicas

abundantes. Prácticamente todos los casos muestran una translocación del gen *MYC* situado en el cromosoma 8q24 con los genes de las cadenas de inmunoglobulinas, ya sea en 14q32 (el más frecuente), 22q11 o 2p12.

**Tabla 2.** Clasificación de la OMS de 2008 para las neoplasias de precursores linfoides con las principales características de los subtipos con anomalías genéticas recurrentes.

| <b>NEOPLASIAS DE PRECURSORES LINFOIDES</b>                           |           |               |               |                   |
|--|-----------|---------------|---------------|-------------------|
| Leucemia/Linfoma linfoblástico B no especificado de otro modo        |           |               |               |                   |
| Leucemia/Linfoma linfoblástico B con anomalías genéticas recurrentes |           |               |               |                   |
|  |           | <b>IF</b>     | <b>Edad</b>   | <b>Pronóstico</b> |
| t(9;22)(q34;q11.2)   | BCR-ABL   | B común       | adulto        | adverso           |
| t(v;11q23)   | MLL-      | pro-B         | <1 año/adulto | adverso           |
| t(12;21)(p13;q22)  | TEL-AML1  | pre-B/B-común | niño          | favorable         |
| Hiperdiploidía   | 50-65 cr. | B común       | niño          | favorable         |
| Hipodiploidía  | <45 cr.   | -             | -             | adverso           |
| t(5;14)(q31;q32)   | IL3-IGH   | B común       | -             | -                 |
| t(1;19)(q23;q13.3)   | E2A-PBX1  | pre-B         | niño          | adverso           |
| Leucemia/Linfoma Linfoblástico T                                     |           |               |               |                   |
| <b>LEUCEMIA DE BURKITT</b>   |           |               |               |                   |
| t(8;14)(q24;q32)   | c-MYC-IGH | B maduro      | -             | adverso           |

IF: inmunofenotipo; cr.: cromosomas.

#### 1.2.4. Clasificaciones de riesgo citogenético

En la LLA del niño, estas anomalías genéticas y moleculares son uno de los mejores predictores de respuesta a la terapia actual y su valor ha quedado establecido desde hace casi dos décadas (Pui *et al*, 1998). Hoy en día resulta obligatoria la realización de marcadores moleculares en cada nuevo caso tales como la ploidía de las células blásticas, reordenamientos del gen *MLL* y expresión de proteínas de fusión *MLL-AF4*, *ETV6-RUNX1*, *E2A-PBX1* y *BCR-ABL*, que se corresponden con las translocaciones t(4;11), t(12;21), t(1;19) y t(9;22) respectivamente (Pui *et al*, 2011). La utilización de la citometría de flujo para el análisis de las aneuploidías y de otras técnicas como la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) han agilizado mucho la realización de estos análisis, a la vez que han ampliado el número de resultados válidos al obtener información en casos donde no se obtienen metafases para el análisis del cariotipo o éstas no son valorables.

En el caso de la LLA del adulto, la menor incidencia con respecto a la edad pediátrica, sumado a la diversidad de hallazgos al estudiar su citogenética y biología molecular, complican el establecimiento de grupos de riesgo con terapia adaptada.

Además, exceptuando el cromosoma Philadelphia, que viene a representar el 25% de los casos, el resto de anomalías recurrentes representan cada una un porcentaje muy pequeño del total. No obstante, el valor pronóstico de las alteraciones citogenéticas en la LLA del adulto está demostrado y debe incluirse en el algoritmo de tratamiento (Pullarkat *et al*, 2007; Secker-Walker *et al*, 1997; Wetzler *et al*, 1999).

**Tabla 3.** Frecuencia de cada alteración citogenética en las seis series de LLA más importantes. Se indica en la segunda fila el número de pacientes válido con estudio citogenético realizado. En algunos grupos, ciertos casos se clasificaron en dos grupos a la vez; por ejemplo: cariotipo hiperdiploide con t(9;22).

| Grupo            | GFCH    | CALGB   | PETHEMA | GIMEMA   | MRC/ECOG | SWOG    |
|------------------|---------|---------|---------|----------|----------|---------|
| n (%)            | 378     | 284     | 86      | 366      | 1003     | 130     |
| t(9;22)          | 127(29) | 67 (29) | 30 (35) | 102 (28) | 209 (21) | 36 (26) |
| t(8;14)          | 21 (5)  | 12 (4)  |         |          | 16 (2)   |         |
| t(4;11)          | 16 (4)  | 17 (7)  | 2 (2)   | 24 (7)   | 54 (6)   | 5 (4)   |
| 11q23            | 33 (7)  |         | 2 (2)   |          | 15 (2)   |         |
| t(1;19)          | 11 (3)  |         |         | 7 (2)    | 24 (2)   |         |
| del (9p)         | 67 (15) | 28 (12) |         | 30 (8)   | 95 (10)  | 8 (6)   |
| del (6q)         | 27 (6)  | 7 (3)   | 4 (5)   | 14(4)    | 61 (6)   | 12 (9)  |
| Monosomía 7      |         | 14 (6)  | 3 (4)   |          | 62 (6)   | 4 (3)   |
| Trisomía 8       |         | 23(10)  | 0       |          | 85 (9)   | 9 (6)   |
| Miscelánea       |         |         | 7 (8)   | 41(11)   |          | 34 (24) |
| C. complejo      |         |         |         |          | 41 (4)   |         |
| C.Normal         | 66(15)  | 79 (31) | 26 (30) | 86 (23)  | 207 (25) | 31 (22) |
| Hiperdiploide    |         |         |         |          |          |         |
| 47-50 cr.        | 66(15)  |         |         |          |          |         |
| > 50 cr.         | 30 (7)  | 5 (2)   | 5 (6)   | 25 (7)   | 106 (10) |         |
| Casi triploide   | 13 (3)  |         |         |          | 19 (2)   |         |
| Casi tetraploide | 9 (2)   |         |         |          | 17 (2)   |         |
| Pseudodiploide   |         |         |         | 37 (10)  |          |         |
| Hipodiploide     |         |         |         |          |          |         |
| 40-45 cr.        | 30 (7)  |         | 7(8)    |          |          |         |
| 30-39 cr.        | 7 (1)   |         |         |          | 6 (0,5)  |         |
| Casi haploide    | 0       |         |         |          |          |         |

GFCH: grupo francés de citogenética hematológica; CALGB: grupo americano "Cancer And Leukemia Group B"; PETHEMA: Programa para el Estudio y Tratamiento de las Hemopatías Malignas; GIMEMA: Grupo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto; MRC/ECOG: Medical Research Council en colaboración con el grupo americano Eastern Cooperative Oncology Group; SWOG: grupo americano Southwest Oncology Group; C.: cariotipo; cr.: cromosomas.

Otros condicionantes que complican aún más estos estudios son las conocidas dificultades técnicas asociadas al estudio cromosómico en la LLA, que a menudo

ocasionan la obtención de escasas metafases de pobre calidad morfológica, así como la coexistencia de más de una alteración en un gran número de casos, lo que confunde el valor pronóstico de una sola anomalía.

La mayoría de los estudios publicados en el pasado se centraban en la presencia o no de la t(9;22)/BCR-ABL o reunían escaso número de pacientes como para asignar valor pronóstico a las alteraciones cromosómicas menos frecuentes.

Varios grupos cooperativos han publicado sus series y la mayoría de ellas reúnen a un gran número de pacientes (Charrinet et al, 2004; Mancini et al, 2005; Ribera et al, 2002; Moorman et al, 2007; Pullarkat et al, 2007; Wetleret al, 1999). Sin embargo, sus casos proceden de ensayos clínicos que han seleccionado a pacientes, excluyendo todas ellas a los mayores de 65 años y con regular o mal estado general. La frecuencia de las alteraciones en cada estudio se detalla en la Tabla 3.

El valor pronóstico de cada alteración es controvertido entre las distintas series, siendo una misma alteración de buen pronóstico en unas y de mal pronóstico en otras (Tabla 4). Ni siquiera la clasificación propuesta por el MRC/ECOG, que es la serie de adultos más amplia publicada, se reprodujo en la serie de pacientes del SWOG publicada el mismo año.

**Tabla 4.** Valor pronóstico de cada alteración citogenética en las seis series de LLA del adulto más importantes. "n" indica el número de pacientes válido con estudio citogenético realizado.

| Año pub.          | GFCH<br>2004                                | CALGB<br>1999                  | PETHEMA<br>2002              | GIMEMA<br>2005                | MRC/ECOG<br>2007                               | SWOG<br>2007      |
|-------------------|---|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--|-------------------|
| n                 | 378   | 284                            | 86                           | 325                           | 1003   | 130               |
| Protocolo         | -   | 8461/8881                      | LAL-93                       | 0496                          | 2993   | 9400              |
| Riesgo estándar   | Hiperdip.<br>Tetrap.<br>t(10;14)            | resto                          | CN                           | CN<br>del(9p)                 | Hiperdip.<br>del(9p)                           | CN<br>resto       |
| Riesgo intermedio | resto                                       | CN                             | resto                        | del(6q)<br>Hiperdip.<br>resto | CN<br>resto                                    | 11q23<br>-7<br>+8 |
| Alto riesgo       | Hipo/trip.<br>t(9;22)<br>t(4;11)<br>t(1;19) | t(9;22)<br>t(4;11)<br>-7<br>+8 | t(9;22)<br>11q23<br>-7<br>+8 | t(9;22)<br>t(4;11)<br>t(1;19) | Hipo/trip.<br>t(9;22) t(4;11)<br>t(8;14)<br>CC | t(9;22)           |

CN: cariotipo normal; CC: cariotipo complejo; -7: monosomía 7; +8: trisomía 8; Hiperdip.: Hiperdiploidía; Tetrap.: tetraploidía; Hipo/trip.: baja hipodiploidía/casi triploidía; resto: miscelánea de alteraciones no reflejadas en los grupos anteriores.

Como se puede observar, tan sólo la t(9;22) permanece constantemente en el grupo de alto riesgo. Al resto de alteraciones se les confiere distinto pronóstico según las series, probablemente por las diferencias en los tratamientos aplicados. En las series de GIMEMA y SWOG los grupos de riesgo intermedio y favorable tuvieron diferencias muy sutiles en la supervivencia, igualándose las curvas en los seguimientos prolongados.

Un estudio poblacional más reciente publicado por investigadores de Reino Unido en pacientes no incluidos en ensayos clínicos reveló que la edad y la citogenética son factores pronósticos en la LLA, confirmando como alteraciones de alto riesgo a la t(9;22), la t(4;11), la hipodiploidía/casi triploidía y el cariotipo complejo, definido por la presencia de cinco o más alteraciones en ausencia de las translocaciones recurrentes (Moorman *et al*, 2009). En este sentido, nosotros también hemos comprobado el valor pronóstico de la citogenética en la LLA sin la t(9;22) en una serie no seleccionada de pacientes, encontrando que la t(4;11), la hipodiploidía y la hiperdiploidía baja diferenciaron a un grupo con peor SG y SLR que los pacientes con cariotipo normal u otras alteraciones clonales (Gómez-Seguí *et al*, 2011). El grupo español PETHEMA ha mostrado sin embargo, resultados contrarios en el cariotipo complejo y monosómico (Motlló *et al*, 2014). El cariotipo monosómico ha sido ampliamente estudiado en la LMA pero no en la LLA. Se define como aquel cariotipo con dos monosomías en cromosomas autosómicos o una monosomía junto con alteraciones estructurales.

Además, en los últimos años, la adaptación de los tratamientos aplicados a la LLA con t(9;22)/BCR-ABL con inhibidores de tirosín-cinasas y la realización de un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos en primera remisión completa, ha mejorado notablemente el pronóstico de esta entidad (Brissot *et al*, 2014).

Con este preámbulo, queda clara la necesidad de encontrar nuevos marcadores moleculares de valor pronóstico válido en los pacientes que reciben los tratamientos actuales, tanto en los pacientes pediátricos, para detectar aquellos que recaerán pese a alteraciones citogenéticas favorables, como en adultos, especialmente aquellos con ausencia de t(9;22)/BCR-ABL.

### 1.3. Nuevas alteraciones moleculares

Son muchos los avances que se han producido en el conocimiento de la LLA en la última década. La gran mayoría han sido gracias a la incorporación de nuevas tecnologías de alto rendimiento en el estudio del genoma leucémico, fundamentalmente los microarrays de SNPs, los de expresión y la secuenciación masiva en sus distintas modalidades. En concreto, la aplicación de los microarrays de SNPs o arrays de genotipado al estudio de la LLA ha llevado a la descripción de evento frecuente en esta patología: las microdeleciones intragénicas. Por ser motivo de estudio de este trabajo de tesis doctoral, se detallarán en el apartado 1.3.1 de manera más extensa. El resto de alteraciones relevantes descubiertas recientemente se detallan a continuación.

#### *LLA Ph-like*

Los perfiles de expresión génica realizados mediante microarrays de expresión mostraron el agrupamiento jerarquizado (*hierarchical clustering*) de diversos grupos de pacientes con LLA que tenían similares genes y rutas celulares activadas o infraexpresadas. Algunos de estos grupos se relacionan con alteraciones citogenéticas recurrentes (como los reordenamientos de *MLL* o la t(1;19)/TCF3-PBX1), pero en otros no se han encontrado las lesiones que los definen (Harvey *et al*, 2010). Especial relevancia ha tenido un subgrupo con perfil de expresión similar al de los pacientes con LLA-Ph+ pero sin el reordenamiento BCR-ABL (Mullighan *et al*, 2009; Boer *et al*, 2009). Se da en un 10-15% de los niños con LLA de riesgo estándar y alto riesgo y en más del 25% de los pacientes adultos. En estos pacientes se ha demostrado activación tirosín-cinasa mediante otras lesiones, como sobreexpresión de *CRLF2*, mutaciones de *JAK1*, *JAK2* o reordenamientos de *ABL* (Roberts *et al*, 2014). Muy frecuentemente asocian alteraciones de *IKZF1* (80%) y también se les asigna un pronóstico desfavorable (Boer *et al*, 2015a).

#### *Sobreexpresión del gen CRLF2*

La desregulación del factor similar al receptor de citocina 2 (*cytokine receptor-like factor 2*) o *CRLF2* ocurre fundamentalmente por dos mecanismos: reordenamientos de este gen con *IGH* o deleciones intersticiales en la región pseudoautosómica PAR1 de los cromosomas sexuales que provocan la fusión del gen

con *P2RY8* (Russell *et al*, 2009). Esta alteración ocurre en prácticamente la mitad de las LLA-Ph-like, pero también en un 10% del resto y > 50% de las LLA con Síndrome de Down. Se caracterizan por la activación de la vía JAK-STAT y por su asociación a un pronóstico desfavorable (Jia *et al*, 2015).

#### *Delección intragénica de ERG*

Un pequeño grupo de leucemias (5% de las LLA pediátricas) presentan deleciones focales intragénicas de *ERG*, un factor de transcripción de la familia ETS y asocia frecuentemente deleciones de *IKZF1*. Aunque aún se conoce poco sobre este subtipo de LLA, parecen tener buen pronóstico pese a asociar las deleciones de *IKZF1* (Clappier *et al*, 2014).

#### *Amplificación intracromosómica del cromosoma 21 (iAMP21)*

Se trata de una alteración poco frecuente casi exclusiva de la edad pediátrica. Se define como la ganancia de al menos tres copias de amplias regiones del cromosoma 21, que incluyen siempre el gen *RUNX1* (Harrison *et al*, 2013). Aunque en un principio se les asignó un mal pronóstico (Moorman *et al*, 2007b), éste parece desaparecer cuando los pacientes reciben protocolos intensificados adaptados al riesgo (Moorman *et al*, 2013).

#### *Cariotipos hipodiploides*

Estudios de secuenciación masiva han revelado el frecuente hallazgo de mutaciones activadoras de la vía RAS y alteraciones de *IKZF3* en los raros casos pediátricos de LLA con cariotipo casi haploide. Por el contrario, los casos con hipodiploidía baja se caracterizan por alteraciones en *IKZF2*, *TP53*, *CDKN2A/B* y *RB1* y activación de las vías de señalización PI3K/mTOR y MEK-ERK (Holmfeldt *et al*, 2013). Este hecho demuestra la diferencia biológica entre estas dos subentidades hipodiploides. Particular importancia tiene la frecuencia de mutaciones germinales de *TP53* en más de la mitad de estos casos, que desvela casos de síndrome de Li-Fraumeni.

### *LLA de fenotipo T*

Además de los frecuentes (si bien poco recurrentes) reordenamientos de factores de transcripción con los distintos loci del *RCT*, la LLA-T también se caracteriza por mutaciones en genes que regulan la diferenciación T y vías de supresión de tumores. Dentro de las más frecuentes destacan las mutaciones activadoras de *NOTCH1*, que aparecen en el 50% de las LLA-T y, aunque es aún controvertido, parecen asociar un pronóstico favorable (Natarajan *et al*, 2015; Asnafi *et al*, 2009). También son frecuentes las mutaciones o deleciones de *PHF6*, gen relacionado con la regulación epigenética, en un 16 y 38% de las LLA-T del niño y del adulto, respectivamente (Van Vlierberghe *et al*, 2010). Otras alteraciones halladas con menor frecuencia son las mutaciones o deleciones de *PTEN*, gen supresor de tumores que inactiva la vía de señalización de PI3K-AKT, en un 5-10% de los casos, mutaciones en el gen supresor de tumores *CNOT3* en un 8% de adultos y de las proteínas ribosomales RPL5 y RPL10 en el 10% de los niños (De Keersmaecker *et al*, 2012).

Especial importancia ha tenido la descripción de la LLA-T de precursor inmaduro [*early T-cell precursor (ETP)-ALL*], definida como una neoplasia de célula inmadura que carece de varios marcadores de célula T (CD1a, CD8 y CD5-/d) y muestra expresión aberrante de marcadores mieloides. Se caracteriza por un espectro mutacional similar al de la leucemia mieloblástica aguda en adultos, con afectación de las vías JAK-STAT y el complejo PRC2, modulador epigenético (p.e. *DNMT3A*, *RUNX1*, *JAK1*, *FLT3* y *EZH2*) (Zhang *et al*, 2012).

#### **1.3.1. Microdeleciones intragénicas**

Diversos estudios han escrutado el genoma de la LLA mediante arrays de SNPs demostrando que las anomalías en el número de copias (*copy number abnormalities*, *CNA*) son alteraciones frecuentes en la LLA (Paulsson *et al*, 2008; Mullighan *et al*, 2007; Kawamata *et al*, 2008). Las deleciones son mucho más frecuentes que las ganancias o las regiones con pérdida de heterocigosidad (LOH). La gran mayoría de regiones comúnmente delecionadas son <1Mb, lo que hace necesario que se empleen técnicas de mayor resolución que la citogenética convencional para su estudio. Muchas de estas regiones delecionadas incluyen escasos genes, de entre los cuales se han seleccionado aquellos candidatos comúnmente delecionados. De entre los genes involucrados más frecuentes destacan

los implicados en el desarrollo linfóide, en el ciclo celular y algunos genes supresores de tumores (Mullighan *et al*, 2007), como se detallará a continuación.

Se han hallado secuencias de reconocimiento RAG (*Recombination Activating Gene*) adyacentes a los sitios de rotura de estas deleciones, por lo que se postula que su origen se debe a una actividad anómala de las enzimas RAG1 y RAG2, encargadas del reordenamiento de *IGH* y *RCT* durante el proceso de recombinación VDJ (Mullighan & Downing, 2009; Papaemmanuil *et al*, 2014).

Pese a que inicialmente se pensó que las microdeleciones génicas eran un evento característico de la de LLA-B pediátrica (Paulsson *et al*, 2010; Baughn *et al*, 2015; Bungaro *et al*, 2009; Mullighan *et al*, 2007; Kawamata *et al*, 2008), se ha visto que éste es un fenómeno también frecuente en la LLA-T (Karman *et al*, 2015) y que aparece con inesperadas similitudes tanto en la LLA pediátrica como en la del adulto (Okamoto *et al*, 2010; Dirse *et al*, 2015; Paulsson *et al*, 2008; Ribera *et al*, 2015; Usvasalo *et al*, 2008).

#### **1.3.1.1 Deleciones en genes de desarrollo linfóide B: PAX5, EBF1 y ETV6**

El estudio de estas pequeñas regiones delecionadas ha revelado que involucran a genes clave en el desarrollo linfóide B. Una de las más frecuentes son las que incluyen al gen *Paired Box Gene 5* (*PAX5*), localizado en 9p13. *PAX5* codifica a un factor de transcripción fundamental en la diferenciación linfóide hacia linaje B y en el mantenimiento de la expresión de antígenos característicos de línea (CD19, CD79A y CD72). Se ha encontrado delecionado en un 30% de las LLA-B (Mullighan *et al*, 2009). Las deleciones pueden ser focales o abarcar regiones más amplias, como el brazo corto del cromosoma 9. *PAX5* también puede alterarse en la LLA mediante mutaciones deletéreas o en los dominios de unión al ADN y mediante reordenamientos con distintos genes (Mullighan *et al*, 2007).

Otro de los genes frecuentemente delecionados es *EBF1* (*Early B Cell Factor 1*), que codifica también un factor de transcripción necesario en el desarrollo linfóide B de manera que, en caso de estar ausente o en haploinsuficiencia, se produce un bloqueo madurativo en el estadio pro-B. Este gen se localiza en 5q33 y se ha reportado delecionado en un 5% de las LLA-B (Mullighan *et al*, 2009).

*ETV6* es un factor de transcripción de la familia ETS, previamente conocido como el oncogén *TEL*, necesario para la hematopoyesis y localizado en 12p13. Se

encuentra deleciónado en un 13% de las LLA-B pediátricas (Mullighan & Downing, 2009) y es más conocido en esta patología por encontrarse reordenado con diferentes genes, el más frecuente, *RUNX1*.

Más genes implicados en el desarrollo y diferenciación linfocítica B se han visto alterados con menor frecuencia mediante deleciones focales, como *IKZF3* o *Aiolos* (17q21), *LEF1* (*Lymphoid Enhancer-Binding Factor 1*, en 4q23-q25), *TCF3* (*Transcription Factor 3* o *E2A*, en 19p13) o *ERG* (*Ets Avian Erythroblastosis Virus E26*) localizado en 21q22 (Mullighan *et al*, 2009; Paulsson *et al*, 2008; Mullighan *et al*, 2007).

#### **1.3.1.2 Deleciones en genes del ciclo celular y apoptosis: *CDKN2A*, *CDKN2B* y *BTG1*.**

Las deleciones más frecuentes globalmente son las que ocurren en el brazo corto del cromosoma 9, deleciones ya descritas previamente mediante citogenética convencional. La alta resolución de los microarrays de SNPs ha permitido definir con precisión la región mínimamente deleciónada, apuntando a *CDKN2A* (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2*), localizado en 9p21, como gen candidato. Junto a él, *CDKN2B*, a tan sólo 7Kb de *CDKN2A*, también se encuentra deleciónado de manera recurrente. Las proteínas que codifican, p15 y p16, son conocidas supresores de tumores capaces de inducir arresto en la fase G2 del ciclo celular y apoptosis, actuando como regulador negativo de la proliferación de las células normales. Deleciones de estos genes se han comunicado en frecuencia del 40% al 70% de las LLA (Mullighan *et al*, 2009). Ocurren tanto en las LLA de fenotipo B como en las de fenotipo T, donde es más frecuente que aparezcan como deleciones homocigotas y casi siempre por mecanismos de pérdida de heterocigosidad (Karman *et al*, 2015).

Las deleciones de *BTG1* (*B-Cell Translocation Gene 1*), localizado en 12q22, ocurren con menor frecuencia (~10%). Este gen tiene funciones antiproliferativas, ya que su expresión es mayor en fases G0/G1 del ciclo celular y menor cuando la célula progresa a G1.

Otras deleciones menos frecuentes se han descrito en 3p14.2 apuntando al gen supresor de tumores *FHIT* (*Fragile Histidine Triad*), implicado en la inducción a la apoptosis o en 6q21 incluyendo al gen *CCNC* (ciclina C), implicado en el inicio de la

actividad transcripcional como miembro del complejo mediador mediante regulación de la ARN polimerasa.

### **1.3.1.3 Otras deleciones recurrentes**

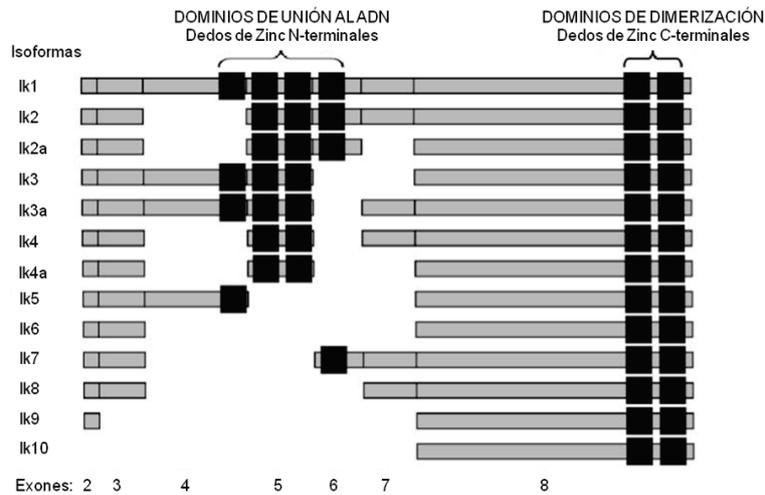
Otras deleciones se han encontrado en 13q14, implicando al conocido gen supresor de tumores del retinoblastoma (*RB1*) (Mullighan *et al*, 2009) o en la región pseudoautosómica de los cromosomas sexuales (PAR-1), localizada en Xp22/Yp11, que incluye a *CRLF2* (*Cytokine Receptor-Like Factor 2*), implicado en la activación de la vía JAK/STAT (Russell *et al*, 2009). También se han visto deleciones en 17q11.2 englobando al gen de la neurofibromatosis (*NF1*), entre otros.

### **1.3.2. Ikaros Zinc Finger 1 (IKZF1)**

*IKZF1* (IKAROS family zinc finger 1) es un gen localizado en el brazo corto del cromosoma 7 (7p12.2), que codifica a Ikaros, un factor de transcripción perteneciente a la familia de las proteínas con dedos de zinc “*Krüppel-like*” implicadas en el remodelado de la cromatina. Se expresa fundamentalmente en el tejido hematopoyético, constituyendo un factor clave para la diferenciación de las células hematopoyéticas hacia estirpe linfoide (Georgopoulos *et al*, 1994). Se ha visto que *IKZF1* es un gen con un alto grado de conservación en su estructura génica y en sus niveles de expresión entre especies (fundamentalmente entre ratones y humanos). Este hecho apoya su papel fundamental en la ontogenia del sistema linfopoyético entre las especies (Molnar *et al*, 1996).

#### **1.3.2.1 Estructura de IKZF1**

El gen consta de 8 exones, siendo el primero no codificante. En las publicaciones más antiguas se enumeraban estos exones del 0 al 7, pero la nomenclatura actual los enumera del 1 al 8 (NM\_006060). Ikaros tiene la capacidad de unirse al ADN mediante los cuatro dedos de zinc N-terminales codificados por los exones 4 - 6 y también puede formar homodímeros o heterodímeros con otras moléculas de la familia Ikaros gracias a los dos dedos de zinc C-terminales (exón 8) (Georgopoulos, 2002; Sun *et al*, 1996; 1996).



**Figura 2.** Distintas isoformas de IKAROS formadas en los progenitores linfoides mediante *splicing* alternativo.

Se conocen varias isoformas de *IKZF1* que se obtienen mediante *splicing alternativo* de sus exones en condiciones normales (Figura 2). Las isoformas largas (Ik1, Ik2 e Ik3) son las isoformas predominantes en sujetos sanos. Contienen al menos 3 dedos de zinc N-terminales y mantienen la capacidad de unión al ADN en sitios que contienen las secuencias GGGGA o AGGAA. Las isoformas más cortas (Ik4 a Ik10), que carecen de los sitios de unión al ADN, pero mantienen los dedos de zinc C-terminales, actúan como inhibidores dominantes-negativos, ya que forman dímeros con las isoformas que sí pueden unirse al ADN (Georgopoulos *et al*, 1994; Nakayama *et al*, 1999). Estas isoformas se expresan en baja cantidad en sujetos sanos como parte del estrecho control de los mecanismos que regulan el *splicing alternativo* (Kirstetter *et al*, 2002; Georgopoulos, 2002).

Las isoformas largas con gran afinidad al ADN tienen localización focal pericentromérica en estado de proliferación, mientras que en estado de reposo las isoformas cortas generadas fisiológicamente se encuentran distribuidas en el núcleo de manera difusa. Sin embargo, las isoformas cortas, especialmente Ik6, tienen localización citoplasmática (Cobb *et al*, 2000; Ezzat *et al*, 2003). También los dominios de dimerización parecen importantes para la localización pericentromérica, de manera que determinadas mutaciones en estos dominios también provocarían localización anómala de la proteína (Cobb *et al*, 2000).

### **1.3.2.2 Función de IKZF1**

Ikaros tiene actividad transcripcional del ADN y ha demostrado ser fundamental para la correcta diferenciación y proliferación hematopoyética, particularmente, la maduración linfoide (Molnar *et al*, 1996; Georgopoulos *et al*, 1994; Rebollo & Schmitt, 2003; Hahm *et al*, 1994; Kirstetter *et al*, 2002; Westman *et al*, 2002), y más concretamente, la de estirpe B (Tonnelles, 2001). El ratón con mutación homocigota en los dominios de unión al ADN carece no solo de linfocitos B, T y NK, sino también de sus precursores más indiferenciados. Sin embargo, las líneas mieloides y eritroides permanecen intactas en estos ratones (Georgopoulos *et al*, 1994). También los modelos murinos han demostrado que aquellos con expresión atenuada de Ikaros muestran un bloqueo parcial de la maduración linfoide B en el estadio celular pro-B (Kirstetter *et al*, 2002). Del mismo modo, en los ratones portadores de una mutación heterocigota dominante-negativa en *IKZF1* se desarrolla una enfermedad hematopoyética agresiva de estirpe T (Winandy *et al*, 1995), por lo que Ikaros podría tener un papel como protooncogén.

Cuando se sobreexpresan las isoformas dominantes-negativas disminuye la expresión de las isoformas largas. Este hecho se ha comunicado en casos de LLA B y T (Winandy *et al*, 1995; Sun *et al*, 1999b; 1999c), así como en casos de crisis blásticas de LMC (Nakayama *et al*, 1999) y en modelos experimentales (Tonnelles, 2001) lo que sugiere además un papel de este gen como supresor de tumores en neoplasias hematológicas de células B.

Ikaros se expresa también en el feto y en la glándula pituitaria, jugando un papel directo en la regulación de la síntesis de la hormona adrenocorticotropa (ACTH), por lo que se le atribuye una función integradora ontogenética y filogenética del estrés y del sistema inmune (Ezzat *et al*, 2005; Chrousos & Kino, 2005). Ikaros se ha visto implicado además en la tumorigénesis de la glándula pituitaria humana (Ezzat *et al*, 2003).

### **1.3.2.3 Implicación de IKZF1 en la LLA**

Alteraciones en *IKZF1* y el consecuente exceso de isoformas cortas se han visto en células leucémicas de LLA B y T infantiles (Avet-Loiseau *et al*, 2000; Ruiz *et al*, 2004; Sun *et al*, 1999a), LLA-B del adulto (Nishii *et al*, 2002), LMC en crisis blástica (Nakayama *et al*, 1999), leucemia mielomonocítica y leucemia monocítica (Yagi, 2002),

así como en recaídas de LLA que no las presentaban previamente (Mullighan *et al*, 2008b). También está descrita la implicación de *IKZF1* en la translocación t(3;7)(q27;p12) en casos de linfoma no Hodgkin de célula B, reordenado con *BCL6* (Ichinohasama *et al*, 1998; Hosokawa *et al*, 2000).

Las alteraciones en este gen parecen ser muy raras en otros tipos de tumores sólidos, tal y como lo indica el proyecto COSMIC (Bamford *et al*, 2004), probablemente por su escaso papel en tejidos no hematopoyéticos ni endocrinos. Curiosamente, sí se han descrito anomalías de este gen similares a las halladas en la LLA en tumores de la pituitaria (Ezzat *et al*, 2003), tejido donde Ikaros también juega un papel importante en su desarrollo.

La presencia de isoformas cortas de manera predominante es patológica y condiciona una disfunción de Ikaros. En células normales se pueden encontrar isoformas cortas dominantes-negativas, sin embargo, parece que la isoforma Ik6 se halla exclusivamente en los blastos leucémicos (Iacobucci *et al*, 2009) y otras células tumorales (Ezzat *et al*, 2003). El mecanismo por el cual esta isoforma aberrante promueve la tumorigénesis parece ser el aumento de la supervivencia celular de manera independiente de IL-3 por sobreexpresión de la proteína antiapoptótica Bcl-XL y activación de la vía JAK-STAT (Yagi, 2002; Kano *et al*, 2008).

La implicación de *IKZF1* en la patogénesis de la LLA ha cobrado importancia por los hallazgos de dos grupos de investigadores independientes. Por un lado, Iacobucci y colaboradores describieron la presencia muy frecuente de isoformas aberrantes (Ik6) en las LLA-Ph<sup>+</sup> y en las LMC en crisis blástica (80-90%), atribuyéndolas a un mecanismo de *splicing* alternativo inducido por el transcrito BCR-ABL (Klein *et al*, 2005; Iacobucci *et al*, 2008b), hecho ya comunicado previamente a menor escala (Iacobucci *et al*, 2008b). Casi simultáneamente, Mullighan y colaboradores publicaron el hallazgo de microdeleciones intragénicas en la LLA infantil en más de una cuarta parte de los pacientes, siendo éstas las responsables de la expresión anómala del gen, incluyendo la expresión de Ik6 (Klein *et al*, 2005). Posteriormente, el grupo italiano confirmó el hallazgo de deleciones intragénicas como mecanismo de expresión de isoformas aberrantes en el 75% de las LLA-Ph<sup>+</sup> y en la LMC en su progresión a crisis blástica (Mullighan *et al*, 2009).

Dos tipos de deleciones son las más frecuentes, al menos en la LLA-Ph<sup>+</sup>: la pérdida de los exones 4 al 7 que suponen un 70% de los casos con deleciones parciales y la pérdida de los exones 2 al 7 en el 30% de estos casos. Además un porcentaje no despreciable de casos desarrollan una pérdida completa del locus, en

algunos debido a una monosomía siete, que provoca una haploinsuficiencia del gen *IKZF1* (Iacobucci *et al*, 2009).

Aunque con menor frecuencia, se han descrito mutaciones en la secuencia de *IKZF1* en la LLA infantil (3-5%), lo que provoca una pérdida completa de la función de Ikaros (mutaciones deletéreas) o isoformas aberrantes como la G158S que, al igual que Ik6, actúa de manera competitiva con la isoforma normal (Mullighan *et al*, 2009; Iacobucci *et al*, 2009). También se han descrito mutaciones como alteraciones causantes de expresión anómala en tumores de la glándula pituitaria (Olsson *et al*, 2015; Mullighan *et al*, 2009).

Cómo las alteraciones de *IKZF1* contribuyen a la leucemogénesis ha sido explicado por la incapacidad de unión al ADN, ya que su inactivación en linfocitos en estadio pre-B temprano provoca un arresto en su diferenciación, con activación de las vías de proliferación y autorrenovación y silenciamiento de las vías pre-BCR necesarias para la diferenciación (Ezzat *et al*, 2003). Además, estas alteraciones parecen implicadas en la progresión y avance de la enfermedad, ya que aparecen como evento adquirido en la evolución a crisis blástica de la LMC (Iacobucci *et al*, 2008) y en las recaídas de la LLA (Iacobucci *et al*, 2008b; Nakayama *et al*, 1999).

#### **1.3.2.4 Valor pronóstico de las alteraciones de *IKZF1* en la LLA**

La importancia del hallazgo de alteraciones en Ikaros viene dada por su asociación a un peor pronóstico (Mullighan *et al*, 2008b), ya que estas alteraciones ocurren en una proporción no despreciable de niños con LLA-Ph<sup>-</sup> (40% de los pacientes con cariotipo normal y LLA de alto riesgo y 23% de pacientes con alteraciones misceláneas y LLA de riesgo estándar) (Mullighan *et al*, 2009). Varios estudios posteriores han confirmado este pronóstico adverso en la LLA-B pediátrica, incluyendo tanto la LLA-Ph<sup>-</sup> (Yang *et al*, 2011; Chen *et al*, 2012; Olsson *et al*, 2013; Asai *et al*, 2013; Waanders *et al*, 2011; Clappier *et al*, 2015) como la LLA-Ph<sup>+</sup> (Volejnikova *et al*, 2012; van der Veer *et al*, 2013a).

En el caso de los adultos, la literatura es mucho más escasa. El grupo más estudiado es la LLA-Ph<sup>+</sup>, donde estas alteraciones son más frecuentes (Lana *et al*, 2015; van der Veer *et al*, 2013a), pero también en la LLA-Ph<sup>-</sup> (Martinelli *et al*, 2009). Este subgrupo de pacientes con LLA-Ph<sup>-</sup> y deleciones de *IKZF1* formaría parte de la

recientemente descrita entidad “LLA-Ph-*like*” mencionada anteriormente y también se ha asociado a un peor pronóstico (van der Veer *et al*, 2013; Boer *et al*, 2015).



## **2.HIPÓTESIS**



La leucemia linfoblástica aguda se caracteriza por una gran diversidad de anomalías genéticas. Estas alteraciones han contribuido a mejorar notablemente el conocimiento sobre la leucemogénesis y se utilizan tanto con fines diagnósticos, como para establecer el pronóstico, monitorizar la enfermedad residual, adaptar el tratamiento al riesgo de recaída y diseñar dianas terapéuticas. En los últimos años se ha visto que la adquisición de microdeleciones génicas es un evento frecuente en los pacientes con LLA y podrían tener implicación pronóstica, especialmente las que afectan al gen *IKZF1*. Sin embargo, la relevancia y el significado clínico de estas alteraciones no han sido suficientemente estudiadas.



### **3. OBJETIVOS**



El objetivo general de esta tesis es el estudio de nuevas dianas moleculares en una amplia serie de pacientes adultos y pediátricos diagnosticados de LLA. El fin es llegar a comprender de manera más profunda la evolución de estas neoplasias, así como identificar nuevos marcadores genéticos con potencial pronóstico y/o terapéutico. Para ello, se analizará la presencia de microdeleciones intragénicas, fenómeno recientemente descrito en la patogenia de esta enfermedad, poniendo especial interés en las que afectan al gen *IKZF1*. Este objetivo general se puede desglosar en los siguientes objetivos concretos:

1. Caracterización clínico-biológica de la LLA mediante una combinación apropiada de la citomorfología, citometría de flujo, citogenética convencional, FISH y detección molecular de alteraciones génicas clásicas.
2. Estudio de las alteraciones del gen *IKZF1*, incluyendo el patrón de expresión de isoformas, la presencia de microdeleciones y de mutaciones en los exones codificantes.
3. Estudio de microdeleciones intragénicas en los genes *CDKN2A*, *CDKN2B*, *PAX5*, *ETV6*, *EBF1*, *BTG1*, *RB1* y la región pseudoautosómica del cromosoma X/Y (PAR1).
4. Analizar el valor pronóstico de las alteraciones citogenéticas y moleculares anteriormente mencionadas en pacientes con LLA.



## **4.MATERIAL Y MÉTODOS**



#### 4.1. Pacientes

La serie analizada incluyó pacientes pediátricos (<14 años) y adultos diagnosticados de LLA entre los años 1992 y 2012, de acuerdo a los criterios vigentes en el momento del diagnóstico, que se basaron en clasificación FAB (Bennett *et al*, 1976) y la OMS 2001 (Jaffe *et al*, 2001) y 2008 (Swerdlow *et al*, 2008). Los pacientes fueron diagnosticados en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, el Hospital Clínico Universitario de Valencia, el Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia, el Hospital General Universitario de Alicante, el Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona, Hospital General Universitario Morales Meseguer de Murcia y Hospital Universitario Central de Asturias.

El criterio limitante para la inclusión en el estudio fue la disponibilidad de muestra biológica en el momento del diagnóstico. En el caso de los hospitales Doctor Peset de Valencia y General de Alicante el estudio citogenético se centralizó en los laboratorios de diagnóstico del Hospital La Fe. Las muestras de médula ósea analizadas fueron obtenidas mediante punción esternal o en cresta ilíaca posterosuperior y, en casos excepcionales, se emplearon muestras de sangre periférica con elevado recuento de blastos leucémicos.

En todos los casos se realizó estudio citomorfológico en extensiones de médula ósea y sangre periférica con tinción May-Grünwald-Giemsa, así como mieloperoxidasa (MPO). En los pacientes en los que se consideró oportuno, se realizaron además tinciones citoquímicas de PAS, fosfatasa ácida y alfa-naftil-acetatoesterasa. También se realizó estudio inmunofenotípico con un panel mínimo que incluyó los siguientes marcadores: CD79a, CD3, IgM, TdT y MPO (citoplasma/nuclear), CD10, CD20, CD19, CD33, CD13, CD117, CD22, CD45, CD66, CD8, CD4, CD3, CD5, CD7, CD38 y HLA-DR. Cada paciente fue codificado según la clasificación inmunológica del EGIL (Bennett *et al*, 1976). Asimismo, se realizó estudio citogenético y de biología molecular, como se detalla a continuación.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Biomédica (CEIB) del Hospital Universitario y Politécnico La Fe y todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a la Declaración de Helsinki.

## 4.2. Estudio citogenético

### 4.2.1. Citogenética convencional

El estudio de citogenética convencional consistió en el estudio de las alteraciones cromosómicas en las metafases de las células leucémicas obtenidas tras ser cultivadas *in vitro* durante 24 horas mediante métodos convencionales. Los cromosomas se identificaron mediante el método de bandas G con tripsina-Giemsa. Las metafases fueron analizadas usando el programa Ikaros (Metasystems Inc., Alemania). Las anomalías cromosómicas se describieron de acuerdo al Sistema Internacional de Nomenclatura Cromosómica (ISCN, Shaffer *et al*, 2013).

Los casos con menos de 20 metafases analizadas en ausencia de un clon anómalo se clasificaron como “no valorables”. Para hablar de cambio estructural o ganancia cromosómica se precisó su hallazgo en dos o más metafases, y en tres de ellas si se trataba de una pérdida cromosómica.

Los pacientes se clasificaron de acuerdo a la presencia de las siguientes alteraciones cromosómicas y en este orden:

1. t(9;22)(q34;q11.2),
2. t(4;11)(q21;q23),
3. t(11q23) distintas de la anterior,
4. t(1;19)(q32;p13.3),
5. t(12;21)(p13;q22),
6. t(14)(q11.2), t(7)(p14-15) o t(7)(q34-36),
7. del(9p),
8. del(6q),
9. Casi haploidía (< 30 cromosomas),
10. Hipodiploidía baja (30 - 41 cromosomas),
11. Hiperdiploidía alta (50 - 65 cromosomas),
12. Casi triploidía (65 – 80 cromosomas),
13. Casi tetraploidía (>80 cromosomas),

14. Cariotipo complejo (presencia de 5 ó más anomalías, siendo al menos una de ellas estructural y excluyendo a los pacientes con alguna translocación recurrente),
15. Otras alteraciones numéricas no referidas en las categorías anteriores,
16. Otras alteraciones estructurales no referidas en las categorías anteriores, y
17. Cariotipo normal (20 metafases analizadas sin anomalías somáticas).

#### **4.2.2. FISH**

El estudio de los reordenamientos más frecuentes en la LLA se llevó a cabo mediante hibridación de sondas específicas en las extensiones preparadas tras los cultivos celulares según las recomendaciones de la casa comercial. Las sondas utilizadas en los casos pediátricos fueron:

- LSI t(9;22) *BCR/ABL ES Dual Color Dual Fusion* (Vysis)
- LSI *MLL Dual Color Break apart* (Vysis)
- LSI t(12;21) *ETV6/RUNX1 ES Dual Color Dual Fusion* (Vysis)
- LSI *E2A Dual Color Break apart* (Cytocell)

En los pacientes adultos se hibridaron las dos primeras sondas.

### **4.3. Estudio de las alteraciones moleculares**

#### *Extracción de ácidos nucleicos*

Para la extracción de DNA se utilizó el kit comercial QIAamp® DNA Mini kit (Quiagen, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. En algunos casos se realizó a partir de células fijadas en Carnoy preparadas para los estudios citogenéticos. En estos casos, se procedió realizando dos lavados con PBS antes de seguir el procedimiento de extracción con el kit anteriormente mencionado. La cantidad y calidad del DNA se determinó mediante espectrofotometría, medida como absorbancia a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de entre 260 nm y 280 nm (NanoDrop ND1000®), y mediante la migración en gel de agarosa al 0.8% teñido con GelRed™

(Biotium). Se seleccionaron aquellas muestras con ratios de absorbancia 260/280 de alrededor de 1.8 y sin degradación en el gel.

Para los estudios de secuenciación, se realizó una amplificación completa del DNA genómico mediante el kit REPLI-g MIDI de QIAGEN®, siguiendo las instrucciones del fabricante y partiendo de una cantidad de DNA genómico 30 ng suspendido en tampón Tris-EDTA (TE). El DNA amplificado se diluyó en TE a una concentración 1:100 y se usó de forma general 3 µl del DNA diluido para cada PCR.

Para la extracción del RNA se utilizó el kit comercial MagNa Pure LC mRNA HS, utilizando el robot MagNa Pure (Roche Diagnostics) siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza de las muestras se determinó igualmente mediante espectrofotometría siendo el valor óptimo del cociente A260/A280 de 1.8 – 2.0.

Posteriormente, se realizó la transcripción reversa para obtener cDNA a partir 0,5 µg de RNA total en un volumen final de 25 µL empleando los reactivos y siguiendo las instrucciones del kit TaqMan® Gold RT-PCR Kit (Applied Biosystems). La integridad del RNA se confirmó mediante amplificación por PCR del mRNA de los genes de expresión constitutiva GUS o ABL.

#### **4.3.1. Estudio de reordenamientos clásicos**

Se estudiaron los principales genes de fusión en la LLA, que son *BCR-ABL*, *MLL-AF4* y *TEL-AML1* en los casos pediátricos y los dos primeros en los adultos. El estudio se realizó mediante PCR en tiempo real en un equipo LightCycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Para la detección del transcrito BCR-ABL se siguió el método de Gabert et al., utilizando los cebadores ENF402 y ENR561 y la sonda marcada ENP541 situada sobre el gen *ABL*. En el caso de la determinación de TEL-AML1 se utilizaron las combinaciones de cebadores TEL2 y AML1-R3 (M1) o TEL2 y X2AML (M2) de Satake N *et al.* En ambos casos, los resultados de expresión se normalizaron con la expresión del gen constitutivo *GUS*. La determinación del reordenamiento MLL-AF4 se realizó mediante RT-PCR convencional con dos parejas de cebadores específicos según el método de Van Dongen JJM *et al.* y su producto se migró sobre gel de agarosa al 1.5%.

#### 4.3.2. Estudio de la expresión cualitativa de las isoformas del gen *IKZF1*

Se realizó una RT-PCR con cebadores en el exón 2 y el exón 8 del gen *IKZF1*, de manera que se amplificaran todas las isoformas de este gen y se pudieran discriminar según su tamaño molecular. Para ello, se utilizaron los cebadores descritos por Iacobucci et al. 5'-ATGGATGCTGATGAGGGTCAAGAC-3' y 5'-GATGGCTTGGTCC ATCACGTGG-3'

Para la PCR se utilizaron 2,5 µL de cDNA, 2,5 µL de Amplitaq Buffer II (10x, Applied Biosystems, Foster City, CA), 2,5 µL de Amplitaq MgCl<sub>2</sub> (25 mM, Applied Biosystems), 0,5 µL de dNTP (2,5 mM, GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom), 25 pmol de cada cebador, 0,25 µL de AmpliAq Gold (5 U/µL, Applied Biosystems) y agua bidestilada hasta un volumen final de 25 µL. Las condiciones de la PCR fueron 94°C durante 10 minutos para la desnaturalización, seguido de 45 ciclos alternando 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 90 segundos, y extensión final de 10 minutos a 72°C. El producto de la RT-PCR se migró en un gel de agarosa al 2% junto con el marcador de peso molecular *Marker VI* (0,15 – 2,1 kbp, Roche, Indianápolis USA).

#### 4.3.3. Estudio de microdeleciones intragénicas mediante MLPA

La Amplificación Múltiple Ligada a Sonda o MLPA (del inglés, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) es un método de PCR múltiple que detecta alteraciones en el número de copias de hasta 50 *loci* en un solo experimento.

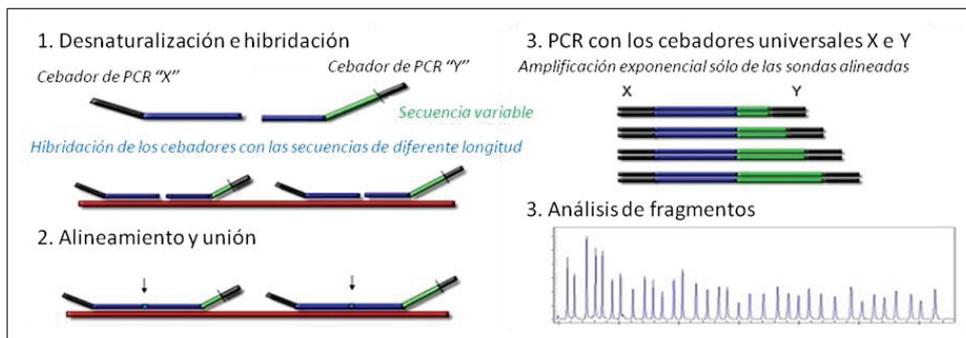


Figura 3. Esquema de las reacciones de la técnica de MLPA (adaptado de MRC Holland ©).

Lo característico de este método es que no se amplifican las secuencias diana del DNA testado, sino las sondas de MLPA que han hibridado con esas secuencias diana. Cada sonda de MLPA consiste en un par de oligonucleótidos complementarios a regiones adyacentes a la secuencia diana. Tras unirse a ellas, ambos oligonucleótidos son ligados y se convierten en una única molécula que será amplificada exponencialmente durante la reacción de PCR (Figura 3). Este método permite el uso de un único par de cebadores común para todas las sondas, lo que permite que se puedan generar hasta 50 amplicones en una sola reacción. Estos amplicones son posteriormente separados y cuantificados mediante electroforesis capilar y comparados con los amplicones generados por un DNA de referencia.

El kit utilizado fue el SALSA MLPA kit P335-A1/B1 (MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands), que incluye sondas para cada uno de los 8 exones del gen *IKZF1*, además de otros genes que se encuentran comúnmente deletados en la LLA: *CDKN2A/B* (3 sondas), *PAX5* (6 sondas), *EBF1* (4 sondas), *ETV6* (6 sondas), *BTG1* (4 sondas), *RB1* (5 sondas), y la región PAR1: *CRLF2*, *CSF2RA*, *IL3RA* (1 sonda cada uno). Cada una de las sondas incluidas en el kit se detalla en la Tabla 5.

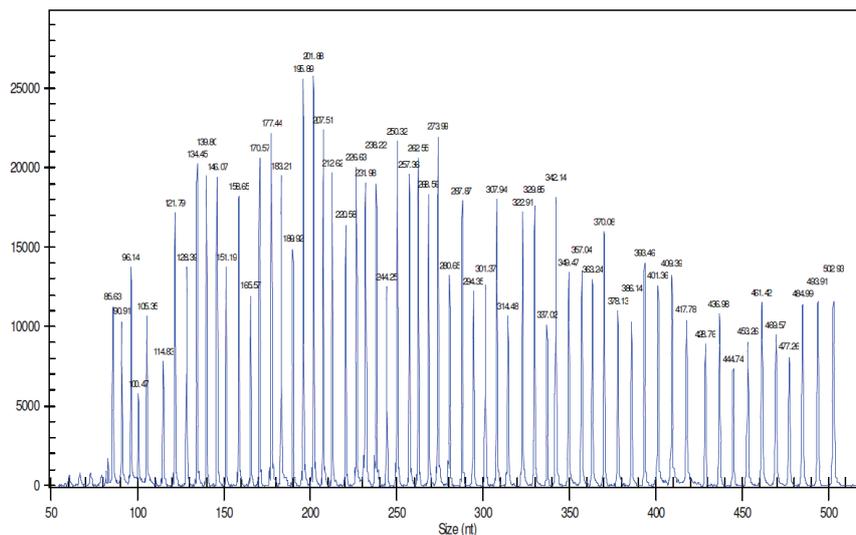
**Tabla 5.** Tamaño de las sondas incluidas en el kit de MLPA.

| Tamaño de fragmento (pb)     | Región diana | Tamaño de fragmento (pb)        | Región diana |
|------------------------------|--------------|---------------------------------|--------------|
| <b><i>EBF1</i> (5q33.3)</b>  |              | <b><i>CDKN2A/B</i> (9p21.3)</b> |              |
| 226                          | Exón 1       | 238                             | Exón 2       |
| 371                          | Exón 10      | 251                             | Exón 2a      |
| 436                          | Exón 14      | 308                             | Exón 5       |
| 462                          | Exón 16      | <b><i>ETV6</i> (12p13.2)</b>    |              |
| <b><i>IKZF1</i> (7p12.2)</b> |              | 301                             | Exón 1       |
| 269                          | Exón 1       | 386                             | Exón 1       |
| 208                          | Exón 2       | 400                             | Exón 2       |
| 379                          | Exón 3       | 244                             | Exón 3       |
| 263                          | Exón 4       | 484                             | Exón 5       |
| 142                          | Exón 5       | 196                             | Exón 8       |
| 470                          | Exón 6       | <b><i>BTG1</i> (12q22.33)</b>   |              |
| 343                          | Exón 7       | 178                             | BTG1-Área    |
| 288                          | Exón 8       | 409                             | BTG1-Área    |
| <b><i>PAX5</i> (9p13.2)</b>  |              | 232                             | Exón 1       |
| 393                          | Exón 10      | 330                             | Exón 2       |
| 274                          | Exón 8       | <b><i>RB1</i> (13q14.2)</b>     |              |
| 337                          | Exón 7       | 220                             | Exón 6       |
| 202                          | Exón 6       | 315                             | Exón 14      |
| 282                          | Exón 5       | 358                             | Exón 19      |
| 172                          | Exón 2       | 418                             | Exón 24      |
| 160                          | Exón 1       | 445                             | Exón 26      |

Se llevó a cabo el protocolo siguiendo las instrucciones del kit, que se resumen a continuación: Se desnaturalizaron 100 ng de DNA de cada paciente en un volumen de 5  $\mu$ L a 98 °C durante 5 minutos y posteriormente se hibridó con las sondas del kit durante toda la noche (16h); a continuación se realizó la reacción de ligación, seguida de la PCR. Las muestras se procesaron en grupos de 15 – 20, siempre junto a 4 ó 5 muestras control. Como controles normales se utilizaron muestras de donantes sanos proporcionadas por el Biobanco La Fe.

El producto de esta PCR contiene fragmentos marcados con Cy5.0 de 130 a 480 nucleótidos de longitud (Tabla 5), que se analizaron mediante electroforesis capilar en un secuenciador ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) (Figura 4). El marcador de peso molecular utilizado para establecer el tamaño de cada uno de los fragmentos fue el 500 LIZ Size Standard.

Los resultados obtenidos en el secuenciador se analizaron con los programas informáticos GeneScan® y GeneMapper® versión 4.0.



**Figura 4.** Patrón de electroforesis capilar de una muestra control analizada con el SALSA MLPA probemix P335-B1 ALL-IKZF1.

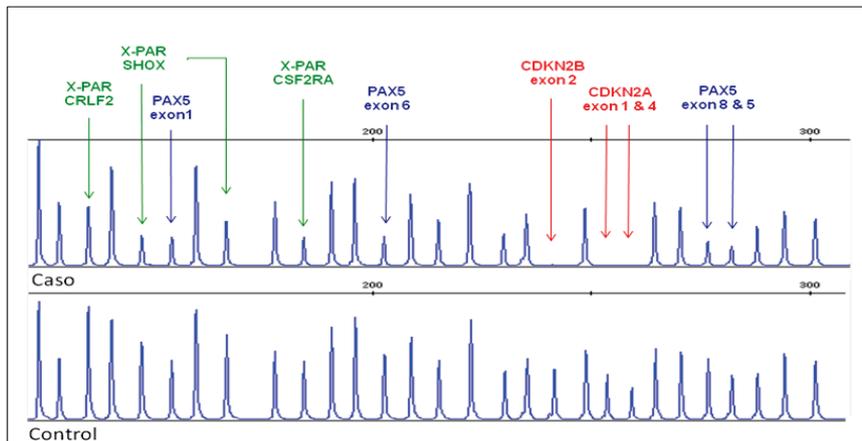
Se normalizaron los datos exportando las áreas de pico de cada uno de los fragmentos amplificados en cada caso (Ejemplo en Figura 5). Para obtener el área relativa de cada pico ( $A_{Ri}$ ) y evitar las diferencias en el rendimiento de la PCR en cada

caso individual, se realizó una normalización de las áreas intra-muestra, dividiendo cada área ( $A_i$ ) por la suma de todas las áreas.

$$A_{Ri} = A_i / (A_1 + A_2 + \dots + A_{50})$$

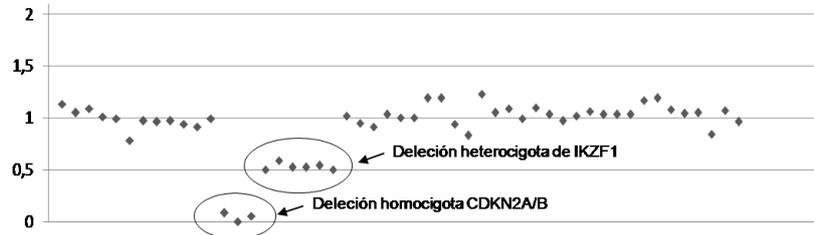
El número de copias (NC) relativo se obtuvo normalizando cada área relativa con la media de las áreas relativas de sus controles (Ejemplo en Figura 6).

$$NC = A_{Ri} / \overline{X}(A_{RIC1} + A_{RIC2} + \dots + A_{RICn})$$



**Figura 5.** Electroforesis capilar de los productos amplificados mediante MLPA. El área bajo los picos se compara con el control para valorar la presencia de anomalías en el número de copias de cada uno de los loci. En este caso se observa delección heterocigota en *PAX5* y la región *PAR1* y delección homocigota en los genes *CDKN2A/B*.

Se consideró dotación diploide ( $NC = 2$ ) en aquellos casos con un área relativa entre 0,7 y 1,3. Los valores  $<0,7$  se interpretaron como delección heterocigota ( $NC = 1$ ) y los valores  $<0,3$  como delección homocigota ( $NC = 0$ ). Valores  $>1,3$  indicaron ganancias.



**Figura 6.** Representación gráfica de las áreas proporcionales bajo los picos de amplificación. El caso representado muestra una deleción heterocigota en las sondas específicas para los exones del gen *IKZF1* y homocigota para las del gen *CDKN2A/B*.

#### 4.3.4. Estudio de mutaciones en *IKZF1*

El estudio de mutaciones se realizó en los 7 exones codificantes del gen *IKZF1* (exones del 2 al 8). Los exones 2 – 7 son exones de pequeño y mediano tamaño que permitieron el empleo de la técnica de curvas de disociación de alta resolución o *High Resolution Melting* (HRM) como método de cribado de mutaciones. Sin embargo, en el caso del exón 8, que es de gran tamaño, se optó por emplear secuenciación clásica tipo Sanger. Se empleó DNA amplificado en ambos procedimientos, que se detallan a continuación.

##### 4.3.4.1 Técnica de curvas de disociación de alta resolución (*High Resolution Melting*)

El HRM (*High Resolution Melting*) es una técnica simple, rápida y de relativo bajo coste que se usa como método de cribado para la identificación de variaciones en las secuencias de nucleótidos que conforman el DNA.

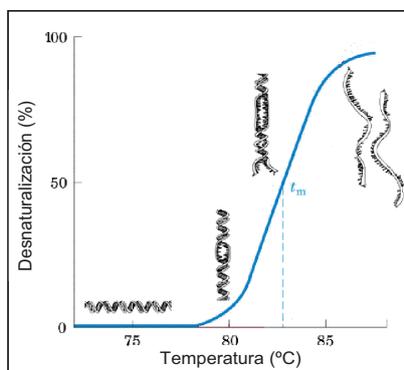


Figura 7. Temperatura de fusión ( $T_m$ ).

La técnica de HRM se basa en la amplificación de la región de interés mediante PCR, asociando intercalantes fluorescentes que se unen específicamente a la doble cadena de DNA. Tras ello, se produce un calentamiento gradual de la muestra y, a medida que las dos hebras se separan, se mide la fluorescencia emitida en la disociación. Esta medición genera una curva y un valor concreto de temperatura de fusión o de *melting* ( $T_m$ ), definida como la temperatura a la que se ha desnaturalizado la mitad del DNA (Figura 7). Estas curvas son específicas para cada secuencia y permiten distinguir variaciones de un único nucleótido en la secuencia estudiada.

Se diseñaron cebadores específicos para cada exón que amplificaran un fragmento con un tamaño de 150 a 400 pb (Tabla 6). La temperatura de anillamiento de cada una de las parejas de cebadores se estudió mediante un gradiente de temperatura en PCR convencional de 54°C a 62°C, seleccionando en cada caso la más específica. Se utilizó DNA amplificado de donantes sanos para poner a punto las reacciones.

La amplificación por PCR y el posterior análisis de las curvas de fusión fue llevada a cabo en un equipo LightCycler 480® con un sistema de placas de 96 pocillos. Para ello, se empleó el reactivo LightCycler 480® *High Resolution Melting Master* (5  $\mu$ L), los cebadores específicos en cada caso (4 – 8 pmol de cada uno),  $MgCl_2$  entre 2 y 2,5 mM, 1,5  $\mu$ L del DNA amplificado y agua bidestilada hasta completar un volumen final de 10  $\mu$ L. Los amplificados obtenidos de las muestras control se corrieron en un gel de agarosa al 2% para comprobar que el fragmento amplificado tuviera el tamaño esperado y, por último, se contrastó que era el adecuado mediante secuenciación Sanger.

**Tabla 6.** Secuencia de los distintos cebadores utilizados para HRM.

| Exón                 | Secuencia de los cebadores                      |
|----------------------|---|
| <i>IKZF1</i> _exón 2 | CAAGTATGTGAGGAGGAAAATGC<br>TCATGAACTTCCCACACAGC |
| <i>IKZF1</i> _exón 3 | CAGGCACCTTGACCATGAC<br>AGGTTTCACAGGCACAGAGG     |
| <i>IKZF1</i> _exón 4 | ATGACACTGAGTGGCCTCCT<br>TCTCCAGGCCACTAAAGGAA    |
| <i>IKZF1</i> _exón 5 | CGTAGCATCGTCCTCATGTC<br>CAGAGTGGAGGAATCCCG      |
| <i>IKZF1</i> _exón 6 | ATTGCATGCATTCCCCTTAC<br>CTCTGCTCCTAAGGCTGCAT    |
| <i>IKZF1</i> _exón 7 | GCCTGTCTGGAAGTGTGCT<br>CCCTTTCTCCACCCTCAAC      |

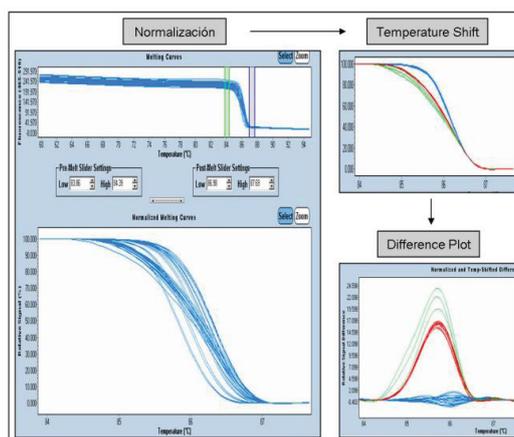
Todas las muestras fueron analizadas por duplicado en cada ensayo, junto con muestras de DNA sano, como control negativo.

**Tabla 7.** Condiciones específicas de PCR de cada amplicón.

| Exón                 | Amplicón (pb) | Temperatura de anillamiento | MgCl <sub>2</sub> |
|----------------------|---------------|-----------------------------|-------------------|
| <i>IKZF1</i> _exón 2 | 233           | 62°C                        | 2,0 mM            |
| <i>IKZF1</i> _exón 3 | 211           | 60°C                        | 2,0 mM            |
| <i>IKZF1</i> _exón 4 | 336           | 62°C                        | 2,5 mM            |
| <i>IKZF1</i> _exón 5 | 292           | 60°C                        | 2,0 mM            |
| <i>IKZF1</i> _exón 6 | 290           | 60°C                        | 2,5 mM            |
| <i>IKZF1</i> _exón 7 | 379           | 62°C                        | 2,0 mM            |

El análisis de los datos de amplificación y la especificidad del producto se realizaron con el programa LightCycler 480<sup>®</sup> Software, versión 1.5 (Roche Instrument

Center, Rotkreuz, Switzerland). El experimento se consideró válido cuando las curvas de amplificación tuvieron un valor de  $C_p < 30$  y con una eficiencia = 2.



**Figura 8.** Análisis de las curvas de disociación HRM mediante 'Gene Scanning'.

El análisis de las curvas de disociación se llevó a cabo mediante el software Gene Scanning, versión 1.2 (LightCycler 480® Software). Tras normalizar los valores de fluorescencia inicial y final de todas las muestras, se estableció el punto en el cual el DNA estaba totalmente desnaturalizado y se generó un gráfico donde las muestras quedaron agrupadas en función de sus curvas de disociación. Las muestras que presentaron diferencias en las curvas de fusión se seleccionaron para ser estudiadas por secuenciación de Sanger.

#### 4.3.4.2 Amplificación por PCR convencional

El exón 8 del gen *IKZF1* fue amplificado mediante PCR convencional. Se diseñaron cebadores específicos para amplificar toda la región codificante de este exón: 5'- TCCCCGGTTGTAGATTTTCAG -3' y 5'-TCCAGTCCAGTCTATGCTGCT-3'. El fragmento amplificado fue de 892 pb. Para la PCR se utilizaron 2,5 µL de Ampliqaq Buffer II (10x, Applied Biosystems, Foster City, CA), 2 µL de Ampliqaq MgCl<sub>2</sub> (25 mM, Applied Biosystems), 0,5 µL de dNTP (2,5mM, GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom), 25pmol de cada cebador, 0,25µL de Ampliqaq Gold (5U/µL, Applied

Biosystems), 3µL de DNA amplificado y agua bidestilada hasta un volumen final de 25µL. Las condiciones de la PCR fueron 94°C durante 10 minutos para la desnaturalización, seguido de 35 ciclos alternando 94°C durante 30 segundos, 62°C durante 45 segundos y 72°C durante 60 segundos, y extensión final de 10 minutos a 72°C. Se comprobó que la PCR había funcionado migrando el producto en un gel de agarosa al 2% junto con el marcador de peso molecular *Marker VI* (0,15 – 2,1kbp, Roche, Indianápolis USA). Posteriormente, se realizó la reacción de secuenciación tipo Sanger que se detalla a continuación.

#### 4.3.4.3 Secuenciación tipo Sanger

Se secuenciaron todas aquellas muestras con curvas de fusión diferentes por HRM y todos los productos de PCR de amplificación del exón 8 de *IKZF1*. Para ello, el producto de PCR de cada una de las muestras se trató con la enzima ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA), incubando 8 µL del producto de PCR con 3,2 µL de ExoSAP-IT durante 15 minutos a 37 °C, seguido de otros 15 minutos a 80 °C para inactivar la enzima. A continuación se realizó la PCR de secuenciación, utilizando 3,2 pmol del cebador directo o reverso, 1µL de la enzima BigDye® Terminator v1.1 Ready Reaction Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 3 µL del Buffer 5x del kit BigDye® Terminator v1.1 y 5 µL del producto de la reacción con ExoSAP-IT. Esta primera fase se llevó a cabo en el termociclador 2720-Thermal Cycler, siguiendo el siguiente programa: 94 °C durante 3 minutos, seguido de 25 ciclos que alternaron 96 °C durante 10 segundos, 50 °C durante 6 segundos y finalizando con 60° C durante 4 minutos. El producto de esta PCR se purificó mediante las columnas de filtración en gel Performa® DTR de Edge Biosystems (Genycell Biotech España, S.L.) o el QIAquick PCR Purification kit para placa de 96 pocillos (QIAGEN, Hilden, Germany).

Finalmente, el producto de la reacción fue resuspendido en 15 µL de formamida y se analizó en el secuenciador ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). El análisis de la secuencia se correlacionó con el número de GeneBank NM\_006060 y con los controles negativos de donantes sanos mediante el programa MEGA 4.1.

#### 4.4. Esquemas de tratamiento

Los esquemas de tratamiento empleados en este estudio han ido modificándose a lo largo de los años en base a los resultados obtenidos en los estudios anteriores de los grupos SHOP y PETHEMA y a la incorporación de nuevos marcadores de riesgo de recaída, como las alteraciones citogenéticas y la detección de EMR en diversos momentos del tratamiento. Todos ellos consisten en esquemas con poliquimioterapia más o menos intensificados según el riesgo de recaída establecido y divididos en tres partes fundamentales: la inducción a la remisión, seguida de uno o varios ciclos de consolidación (con o sin TPH autólogo e intensificación) y el tratamiento de mantenimiento, hasta completar los dos años del diagnóstico. En los pacientes de alto riesgo de recaída se contempla también la realización de TPH alogénico.

Una breve descripción de cada uno de ellos, así como las diferencias más relevantes, se describe a continuación.

##### 4.4.1. Tratamiento de pacientes pediátricos

Todos los pacientes pediátricos incluidos en este estudio fueron tratados con los protocolos del grupo SHOP (Sociedades de Hematología y Oncología Pediátrica).

Los pacientes mayores de un año recibieron tratamiento según los protocolos SHOP-LLA-99 y -2005 según la siguiente estratificación del riesgo de recidiva:

- *Riesgo estándar:* cuando el paciente reunió todos los criterios siguientes: edad entre 1 y 9 años, inmunofenotipo B-común, leucocitos  $<20 \times 10^9/L$ , ausencia de citogenética desfavorable (Tabla 8), ausencia de afectación extramedular y presencia de  $<5\%$  de blastos en médula ósea en día +14 de tratamiento. En el SHOP-2005, se exigió además  $EMR < 0,1\%$  al finalizar la inducción.
- *Alto riesgo:* cuando el paciente cumplió al menos uno de estos criterios: edad  $\geq 10$  años, inmunofenotipo distinto al B-común, leucocitos  $20-200 \times 10^9/L$ , citogenética desfavorable, afectación extramedular o pertenecer al grupo de riesgo estándar y presentar  $\geq 5\%$  de blastos en MO el día +14 de tratamiento o, en el protocolo SHOP-2005,  $EMR \geq 0,1\%$  al finalizar la inducción.

- *Muy alto riesgo*: cuando el paciente tuvo leucocitos  $>200 \times 10^9/L$ , presencia de t(9;22) o BCR/ABL, t(4;11) o MLL, casi haploidía (24-29 cromosomas) o Índice DNA  $<0,6$  y aquellos pertenecientes al grupo de alto riesgo con  $>5\%$  de blastos en MO el día +14 de tratamiento o, en el protocolo SHOP-2005, EMR  $\geq 0,1\%$  al finalizar la inducción.

**Tabla 8.** Grupos de riesgo citogenético utilizados en el protocolo SHOP 99 y 2005.

| Grupo de riesgo  | Alteraciones citogenéticas   |
|------------------|--|
| Favorable        | - Hiperdiploidía (51-81 cromosomas o Índice DNA: $>1,16$ )<br>- t(12;21)/TEL-AML1<br>- Cariotipo normal  |
| Desfavorable     | - Hiperdiploidía (47-50 cromosomas) o Índice DNA: 1-1,16<br>- Hipodiploidía (30-45 cromosomas) o Índice DNA: 0,6-0,99<br>- Casi tetraploidía (82-94 cromosomas)<br>- Alteraciones estructurales no incluidas en los otros grupos |
| Muy desfavorable | - Casi haploidía (23-28 cromosomas) o Índice DNA: $<0,6$<br>- t(9;22)/ BCR-ABL<br>- t(4;11)/ MLL   |

A continuación se detalla el tratamiento empleado para los distintos grupos de riesgo en el protocolo SHOP-99:

- En grupo de riesgo estándar se administró quimioterapia de inducción (Daunorrubicina  $120 \text{ mg/m}^2$  días +1 y +2, Vincristina  $1,5 \text{ mg/m}^2$  días +1, +8, +15 y +22, Prednisona  $60 \text{ mg/m}^2$  los días +1 a +28, Ciclofosfamida  $1.000 \text{ mg/m}^2$  en el día +15, Asparraginasa  $10.000 \text{ U/m}^2$  los días +16 al +20 y +23 al +27 y triple intratecal los días +1 y +15), seguido de la quimioterapia de consolidación (Metotrexato  $3 \text{ g/m}^2$  los días +36, +50 y +64, Arabinósido de Citosina  $1 \text{ g/m}^2/12$  horas los días +78 y +79 y Mercaptopurina  $60 \text{ mg/m}^2$  los días +36 al +78 y triple intratecal los días +36, +50, +64 y +78). A continuación se inició el tratamiento de mantenimiento con Metotrexato  $20 \text{ mg/m}^2$  semanal y Mercaptopurina  $60 \text{ mg/m}^2/\text{día}$  hasta completar los dos años de tratamiento desde el diagnóstico, asociando reinducciones mensuales con Asparraginasa  $20.000 \text{ U/m}^2$  alternado con Ciclofosfamida  $600 \text{ mg/m}^2$  durante los primeros 6 meses y con Prednisona  $40 \text{ mg/m}^2/\text{día}$  durante 7 días más Vincristina  $1,5 \text{ mg/m}^2$  hasta el años de tratamiento. Se administró triple

- intratecal mensual durante los cuatro primeros meses del mantenimiento.
- En el grupo de alto riesgo se intensificó la quimioterapia de inducción (una dosis más de Ciclofosfamida y una dosis añadida de Metotrexato), seguido del tratamiento de consolidación similar al del grupo de riesgo estándar. A continuación se administró la quimioterapia de intensificación, que consistió en una combinación similar a la inducción, con los siguientes cambios: una dosis menos de Ciclofosfamida, cambio de Prednisona por Dexametasona 10 mg/m<sup>2</sup>/día durante 14 días, cambio de Daunorrubicina por Epiadriamicina 25 mg/m<sup>2</sup>/día por tres dosis y adición de 5 dosis de Arabinósido de Citosina 200 mg/m<sup>2</sup>/día. El mantenimiento se realizó de igual manera que en el grupo de riesgo estándar, salvo que las reinducciones con Asparraginasa y Ciclofosfamida alternadas se alargaron hasta los primeros 9 meses de mantenimiento. Además de la profilaxis intratecal, los pacientes con afectación del SNC o > 3 años y alto riesgo de recaída en SNC (leucocitos >100x10<sup>9</sup>/L en las LLA-B o >50x10<sup>9</sup>/L en las LLA-T) recibieron radioterapia holocraneal.
  - En el grupo de muy alto riesgo, se administró una quimioterapia de inducción y consolidación similar al grupo de alto riesgo. A continuación, se intensificó el tratamiento con tres bloques más de quimioterapia, llamados bloques A, B y C, consistentes en Dexametasona 20 mg/m<sup>2</sup>/día x 6 días, Asparraginasa 25.000 U/m<sup>2</sup> y una dosis de triple intratecal, además de otros quimioterápicos según el bloque: Vincristina 1,5 mg/m<sup>2</sup>/día x 2 días, Metotrexato 3 g/m<sup>2</sup> y Arabinósido de Citosina 1 g/m<sup>2</sup>/12 horas x 4 dosis en el bloque A, Vincristina y Metotrexato a las mismas dosis, Daunorrubicina 60 mg/m<sup>2</sup> y Ciclofosfamida 200 mg/m<sup>2</sup>/día x 5 días en el bloque B, y Arabinósido de Citosina 1 g/m<sup>2</sup>/12 horas x 4 dosis y Etopósico 100 mg/m<sup>2</sup>/12 horas en el bloque C. Los pacientes recibieron los bloques A, B y C antes del alo-TPH y los bloques A, B, C, A y B, antes del TPH autólogo.

El protocolo SHOP-2005 incluyó algunas modificaciones que se detallan a continuación:

- En el grupo de riesgo estándar, se redujo a la mitad la dosis de Asparraginasa en la inducción, aumentó a 5 gr/m<sup>2</sup> la dosis de

- Metotrexato y disminuyó a la mitad la dosis de Mercaptopurina en la consolidación y se simplificaron las reinducciones del mantenimiento, que se administraron durante sólo 6 meses y con Prednisona y Vincristina exclusivamente.
- En el grupo de alto riesgo, se retiró el Metotrexato y se redujo un tercio la dosis de Asparraginasa en la inducción. En la consolidación se realizaron los mismos cambios que del grupo de riesgo estándar. En la intensificación se retiró una dosis de Epiadriamicina, se reducen las dosis de Dexametasona un 20% y la de Asparraginasa un 33%, y se aumenta el Metotrexato a 5 gr/m<sup>2</sup>. El mantenimiento se administró sin cambios salvo la dosis de Asparraginasa que se redujo a la mitad.
  - En el grupo de muy alto riesgo, se administró la misma inducción que en el grupo de alto riesgo. Además, en los pacientes con t(9;22)/BCR-ABL, se administró Imatinib desde el día +15 de la fase de inducción en dosis de 260 mg/m<sup>2</sup>/día (dosis máxima 400 mg). La consolidación fue igual que en los anteriores grupos de riesgo. A continuación se administraron los bloques de consolidación A, B y C, que se modificaron aumentando la dosis de Metotrexato a 5 g/m<sup>2</sup> y disminuyendo la Asparraginasa al 40%.

Tanto en el protocolo SHOP-99 como en el SHOP-2005, los paciente con t(9;22)/BCR-ABL o t(4;11)/MLL-AF4 recibieron en todos los casos alo-TPH, bien de hermano HLA-idéntico si disponían de él o de donante no emparentado en caso contrario. En el protocolo SHOP-2005 recibieron igual tratamiento los pacientes del grupo de muy alto riesgo con ERM  $\geq 0,1\%$  tras los tres primeros bloques de intensificación. El resto de pacientes del grupo de muy alto riesgo recibieron alo-TPH en caso de disponer de hermano HLA-idéntico y TPH autólogo en el caso contrario.

En el protocolo SHOP-LLA-LACTANTES-2002 se incluyeron los pacientes menores de un año de edad. El esquema empleado en este subgrupo de pacientes se caracterizó por utilizar menores dosis de corticoides y Asparraginasa y asociar el uso de Arabinósido de Citarabina. En los pacientes con donante familiar HLA idéntico se indicó TPH alogénico y en el resto se realizó TPH autólogo. En los pacientes de alto riesgo [t(4;11) o reordenamiento *MLL* asociado a hiperleucocitosis  $>100.000/\text{mm}^3$ , afectación del SNC o inmunofenotipo pro-B sin donante familiar, se realizó TPH alogénico de donante no emparentado (DNE) o de sangre de cordón umbilical (SCU).

#### **4.4.2. Tratamiento de pacientes adultos**

Los pacientes adultos fueron tratados, en su mayoría, con protocolos del grupo PETHEMA (Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatía Maligna).

##### **4.4.2.1 Tratamiento de los pacientes de riesgo intermedio**

Se trataron con el protocolo PETHEMA-LLA de Riesgo Intermedio-96 los pacientes que cumplieron los siguientes criterios: edad inferior a 30 años, leucocitos  $< 25 \times 10^9/L$ , ausencia de t(9;22)/BCR-ABL, t(4;11), t(1;19), cariotipo hipodiploide o casi haploide y ausencia de marcadores mieloides. También se incluyeron los mayores de 50 años sin t(9;22)/BCR-ABL. El esquema de tratamiento fue similar a los protocolos pediátricos descritos más arriba, con las siguientes modificaciones:

- Quimioterapia de inducción similar a la del SHOP-99 de riesgo estándar, con reducción de la dosis total de Daunorubicina a la mitad y prescindiendo de la L-Asparaginasa y la Ciclofosfamida en los mayores de 50 años.
- Quimioterapia de consolidación similar a la del SHOP-99 de riesgo estándar, añadiendo VM-26  $150 \text{ mg/m}^2/12\text{h}$  durante dos días. En los pacientes mayores de 50 años se redujo la dosis de Metotrexate a la mitad.
- Quimioterapia de reinducción o consolidación-2, similar a la inducción con las siguientes modificaciones: una dosis menos de Vincristina, sustitución de Prednisona por Dexametasona, incremento a  $600 \text{ mg/m}^2$  de Ciclofosfamida y tres dosis menos de L-Asparaginasa.
- Quimioterapia de mantenimiento continuada con Metotrexate y Mercaptopurina hasta completar dos años de tratamiento y siete reinducciones mensuales con Vincristina, L-Asparaginasa, Prednisona y triple intratecal durante el primer año.

En el protocolo PETHEMA-LLA de Riesgo Intermedio-08 se incluyeron también aquellos pacientes con edad inferior a 30 años, leucocitos  $< 25 \times 10^9/L$  y ausencia de t(9;22)/BCR-ABL y t(4;11)/MLL. El tratamiento quimioterápico fue prácticamente igual al protocolo RI-96, con las siguientes pequeñas modificaciones:

- En la inducción se añadió una dosis de L-Asparraginasa y se redujo un tercio la dosis de Ciclofosfamida,
- En la consolidación se cambió el VM-26 por el VP-16,
- En la reinducción se añadieron dos dosis de L-Asparraginasa.
- Además, este protocolo incluyó la detección de pacientes con respuesta lenta al tratamiento, como son aquellos con un recuento de blastos  $\geq 10\%$  en el aspirado medular del día +14, aquellos con EMR  $\geq 0.05\%$  tras la consolidación o tras la cuarta reinducción del mantenimiento. Estos pacientes pasaron a recibir el protocolo de alto riesgo (AR-03). Del mismo modo, los pacientes con EMR  $< 0.01\%$  tras la cuarta reinducción del mantenimiento no recibieron más reinducciones.

#### **4.4.2.2 Tratamiento de los pacientes de alto riesgo**

Los pacientes con edad  $> 30$  años, leucocitos  $> 25 \times 10^9/L$  o presencia de t(9;22)/BCR-ABL o t(4;11)/MLL (o presencia de marcadores mieloides en el protocolo AR-93) fueron considerados de alto riesgo y se trataron con protocolos AR-93. Posteriormente, estos pacientes de alto riesgo y también aquellos que presentaron respuesta lenta al tratamiento de inducción ( $> 10\%$  blastos en el AMO del día +14 de inducción), ERM  $> 0,1\%$  al final de la inducción, o  $> 0,05\%$ , al final de la consolidación, fueron tratados con los protocolos AR-03 y AR-2011. En estos últimos, las LLA con t(9;22)/BCR-ABL se trataron con protocolos específicos que se describirán después.

El protocolo AR-93 intensificó el tratamiento con respecto al RI-96 con las siguientes modificaciones:

- En la inducción, se añadió una dosis adicional de L-Asparraginasa y se incrementó en 50% la dosis de Ciclofosfamida.
- En la consolidación, se acentuó el tratamiento quimioterápico, que se distribuyó en tres bloques, de manera similar a los bloques de consolidación A, B y C de la rama para pacientes de muy alto riesgo del protocolo SHOP99, con las siguientes modificaciones: en el bloque A se añadió Mercaptopurina  $100 \text{ mg/m}^2$  durante cinco días; en el bloque B se cambió la antraciclina (Daunorubicina en vez de Mitoxantrone) y se

incrementó la dosis de Ciclofosfamida a 200 mg/m<sup>2</sup>; en el bloque C se sustituyó el Tenipósido por Etopósido.

- A continuación se realizó TPH alogénico si se disponía de hermano HLA-idéntico y se realizó aleatorización para recibir TPH autólogo o quimioterapia de intensificación si no disponía de él. La intensificación consistió en los 3 bloques de consolidación, y se continuó el mantenimiento con Mercaptopurina y Metotrexate hasta completar dos años de tratamiento.

En el protocolo AR-03 se introdujo un nuevo marcador de riesgo, que fue la respuesta a la quimioterapia evaluada en el día +14. La quimioterapia de inducción consistió en Prednisona, Vincristina y Daunorubicina, y se añadió Ciclofosfamida y Ara-C en aquellos pacientes con respuesta lenta. La consolidación fue idéntica al protocolo AR-93. A continuación, se realizó TPH alogénico en aquellos pacientes con respuesta lenta a la quimioterapia y sin criterios de exclusión para TPH. En el resto de pacientes se siguió tratamiento de intensificación y mantenimiento, igual que en el protocolo AR-93.

En el protocolo AR-2011 se introdujo la EMR positiva como marcador de riesgo para la toma de decisiones terapéuticas (>0,1% al final de la inducción, o >0,01% al final de la consolidación). Se utilizó la Asparraginasa pegilada en los centros con disponibilidad. Con respecto al protocolo anterior, en la quimioterapia de inducción se redujo la dosis de antraciclínicos (reducción de Daunorubicina de 60 a 45 mg/m<sup>2</sup> y retirada de Mitoxantrone) y no se administró Citarabina. Los pacientes con EMR negativa continuaron con los tres bloques de consolidación, en los que se administraron sólo los citostáticos más relevantes: Dexametasona, Vincristina, Asparraginasa, y Metotrexate en los bloques 1 y 3 (con aumento de dosis a 5 g/m<sup>2</sup> en las LAL-T y reducción a la mitad en >50 años) y Citarabina en el bloque 2. Se realizó TPH alogénico en aquellos pacientes con EMR positiva y sin criterios de exclusión para TPH. En el resto de pacientes se siguió tratamiento de intensificación y mantenimiento, igual que en el protocolo AR-03.

#### **4.4.2.3 Tratamiento de los pacientes con LLA-Ph<sup>+</sup>**

A partir del año 2000, los pacientes con LLA con t(9;22)/BCR-ABL fueron tratados con protocolos específicos.

En el protocolo LLA-Ph 2000 se administró inducción similar a la del protocolo AR-03. Los pacientes con respuesta lenta a la inducción ( $\geq 5\%$  de blastos en el aspirado medular del día +14) recibieron Mitoxantrone  $12 \text{ mg/m}^2$  (3 dosis) y Citarabina  $1.000 \text{ mg/m}^2$  (4 dosis) en la segunda tanda de inducción. A continuación se administró la quimioterapia de consolidación 1 y 2, que fue similar a la del protocolo RI-96, pero con la mitad de dosis de Metotrexate en la consolidación 1 y eliminando la L-Asparaginasa en la consolidación 2. Tras la consolidación 1 ó 2 se realizó alo-TPH (a partir de donante emparentado o no relacionado) o autólogo (si no pudo efectuarse el alo-TPH).

En el protocolo LLA-Ph 2003, se asoció Imatinib (Glivec®) al protocolo LAL-Ph 2000, a dosis de  $400 \text{ mg/día}$  desde el diagnóstico y hasta después del TPH.

En el protocolo LLA-Ph 2008, se modificaron las siguientes pautas con respecto al protocolo anterior: la dosis de Imatinib fue de  $600 \text{ mg/día}$ , no se intensificó la inducción en los pacientes con respuesta lenta a la quimioterapia, en la consolidación 1 se duplicó la dosis de Citarabina y se sustituyó el Tenipósido por Etopósido. Se suprimió la consolidación 2. En los pacientes que recibieron TPH autólogo se administró Imatinib tras el TPH, junto con la Mercaptopurina y el Metotrexate de mantenimiento hasta completar dos años de tratamiento. En los pacientes que recibieron TPH alogénico se administró Imatinib cuando se evidenció recidiva molecular.

#### **4.4.2.4 Tratamiento de los pacientes mayores y/o frágiles**

Con anterioridad al año 2007 los pacientes con comorbilidades o edad avanzada recibieron tratamientos atenuados a juicio del médico prescriptor. En muchos casos, se empleó el protocolo LAL-RI96 por ser este protocolo menos agresivo que los empleados en la LLA de alto riesgo. En el año 2007 se empezó a tratar a los pacientes  $>55$  años con los protocolos LAL-07OLD, LAL-07FRA y LAL-07OPH.

El protocolo LAL-07OLD se basó en el LAL-RI96, con atenuación de las dosis que provocaban mayor toxicidad en la inducción (supresión de la L-Asparaginasa y de la Ciclofosfamida al final de la inducción). A continuación se administraron 6 bloques de consolidaciones cada 4-6 semanas, las pares consistentes en Metotrexate y L-Asparaginasa y las impares en Citarabina. En los pacientes  $>70$  años se redujo la

dosis de fármacos al 50%. Se completó el esquema de tratamiento con mantenimiento de Metotrexate semanal y Mercaptopurina oral diaria y reinducciones con Dexametasona y Vincristina adicional cada 2-3 meses, hasta completar un total de dos años de tratamiento.

En aquellos pacientes considerados “frágiles” (índice de comorbilidad de Charlson >3) se indicó el protocolo LAL-07FRA, que consistió en una inducción atenuada con administración exclusiva de Vincristina y Dexametasona, seguida de un dos años de mantenimiento con Metotrexate y Mercaptopurina, con pequeñas reinducciones trimestrales de Vincristina y Dexametasona el primer año.

El protocolo LAL-07OPH, indicado en pacientes > 55 años con LLA y t(9;22)/BCR-ABL, consistió en la adición de Imatinib al protocolo LAL-07FRA seguido de un tercer año de Imatinib en monoterapia. En los casos de intolerancia o progresión molecular con Imatinib, se administró Dasatinib.

#### 4.5. Definiciones

- *Respuesta lenta al tratamiento de inducción*: Presencia de  $\geq 10\%$  blastos en el examen morfológico convencional del aspirado medular al día 14 del tratamiento de inducción. En los casos pediátricos, tratados con los protocolos SHOP, el umbral fue  $\geq 5\%$  blastos.
- *Respuesta estándar al tratamiento de inducción*: Presencia de  $< 10\%$  blastos en el examen morfológico convencional del aspirado medular al día 14 del tratamiento de inducción. En los casos con médula hipocelular o acelular al día 14 se consideraron como respuesta estándar. En los casos pediátricos, tratados con los protocolos SHOP, el umbral fue  $< 5\%$  blastos.
- *Remisión completa (RC)*: Desaparición de las manifestaciones clínicas atribuibles a la LLA, Hb  $> 10$  g/dL, granulocitos  $> 1,5 \times 10^9/L$ , plaquetas  $> 150 \times 10^9/L$  y médula ósea normocelular, con menos de un 5% de blastos y sin blastos en el LCR.
- *Resistencia*: Persistencia de  $> 5\%$  de blastos en el mielograma del día +35 (o posterior).
- *Recaída*: Reaparición de la enfermedad después de haber alcanzado RC.

- *Supervivencia libre de recaída (SLR)*: Representa la probabilidad de estar sin leucemia en un momento determinado. Se calcula desde que el paciente alcanza RC hasta que se documenta la reaparición de la enfermedad según los criterios previamente descritos.
- *Supervivencia global (SG)*: Hace referencia a la probabilidad de estar vivo en un determinado momento. Se calcula desde la fecha de diagnóstico de la leucemia hasta la fecha de la última visita o hasta la muerte del paciente, sea ésta por la causa que sea y con independencia del estado de la enfermedad.
- *Incidencia acumulada de recaída (cumulative incidence of relapse, CIR)*: Se calculó desde la obtención de la RC hasta la recaída de la enfermedad. Como evento competitivo se consideró la muerte en RC.

#### 4.6. Análisis estadístico

En primer lugar se realizó un análisis estadístico descriptivo de la serie. Los resultados se expresaron como porcentajes en las variables categóricas y como medianas (extremos) para las variables continuas. El estudio de la comparación de la distribución de las variables en los distintos subgrupos de pacientes se realizó mediante el test de t-student cuando se estudiaban variables continuas y Chi-cuadrado de Pearson para las variables categóricas. Se incluyeron en el estudio datos demográficos básicos (edad y sexo), parámetros hematológicos (nivel de hemoglobina, recuento de leucocitos, y plaquetas, porcentaje de blastos en médula ósea), parámetros clínicos (cifra de creatinina al diagnóstico, elevación de la LDH) y respuesta al tratamiento. También se estudiaron otros datos clínicos en los que se pudo disponer de información en menos del 90% de los pacientes [presencia de masa mediastínica (n= 85; 25%), hepatomegalia (n= 224; 65%), esplenomegalia (n= 225; 66%), adenopatías (n= 225; 66%) o infiltración del SNC (n= 273; 80%)]. Dada su relevancia en la patología a estudio, se han mantenido en los análisis de asociaciones y univariantes.

La estimación de la SG y SLR se realizó mediante el método de Kaplan-Meier (Kaplan, 1958) y para comparaciones, las pruebas de log-rank (Mantel, 1966). La probabilidad de recaída se calculó mediante los métodos de Kaplan-Meier y el método

de incidencia acumulativa (riesgo competitivo, Gooley TA *et al.*, 1999). Para el análisis de la CIR, se consideró evento competitivo la muerte sin recaída.

El análisis de supervivencia se completó con un análisis multivariante mediante un modelo de riesgos proporcionales (regresión múltiple) de Cox (Cox, 1972) o el método de Fine and Gray para la incidencia acumulativa (Fine y Gray, 1999). Todas las variables con un valor de P inferior a 0,1 en el análisis univariante fueron trasladadas al análisis multivariante. Las variables en las que el número de casos perdidos era mayor al 10% fueron excluidas del estudio multivariante.

En todos los casos el nivel de significación estadística se estableció con un valor de P inferior a 0,05. Todos los estudios estadísticos se llevaron a cabo con el paquete estadístico SPSS en su versión 20.0 y el lenguaje y entorno de programación R con el programa EZRv1.3 de "The Comprehensive R Archive Network (CRAN)" con el paquete "RcmdrPlugin.EZR" (Kanda, 2012).

## **5.RESULTADOS**



### 5.1. Características generales de la serie

Se incluyeron un total de 342 pacientes, 168 niños y 174 adultos. El número de pacientes incluidos según el centro hospitalario está detallado en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Relación de pacientes incluidos en el estudio y periodo de diagnóstico según el centro de referencia.

| Centro de diagnóstico                                    | n          | Período de diagnóstico |
|--|------------|------------------------|
| <b>Pacientes pediátricos (n= 168)</b>                    |            |                        |
| Hospital Universitario y Politécnico La Fe (Valencia)    | 104        | 2003 - 2009            |
| Hospital Clínico Universitario (Valencia)                | 56         | 2000 - 2009            |
| Hospital Universitario Central de Asturias               | 8          | 2009 - 2012            |
| <b>Pacientes adultos (n= 174)</b>                        |            |                        |
| Hospital Universitario y Politécnico La Fe (Valencia)    | 81         | 1999 - 2012            |
| Hospital Clínico Universitario (Valencia)                | 24         | 1993 - 2010            |
| Hospital Universitario Doctor Peset (Valencia)           | 8          | 2003 - 2010            |
| Hospital General Universitario (Alicante)                | 17         | 2007 - 2009            |
| Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (Badalona)   | 11         | 2007 - 2010            |
| Hospital General Universitario Morales Meseguer (Murcia) | 21         | 2007 - 2012            |
| Hospital Universitario Central de Asturias               | 12         | 2009 - 2013            |
| <b>Total</b>   | <b>342</b> | <b>1993 - 2013</b>     |

#### 5.1.1. Características demográficas y clínicas

Las características principales de la serie se recogen en la Tabla 10, donde además se han especificado los pacientes con datos disponibles para cada una de las variables.

**Tabla 10.** Principales características demográficas y clínicas de la serie global.

| <b>Características</b>                | <b>Pacientes<br/>n= 342 (%)</b> |
|---------------------------------------|---------------------------------|
| <b>Sexo</b>                           | 342 (100)                       |
| masculino                             | 193 (56)                        |
| <b>Edad (años)</b>                    | 342 (100)                       |
| mediana                               | 15                              |
| rango                                 | 0,3 - 85                        |
| <b>Grupos de edad</b>                 | 342 (100)                       |
| ≤ 1 año                               | 8 (2)                           |
| > 1 y < 10 años                       | 139 (41)                        |
| ≥ 10 y < 14 años                      | 21 (6)                          |
| ≥ 14 y < 31 años                      | 66 (19)                         |
| ≥ 31 y < 65 años                      | 87 (26)                         |
| ≥ 65 años                             | 21 (6)                          |
| <b>Leucocitos (x10<sup>9</sup>/L)</b> | 340 (99)                        |
| mediana                               | 11,8                            |
| rango                                 | 0,2 - 675                       |
| <b>Hemoglobina g/dL</b>               | 333 (97)                        |
| mediana                               | 8,6                             |
| rango                                 | 3,5 - 16,8                      |
| <b>Plaquetas (x10<sup>9</sup>/L)</b>  | 332 (97)                        |
| mediana                               | 50                              |
| rango                                 | 0 - 504                         |
| <b>Blastos en MO (%)</b>              | 313 (92)                        |
| mediana                               | 92                              |
| rango                                 | 20 - 100                        |
| <b>Creatinina (mg/dL)</b>             | 325 (95)                        |
| mediana                               | 0,60                            |
| rango                                 | 0,04 - 7,53                     |
| <b>LDH (UI/L)</b>                     | 320 (94)                        |
| elevada                               | 250 (77)                        |
| <b>Ácido úrico</b>                    | 282 (82)                        |
| elevado                               | 50 (18)                         |
| <b>Infiltración del SNC</b>           | 273 (80)                        |
| presente                              | 8 (2)                           |
| <b>Masa mediastínica</b>              | 85 (25)                         |
| presente                              | 10 (3)                          |
| <b>Adenopatías</b>                    | 225 (66)                        |
| presentes                             | 57 (17)                         |
| <b>Hepatomegalia</b>                  | 224 (65)                        |
| presente                              | 64 (19)                         |
| <b>Esplenomegalia</b>                 | 225 (66)                        |
| presente                              | 72 (21)                         |

Los pacientes de edad pediátrica presentaron características diferentes con respecto a los pacientes de edad adulta (¡Error! La autoreferencia al marcador no es válida.). Fundamentalmente, los pacientes pediátricos debutaron con mayor grado de anemia, mayor infiltración medular y hepatoesplenomegalia con más frecuencia. Por el contrario, los pacientes adultos presentaron insuficiencia renal con mayor frecuencia.

**Tabla 11.** Comparación de las variables estudiadas en los pacientes de edad pediátrica o adulta.

|                                  | Niños<br>n= 168 (%) | Adultos<br>n= 174 (%) | P                 |
|----------------------------------|---------------------|-----------------------|-------------------|
| Sexo                             |                     |                       |                   |
| masculino                        | 100 (60)            | 93 (53)               | 0,143             |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L) | 47,7                | 40,7                  | 0,463             |
| > 10                             | 88 (52)             | 94 (55)               | 0,378             |
| > 30                             | 44 (26)             | 50 (29)               | 0,319             |
| > 100                            | 19 (11)             | 19(11)                | 0,538             |
| Hemoglobina (g/dL)               | 8,1                 | 9,4                   | <b>&lt; 0,001</b> |
| < 8                              | 88 (52)             | 50 (30)               | <b>&lt; 0,001</b> |
| < 10                             | 127 (76)            | 101 (61)              | <b>0,003</b>      |
| < 12                             | 153 (91)            | 133 (81)              | <b>0,005</b>      |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L)  | 84                  | 88                    | 0,632             |
| < 50                             | 81 (48)             | 88 (53)               | 0,221             |
| < 75                             | 56 (33)             | 67 (41)               | 0,111             |
| < 100                            | 46 (27)             | 53 (30)               | 0,332             |
| Blastos en MO (%)                | 91                  | 82                    | <b>&lt; 0,001</b> |
| > 50                             | 148 (98)            | 146 (90)              | <b>0,003</b>      |
| > 75                             | 138 (91)            | 125 (77)              | <b>&lt; 0,001</b> |
| > 90                             | 100 (66)            | 70 (43)               | <b>&lt; 0,001</b> |
| Creatinina (mg/dL)               | 0,47                | 0,98                  | <b>&lt; 0,001</b> |
| ≥ 1,2 mg/dL                      | 3 (2)               | 23 (14)               | <b>&lt; 0,001</b> |
| LDH elevada                      | 127 (80)            | 123 (75)              | 0,180             |
| Ácido úrico elevado              | 23 (46)             | 27 (54)               | 0,360             |
| Infiltración del SNC             | 3 (3)               | 5 (3)                 | 0,553             |
| Masa mediastínica                | 0 (0)               | 10 (12)               | 0,684             |
| Adenopatías                      | 9 (15)              | 48(29)                | 0,058             |
| Hepatomegalia                    | 33 (56)             | 31 (19)               | <b>&lt; 0,001</b> |
| Esplenomegalia                   | 35 (59)             | 37 (22)               | <b>&lt; 0,001</b> |

### 5.1.2. Inmunofenotipo

Según la clasificación EGIL, 292 (85%) de los casos fueron de línea B y 42 (12%) de línea T. La clasificación inmunológica de la serie se detalla en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Clasificación de los casos estudiados según sus características inmunofenotípicas.

| Inmunofenotipo         | n (%)           |
|------------------------|-----------------|
| <b>Fenotipo B</b>      | <b>292 (85)</b> |
| Pro-B o B nula         | 35 (10)         |
| B común                | 200 (58)        |
| Pre-B                  | 57 (17)         |
| B sin definir          | 3 (1)           |
| <b>Fenotipo T</b>      | <b>42 (12)</b>  |
| Pro-T (prelimocito)    | 4 (1)           |
| Pre-T (supracortical)  | 10 (3)          |
| T cortical (común)     | 21 (6)          |
| T madura               | 5 (2)           |
| T sin definir          | 2 (0,6)         |
| Fenotipo no disponible | 5 (2)           |

Las asociaciones encontradas entre el inmunofenotipo B o T de las leucemias y las diferentes características clínico-biológicas al diagnóstico se detallan en la Tabla 13. En resumen, los pacientes con inmunofenotipo T mostraron con mayor frecuencia las siguientes características: sexo masculino, edad en rango de adolescente y adulto (>10 y < 65 años), hiperleucocitosis, menor grado de infiltración medular, anemia y trombopenia, mayor frecuencia de afectación renal y presentación linfomatosa (con adenopatías y masa mediastínica).

**Tabla 13.** Comparación de las distintas variables en los pacientes con inmunofenotipo de célula B o T en la serie global.

|             | Fenotipo B<br>n= 292 (%) | Fenotipo T<br>n= 42 (%) | P            |
|-------------|--------------------------|-------------------------|--------------|
| Sexo        |                          |                         |              |
| masculino   | 160 (54)                 | 31 (74)                 | <b>0,012</b> |
| Edad (años) | 22,5                     | 23,1                    | 0,846        |
| ≤ 1         | 5 (71)                   | 2 (29)                  | 0,213        |
| > 1 y < 10  | 131 (94)                 | 8 (6)                   | <b>0,001</b> |
| ≥ 10 y < 14 | 15 (75)                  | 5 (25)                  | 0,088        |

|                                  | Fenotipo B<br>n= 292 (%) | Fenotipo T<br>n= 42 (%) | P                 |
|----------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------|
| ≥ 14 y < 31                      | 54 (82)                  | 12 (18)                 | 0,090             |
| ≥ 31 y < 65                      | 69 (82)                  | 15 (18)                 | 0,065             |
| ≥ 65                             | 21 (100)                 | 0 (0)                   | 0,056             |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L) | 36,1                     | 88,1                    | <b>0,015</b>      |
| > 10                             | 145 (50)                 | 32 (76)                 | <b>0,001</b>      |
| > 30                             | 71 (24)                  | 18 (43)                 | <b>0,011</b>      |
| > 100                            | 25 (8)                   | 11 (26)                 | <b>0,002</b>      |
| Hemoglobina (g/dL)               | 8,4                      | 11,4                    | <b>&lt; 0,001</b> |
| < 8                              | 133 (46)                 | 3 (7)                   | <b>&lt; 0,001</b> |
| < 10                             | 215 (75)                 | 10 (24)                 | <b>&lt; 0,001</b> |
| < 12                             | 262 (92)                 | 21 (50)                 | <b>&lt; 0,001</b> |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L)  | 77                       | 143                     | <b>0,002</b>      |
| < 50                             | 147 (52)                 | 14 (33)                 | <b>0,020</b>      |
| < 75                             | 188 (66)                 | 18 (43)                 | <b>0,004</b>      |
| < 100                            | 211 (74)                 | 22 (52)                 | <b>0,004</b>      |
| Blastos en MO (%)                | 87                       | 79                      | <b>0,036</b>      |
| > 50                             | 260 (95)                 | 31 (86)                 | <b>0,045</b>      |
| > 75                             | 233 (85)                 | 27 (75)                 | 0,092             |
| > 90                             | 154 (56)                 | 14 (39)                 | 0,071             |
| Creatinina (mg/dL)               | 0,70                     | 0,81                    | 0,142             |
| ≥ 1,2 mg/dL                      | 17 (6)                   | 8 (20)                  | <b>0,006</b>      |
| LDH elevada                      | 215 (77)                 | 30 (75)                 | 0,439             |
| Ácido úrico elevado              | 38 (16)                  | 12 (34)                 | <b>0,014</b>      |
| Infiltración del SNC             | 6 (3)                    | 2 (5)                   | 0,303             |
| Masa mediastínica                | 1 (1)                    | 9 (56)                  | <b>&lt; 0,001</b> |
| Adenopatías                      | 39 (20)                  | 17 (56)                 | <b>&lt; 0,001</b> |
| Hepatomegalia                    | 13 (43)                  | 50 (26)                 | 0,089             |
| Esplenomegalia                   | 61 (32)                  | 10 (33)                 | 0,516             |

### 5.1.3. Respuesta al tratamiento y supervivencia

De los 342 pacientes, 340 fueron tratados con quimioterapia intensiva según los protocolos vigentes en el momento del diagnóstico en cada centro. Dos pacientes no recibieron tratamiento por edad avanzada (> 80 años) y no han sido incluidos en el análisis de supervivencia. El resto de pacientes recibieron tratamiento con intención curativa, tal y como se detalla en la Tabla 14, y han sido incluidos en dicho análisis. La gran mayoría de ellos fueron tratados con protocolos de las sociedades SHOP (n= 171; 51%) y PETHEMA (n= 161; 47 %). La mediana de seguimiento de los pacientes vivos fue de 44,8 meses (rango 1 – 221).

**Tabla 14.** Esquemas de tratamiento empleados en los pacientes.

| <b>Protocolos de tratamiento</b> | <b>n</b>   | <b>%</b>   |
|----------------------------------|------------|------------|
| <b>Protocolos SHOP</b>           | <b>171</b> | <b>51</b>  |
| SHOP-LLA-LACTANTES-2002          | 6          | 2          |
| SHOP-LLA-99                      | 69         | 20         |
| SHOP-LLA-2005                    | 96         | 28         |
| <b>Protocolos PETHEMA</b>        | <b>161</b> | <b>47</b>  |
| PETHEMA LLA-RI-92                | 1          | 0          |
| PETHEMA LLA-RI-96                | 13         | 4          |
| PETHEMA LAL-RI-08                | 16         | 5          |
| PETHEMA LLA-AR-93                | 16         | 5          |
| PETHEMA LLA-AR-03                | 75         | 22         |
| PETHEMA LLA-AR-2011              | 1          | 0          |
| PETHEMA LLA-PHI-2000             | 1          | 0          |
| PETHEMA LLA-PHI-2003             | 4          | 1          |
| PETHEMA LLA-PHI-2008             | 17         | 5          |
| PETHEMA LLA-OLD-2007             | 8          | 3          |
| PETHEMA LLA-OLD-PHI-2007         | 6          | 2          |
| PETHEMA LLA FRAIL-2007           | 4          | 1          |
| <b>Otros protocolos</b>          | <b>7</b>   | <b>2</b>   |
| MD ANDERSON-HyperCVAD/AM         | 7          | 2          |
| <b>Total</b>                     | <b>340</b> | <b>100</b> |

Los pacientes mayores de 65 años fueron tratados con los protocolos específicos para pacientes “frágiles” o con los protocolos vigentes en el momento con dosis atenuadas de algunos fármacos en los casos en los que fue considerado necesario a criterio médico individualizado. Tres pacientes de 15 años recibieron tratamiento según esquema pediátrico SHOP-LLA-2005.

Se analizó la influencia de cada una de las variables demográficas y clínicas con el resultado tras la quimioterapia de inducción (Tabla 15) y la supervivencia (Tabla 16). La edad al diagnóstico influyó notablemente en el pronóstico de los pacientes, de manera que tanto la SLR y la SG fueron en descenso en cada grupo de edad, con la excepción de los pacientes lactantes (< 1 año) que mostraron supervivencias similares a la media global. Los niños de entre 1 y 10 años fueron los que mostraron mejor pronóstico, con supervivencia global >90% a los tres años, ausencia de mortalidad en la inducción, bajo porcentaje de respuesta lenta a la quimioterapia (10%) y la menor tasa de recidiva (19%).

Tabla 15. Respuesta a la quimioterapia de inducción de la serie global.

| Serie global                          | Respuesta lenta*<br>(n=298) |                   | Resistencia<br>(n= 323) |              | Mortalidad<br>(n= 340) |                  |
|---------------------------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------------|--------------|------------------------|------------------|
|                                       | n (%)                       | P                 | n (%)                   | P            | n (%)                  | P                |
| Serie global (n=340)                  | 67 (22)                     |                   | 15 (5)                  |              | 17 (5)                 |                  |
| <b>Sexo</b>                           |                             |                   |                         |              |                        |                  |
| masculino                             | 40 (23)                     | 0,816             |                         | 0,89         | 9 (5)                  | 0,998            |
| <b>Edad (años)</b>                    |                             |                   |                         |              |                        |                  |
| ≤ 1                                   | 2 (29)                      | 0,492             | 1 (12)                  | 0,319        | 0 (0)                  | 0,661            |
| > 1 y < 10                            | 14 (10)                     | <b>&lt; 0,001</b> | 0 (0)                   | <b>0,002</b> | 2 (1)                  | <b>0,024</b>     |
| ≥ 10 y < 14                           | 6 (30)                      | 0,279             | 1 (5)                   | 0,625        | 1 (5)                  | 0,717            |
| ≥ 14 y < 31                           | 19 (36)                     | <b>0,010</b>      | 2 (3)                   | 0,412        | 3 (5)                  | 0,574            |
| ≥ 31 y < 65                           | 23 (31)                     | 0,071             | 9 (11)                  | <b>0,005</b> | 3 (3)                  | 0,327            |
| ≥ 65                                  | 3 (33)                      | 0,328             | 2 (18)                  | 0,087        | 8(42)                  | <b>&lt;0,001</b> |
| <b>Leucocitos (x10<sup>9</sup>/L)</b> |                             |                   |                         |              |                        |                  |
| > 10                                  | 36 (22)                     | 0,480             | 7 (4)                   | 0,952        | 6(3)                   | 0,288            |
| > 30                                  | 23 (27)                     | 0,118             | 4 (4)                   | 0,573        | 4 (4)                  | 0,571            |
| > 100                                 | 9 (27)                      | 0,33              | 2 (5)                   | 0,509        | 0 (0)                  | 0,181            |
| <b>Hemoglobina (g/dL)</b>             |                             |                   |                         |              |                        |                  |
| < 8                                   | 18 (14)                     | <b>0,012</b>      | 4(3)                    | 0,635        | 9 (6)                  | 0,342            |
| < 10                                  | 39 (19)                     | 0,146             | 9 (4)                   | 0,602        | 13 (6)                 | 0,317            |
| < 12                                  | 52(21)                      | 0,144             | 12 (4)                  | 0,532        | 14 (5)                 | 0,612            |
| <b>Plaquetas (x10<sup>9</sup>/L)</b>  |                             |                   |                         |              |                        |                  |
| < 50                                  | 29 (20)                     | 0,290             | 7 (4)                   | 0,474        | 9 (5)                  | 0,593            |
| < 75                                  | 40 (22)                     | 0,533             | 9 (5)                   | 0,420        | 12 (6)                 | 0,356            |
| < 100                                 | 45 (22)                     | 0,503             | 9 (4)                   | 0,354        | 13 (5)                 | 0,387            |
| <b>Blastos en MO (%)</b>              |                             |                   |                         |              |                        |                  |
| > 50                                  | 57 (22)                     | 0,375             | 10 (4)                  | 0,132        | 13 (4)                 | 0,212            |
| > 75                                  | 53 (23)                     | 0,321             | 10 (4)                  | 0,463        | 11(4)                  | 0,338            |
| > 90                                  | 33 (21)                     | 0,876             | 5 (3)                   | 0,465        | 4 (2)                  | <b>0,049</b>     |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                | 7 (30)                      | 0,207             | 1 (4)                   | 0,595        | 3 (12)                 | 0,099            |
| LDH elevada                           | 48 (21)                     | 0,221             | 9 (4)                   | 0,180        | 9 (4)                  | 0,337            |
| Ácido úrico elevado                   | 12 (27)                     | 0,411             | 3 (6)                   | 0,236        | 4 (8)                  | 0,154            |
| Infiltración del SNC                  | 3 (50)                      | 0,159             | 0 (0)                   | 0,636        | 1 (12)                 | 0,328            |
| Masa mediastínica                     | 4 (50)                      | 0,258             | 1 (10)                  | 0,349        | 0 (0)                  | 0,341            |
| Adenopatías                           | 20 (41)                     | <b>0,024</b>      | 5(9)                    | 0,185        | 1 (2)                  | 0,112            |
| Hepatomegalia                         | 13 (23)                     | 0,159             | 5(8)                    | 0,469        | 1 (2)                  | 0,071            |
| Esplenomegalia                        | 18 (28)                     | 0,525             | 5 (7)                   | 0,358        | 2 (3)                  | 0,204            |
| <b>Inmunofenotipo</b>                 |                             |                   |                         |              |                        |                  |
| Fenotipo B                            | 49 (20)                     | <b>0,017</b>      | 10 (4)                  | 0,084        | 14 (5)                 | 0,545            |
| Pro-B o B nula                        | 4 (15)                      | 0,229             | 1 (3)                   | 0,428        | 4 (12)                 | 0,077            |
| B común                               | 35 (20)                     | 0,170             | 6 (3)                   | 0,547        | 10 (5)                 | 0,594            |
| Pre-B                                 | 8 (15)                      | 0,167             | 2 (3)                   | 0,102        | 0 (0)                  | 0,059            |
| Fenotipo T                            | 14 (38)                     | <b>0,017</b>      | 4 (10)                  | 0,084        | 2 (5)                  | 0,545            |
| Pre-T (supracortical)                 | 4 (44)                      | 0,119             | 2 (22)                  | 0,060        | 1(10)                  | 0,368            |
| T cortical (común)                    | 4 (24)                      | 0,557             | 1 (5)                   | 0,622        | 0 (0)                  | 0,375            |
| T madura                              | 4 (80)                      | <b>0,010</b>      | 0 (0)                   | 0,774        | 1 (20)                 | 0,204            |

\* ≥ 10% blastos en MO en el día +14 de quimioterapia.

**Tabla 16.** Análisis de supervivencia y riesgo de recaída en la serie global.

| Serie global                          | SG a los 3 años<br>(n= 340) |                   | SLR a los 3 años<br>(n= 308 ) |                   | CIR a los 3 años<br>(n= 308) |                   |
|---------------------------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|------------------------------|-------------------|
|                                       | %                           | <i>P</i>          | %                             | <i>P</i>          | %                            | <i>P</i>          |
| Serie global (n=340)                  | 66                          |                   | 69                            |                   | 29                           |                   |
| <b>Sexo</b>                           |                             |                   |                               |                   |                              |                   |
| masculino                             | 69                          | 0,259             | 70                            | 0,819             | 27                           | 0,928             |
| <b>Edad (años)</b>                    |                             |                   |                               |                   |                              |                   |
| ≤ 1                                   | 63                          | 0,419             | 64                            | 0,91              | 28                           | 0,862             |
| > 1 y < 10                            | 91                          | <b>&lt; 0,001</b> | 82                            | <b>&lt; 0,001</b> | 17                           | <b>&lt; 0,001</b> |
| ≥ 10 y < 14                           | 66                          | 0,620             | 72                            | 0,83              | 24                           | 0,756             |
| ≥ 14 y < 31                           | 61                          | 0,136             | 62                            | 0,082             | 34                           | 0,070             |
| ≥ 31 y < 65                           | 38                          | <b>&lt; 0,001</b> | 54                            | <b>&lt; 0,001</b> | 38                           | <b>0,003</b>      |
| ≥ 65                                  | 7                           | <b>&lt; 0,001</b> | 22                            | <b>&lt; 0,001</b> | 31                           | 0,903             |
| <b>Leucocitos (x10<sup>9</sup>/L)</b> |                             |                   |                               |                   |                              |                   |
| > 10                                  | 64                          | 0,802             | 67                            | 0,182             | 29                           | 0,279             |
| > 30                                  | 57                          | 0,138             | 61                            | <b>0,046</b>      | 35                           | 0,080             |
| > 100                                 | 55                          | <b>0,050</b>      | 49                            | <b>0,003</b>      | 42                           | <b>0,018</b>      |
| <b>Hemoglobina (g/dL)</b>             |                             |                   |                               |                   |                              |                   |
| < 8                                   | 79                          | <b>0,007</b>      | 80                            | <b>0,022</b>      | 34                           | <b>0,049</b>      |
| < 10                                  | 71                          | 0,085             | 72                            | <b>0,048</b>      | 35                           | 0,060             |
| < 12                                  | 69                          | 0,174             | 72                            | <b>0,019</b>      | 41                           | <b>0,017</b>      |
| <b>Plaquetas (x10<sup>9</sup>/L)</b>  |                             |                   |                               |                   |                              |                   |
| < 50                                  | 66                          | 0,590             | 72                            | 0,488             | 27                           | 0,664             |
| < 75                                  | 65                          | 0,178             | 70                            | 0,815             | 27                           | 0,565             |
| < 100                                 | 64                          | 0,113             | 68                            | 0,177             | 25                           | 0,377             |
| <b>Blastos en MO (%)</b>              |                             |                   |                               |                   |                              |                   |
| > 50                                  | 66                          | 0,13              | 70                            | 0,905             | 25                           | 0,576             |
| > 75                                  | 66                          | 0,417             | 70                            | 0,600             | 26                           | 0,686             |
| > 90                                  | 72                          | <b>0,006</b>      | 73                            | 0,307             | 28                           | <b>0,216</b>      |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                | 69                          | 0,055             | 73                            | 0,855             | 27                           | 0,910             |
| LDH elevada                           | 65                          | 0,777             | 67                            | 0,510             | 28                           | 0,759             |
| Ácido úrico elevado                   | 44                          | <b>&lt; 0,001</b> | 54                            | <b>0,006</b>      | 37                           | <b>0,066</b>      |
| Infiltración del SNC                  | 75                          | 0,643             | 85                            | 0,727             | 13                           | 0,823             |
| Masa mediastínica                     | 30                          | 0,464             | 22                            | <b>0,010</b>      | 80                           | <b>&lt; 0,001</b> |
| Adenopatías                           | 58                          | 0,810             | 55                            | 0,533             | 44                           | <b>0,013</b>      |
| Hepatomegalia                         | 66                          | 0,098             | 68                            | 0,438             | 31                           | 0,269             |
| Esplenomegalia                        | 66                          | 0,069             | 70                            | 0,092             | 28                           | 0,807             |
| <b>Inmunofenotipo</b>                 |                             |                   |                               |                   |                              |                   |
| Fenotipo B                            | 70                          | <b>0,021</b>      | 71                            | <b>0,019</b>      | 41                           | <b>0,040</b>      |
| Pro-B o B nula                        | 54                          | 0,109             | 69                            | 0,840             | 25                           | 0,736             |
| B común                               | 74                          | <b>0,018</b>      | 75                            | <b>0,047</b>      | 22                           | <b>0,041</b>      |
| Pre-B                                 | 66                          | 0,589             | 63                            | 0,871             | 35                           | 0,520             |
| Fenotipo T                            | 49                          | <b>0,021</b>      | 56                            | <b>0,019</b>      | 54                           | <b>0,040</b>      |
| Pre-T (supracortical)                 | 33                          | 0,074             | 43                            | <b>0,009</b>      | n.a.                         | <b>0,002</b>      |
| T cortical (común)                    | 53                          | 0,474             | 60                            | 0,174             | 39                           | 0,107             |
| T madura                              | 60                          | 0,586             | 67                            | 0,928             | 20                           | 0,654             |

Los pacientes pediátricos mayores de 10 años mostraron peor SG que los menores de 10 años y similar a los adultos jóvenes ( $> 14$  y  $\leq 30$  años) en la comparación por pares ( $P= 0,023$  y  $0,315$ , respectivamente). Aunque la tendencia fue la misma para la SLR, las diferencias no alcanzaron significación estadística en la comparación por pares ( $P= 0,225$  y  $0,392$ , respectivamente). También aumentó la tasa de recidiva (26%) y de respuesta lenta a la quimioterapia (30%) con respecto a los niños  $< 10$  años y fue más parecida a la de los adultos jóvenes. Los pacientes  $> 65$  años mostraron una alta tasa de mortalidad en la inducción (42%), con supervivencias inferiores al 10% a los tres años y una tasa de recidiva del 45%. Los pacientes con hiperleucocitosis también mostraron SG y SLR inferiores, especialmente aquellos con leucocitosis  $> 100 \times 10^9/L$ . Aquellos con mayor grado de anemia y de infiltración blástica mostraron mejor pronóstico, probablemente por la asociación de estas variables a la edad pediátrica. Con respecto al inmunofenotipo, los pacientes con fenotipo B común fueron los que mostraron el mejor pronóstico. Los pacientes con LLA de estirpe T tuvieron en general peor SG y también SLR.

Dado que los pacientes recibieron distintos tratamientos a lo largo del periodo de estudio y en diferentes centros hospitalarios, se analizaron las posibles diferencias que pudieran existir en cuanto a supervivencia tanto en niños como en adultos. No se observaron diferencias significativas en la supervivencia de los pacientes pediátricos tratados con los protocolos SHOP-99 vs. SHOP-05 (SG a los tres años 88% vs. 87%,  $P= 0,655$ ; SLR a los tres años 82% vs. 76%,  $P= 0,449$ ). Tampoco en los pacientes adultos diagnosticados antes y después de 2008 (SG a los tres años 44% vs. 42%,  $P= 0,909$ ; SLR a los tres años 55% vs. 54%;  $P= 0,894$ ). No hubo diferencias significativas según el centro donde se diagnosticó y se trató el paciente.

#### **5.1.4. Pacientes con estudio genético**

En 245 (71%) pacientes se pudieron realizar todos las determinaciones planteadas en este trabajo. En el resto de pacientes se realizaron sólo los estudios para los que se disponía muestra, tal y como se refleja en la Tabla 17.

**Tabla 17.** Número de pacientes estudiados para cada una de las determinaciones planteadas en este estudio.

| <b>Pacientes con muestra disponible</b> | <b>N= 342 (%)</b> |
|---|-------------------|
| Estudio citogenético                    | 332 (97)          |
| Estudio de microdeleciones              | 294 (86)          |
| Estudio de expresión                    | 319 (93)          |
| Estudio de mutaciones                   | 267 (78)          |
| Todos los estudios                      | 245 (72)          |

## 5.2. Alteraciones citogenéticas

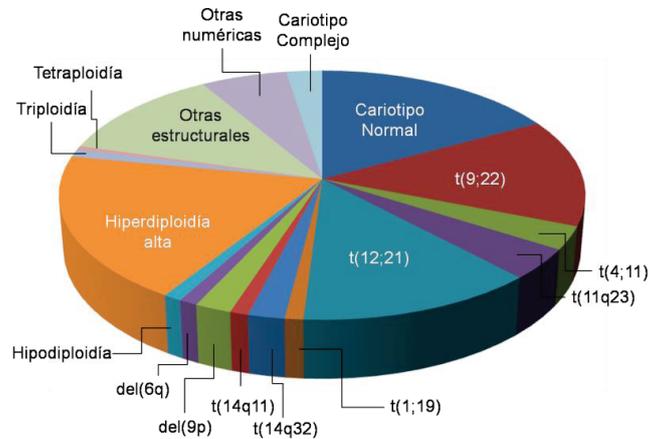
Se realizó estudio citogenético en 332 (97%) pacientes. Dicho resultado fue no valorable en 86 (26%) de los casos por ausencia de mitosis en las células cultivadas u obtención de metafases de mala calidad y/o número insuficiente para su análisis. Sin embargo, 14 de ellos mostraron un resultado positivo para los reordenamientos estudiados mediante FISH o técnicas de biología molecular, por lo que un total de 260 (78%) casos mostraron un resultado valorable tras el estudio citogenético (Tabla 18).

**Tabla 18.** Número de casos con estudio citogenético realizado mediante cariotipo y técnicas adicionales de FISH y PCR con sondas específicas.

| <b>Análisis citogenético realizado</b>      | <b>n=332 (%)</b> |
|---|------------------|
| Cariotipo valorable                         | 246 (74)         |
| Cariotipo no valorable                      | 86 (26)          |
| Estudio mediante FISH o RT-PCR no realizado | 39               |
| Estudio mediante FISH o RT-PCR negativo     | 33               |
| Estudio mediante FISH o RT-PCR positivo     | 14               |

\*RT-PCR para los reordenamientos de *MLL*, *BCR-ABL* y *ETV6-RUNX1*.

Dicho resultado se clasificó según las alteraciones encontradas en las categorías que se muestran en la Tabla 19 y se representan en la Figura 9.



**Figura 9.** Representación proporcional de los hallazgos citogenéticos en los pacientes estudiados.

**Tabla 19.** Resultado del estudio citogenético realizado en los pacientes de la serie global con muestra disponible para ello.

| Hallazgos citogenéticos                           | n=260 (%)      |
|---|----------------|
| Cariotipo normal                                  | 44 (17)        |
| <b>Translocaciones recurrentes</b>                | <b>99 (38)</b> |
| t(9;22)(q34;q11)                                  | 36 (14)        |
| t(4;11)(q21;q23)                                  | 9 (3)          |
| Otras t(11q23)                                    | 10 (4)         |
| t(12;21)(p13;q22)                                 | 34 (13)        |
| t(1;19)(q23;p13)                                  | 3 (1)          |
| t(14)(q32)  | 5 (2)          |
| t(14)(q11)  | 2 (1)          |
| <b>Otras alteraciones estructurales conocidas</b> | <b>7 (3)</b>   |
| del(9p)   | 5 (2)          |
| del(6q)   | 2 (1)          |
| <b>Aneuploidías</b>                               | <b>56 (21)</b> |
| Haploidía (< 30 cromosomas)                       | 0 (0)          |
| Hipodiploidía (30 - 41 cromosomas)                | 2 (1)          |
| Hiperdiploidía alta (> 50 cromosomas)             | 50 (19)        |
| Triploidía (65 - 80 cromosomas)                   | 3 (1)          |
| Tetraploidía (> 81 cromosomas)                    | 1 (0,5)        |
| <b>Otras anomalías</b>                            | <b>54 (21)</b> |
| Otras alteraciones estructurales                  | 32 (12)        |
| Otras alteraciones numéricas                      | 16 (6)         |
| Cariotipo complejo (≥ 3 alteraciones)             | 6 (2,5)        |

El hallazgo más frecuente fue la hiperdiploidía alta (19%), seguida del cariotipo normal (17%), la t(9;22) (14%) y la t(12;21) (13%). Un 18% de los casos mostró alteraciones no encuadrables en ninguna categoría (32 y 16 casos con otras alteraciones estructurales y numéricas).

### 5.2.1. Alteraciones estructurales

Las alteraciones estructurales más frecuentes fueron las translocaciones (n=124), estando 99 (80%) de ellas entre las translocaciones recurrentes especificadas en la Tabla 19.

La t(9;22)/BCR-ABL, la t(12;21)/ETV6-RUNX1 y los reordenamientos de 11q23/MLL se detectaron en algunos casos tan sólo mediante FISH o RT-PCR, bien por ser reordenamientos crípticos en el cariotipo (3%, 78% y 6% de los casos, respectivamente) o por ser casos con cariotipo no valorable (Tabla 20).

**Tabla 20.** Métodos de detección de los reordenamientos clásicos y número de casos crípticos en el cariotipo.

| Reordenamientos clásicos                  | t(9;22)<br>BCR-ABL | t(11q23)<br>MLL | t(12;21)<br>ETV6-RUNX1 |
|---|--------------------|-----------------|------------------------|
| <b>Método de detección</b>                |                    |                 |                        |
| Cariotipo                                 | 31                 | 15              | 6                      |
| FISH                                      | 4                  | 4               | 25                     |
| RT-PCR                                    | 1                  | 0               | 3                      |
| <b>Casos detectados por FISH o RT-PCR</b> |                    |                 |                        |
| Alteración críptica por cariotipo         | 1                  | 1               | 22                     |
| Cariotipo no valorable                    | 4                  | 3               | 6                      |
| <b>Total</b>                              | <b>36</b>          | <b>19</b>       | <b>34</b>              |

Los reordenamientos de 11q23/MLL distintos de la t(4;11) no pudieron ser identificados en la mayoría de casos, con la excepción de dos de ellos con la t(11;19)(q23;p13.3)/MLL-ENL.

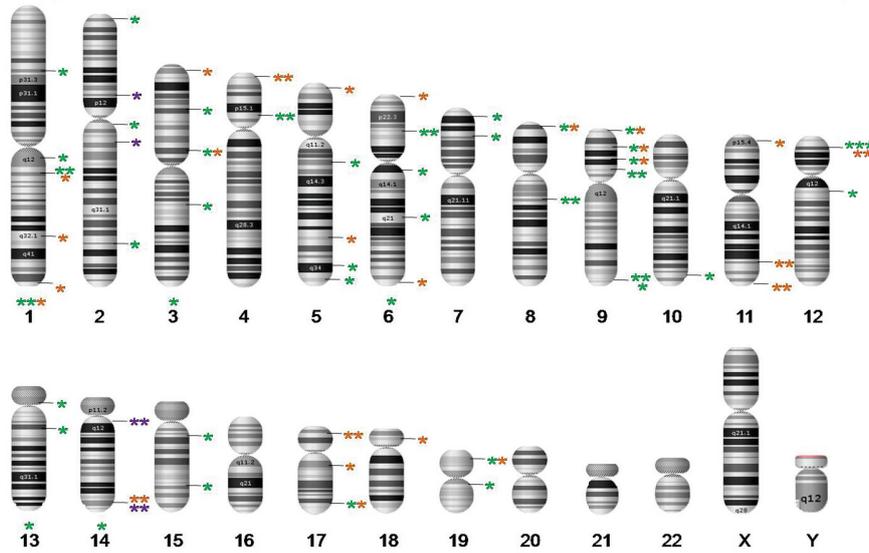
El resto de translocaciones (n= 25; 20%) fueron translocaciones no recurrentes y los puntos de rotura se han señalado en la Figura 10. Cabe destacar que tres de ellas afectaron a 9q34, donde se ubica el gen *ABL* [dos casos con t(1;9)(q21;q34) y uno con t(7;9) (p15;q34)]. Uno de los casos con la t(1;9) formaba parte de un subclón

evolucionado de la clásica t(9;22), pero en los otros dos se descartó el reordenamiento BCR-ABL mediante FISH y/o RT-PCR.

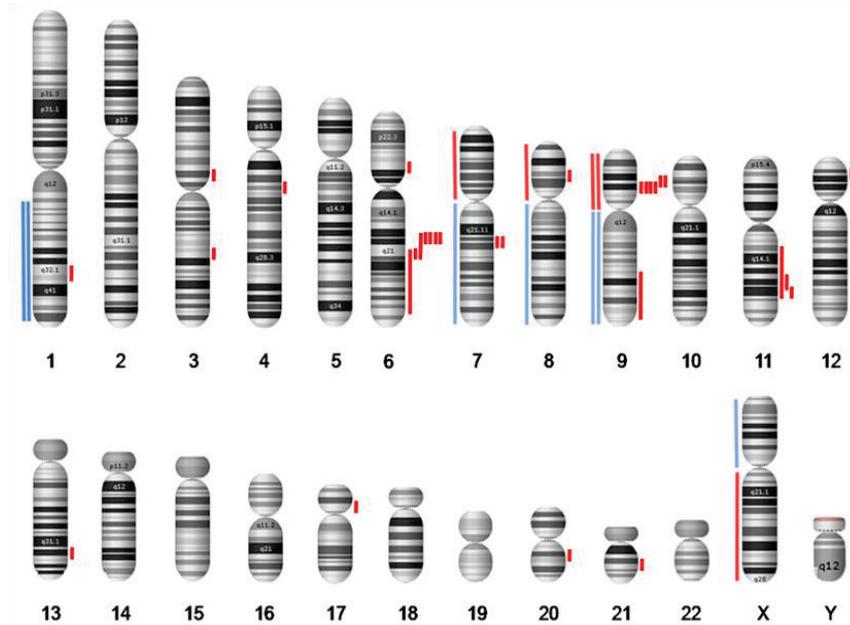
Otras alteraciones estructurales encontradas fueron:

- Presencia de material cromosómico adicional de origen desconocido (*add*, n=31): se encontraron dos casos en la región 14q32/*IGH*, por lo que fueron clasificados como t(14)(q32) aunque la pareja translocada no se pudiera identificar. En otros dos casos, la adición de material se localizó en 11q23, pero la implicación de *MLL* se descartó por FISH.
- Inversiones (*inv*, n=3): se encontraron una inversión pericentromérica del cromosoma 2 y dos casos con inv(14)(q11q32) de inmunofenotipo B. Estos últimos fueron clasificados dentro de los reordenamientos de 14q32.
- Isocromosomas (*i*, n=5): se encontraron dos casos con i(9q), un caso con i(Xp), un caso con i(7q) y un caso con i(8q).
- Deleciones (*del*, n=31): las más frecuentes fueron las del(6q) (n= 7), seguidas de las del(9p) (n= 6) y las del(11q) (n= 3). Dos de ellas finalizaron en 11q23: en una de ellas [del11(q13-23)] se halló 11q23/*MLL* reordenado y en la otra no.
- Duplicaciones (*dup*, n=2): ambas implicando el brazo largo del cromosoma 1 (q21-q44).

En la Figura 10 se representan, junto con las translocaciones, los casos de *add* e *inv*, ya que todas ellas conllevan reordenamientos génicos, mientras que en la Figura 11 se representan las *dup* y *del*, así como los isocromosomas, ya que suponen ganancia o pérdida de material cromosómico.



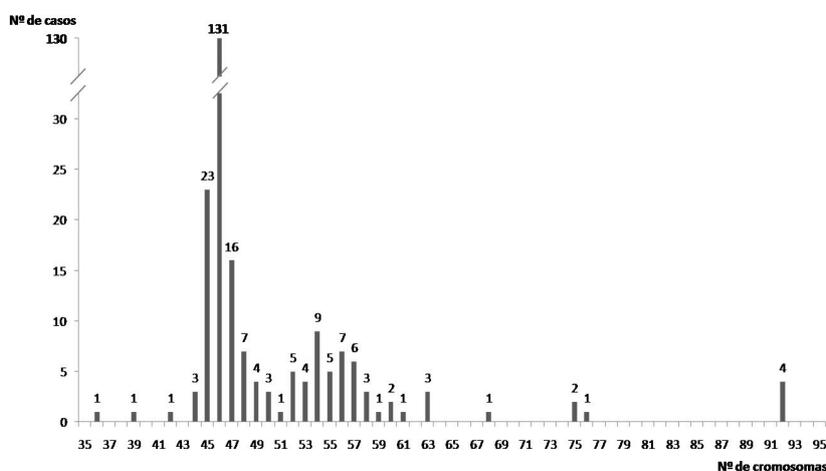
**Figura 10.** Puntos de rotura cromosómica de los reordenamientos no establecidos hallados en la serie global. Los asteriscos verdes muestran los puntos de rotura de las translocaciones (n=50 puntos de rotura de 25 translocaciones). Los naranjas, los puntos donde se halló material adicional no identificable (*add*; n=31). Los morados, los puntos de corte de la inversión (*inv*; n=3). En seis casos no se especificó la banda implicada en el reordenamiento, por lo que el asterisco se ha colocado en la base del cromosoma.



**Figura 11.** Localización de las ganancias y pérdidas de material observadas en el estudio del cariotipo de la serie global. En rojo aparecen las deleciones a la derecha del cromosoma afectado. En azul y a la izquierda, las ganancias. Los cinco isocromosomas hallados en la serie se han representado a la izquierda del cromosoma implicado como una barra en rojo en el brazo perdido y en azul en el brazo duplicado.

### 5.2.2. Alteraciones numéricas

La distribución de los pacientes según el número de cromosomas mostró una agrupación bimodal: una mayoría de pacientes en torno a los 45 -48 cromosomas y otro grupo de pacientes en torno a 55 cromosomas (Figura 12). La hiperdiploidía alta fue la alteración numérica más frecuente (n=50; 19%).

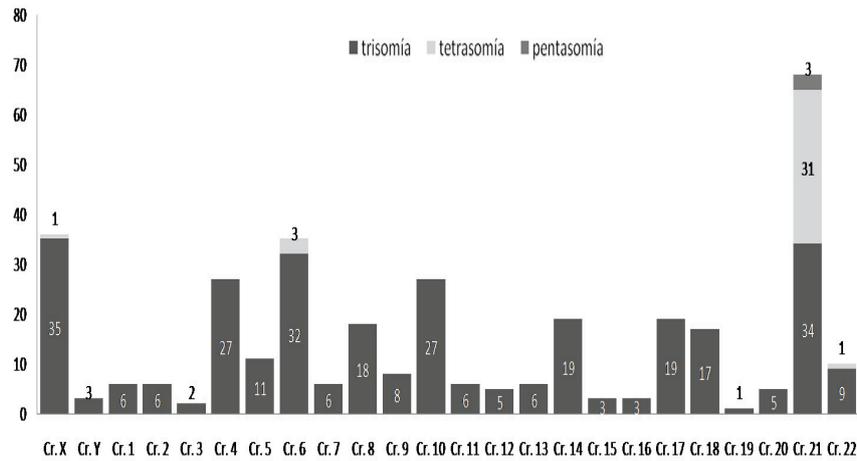


**Figura 12.** Representación del número de cromosomas hallado en los casos con citogenética valorable de la serie global. Agrupación bimodal con mayoría de cariotipos en torno a la diploidía (46 cromosomas) y la hiperdiploidía alta (55 cromosomas).

No se halló ningún caso con cariotipo haploide. En cuanto al resto de aneuploidías, también fueron poco frecuentes (Tabla 19), si bien algunos casos más se clasificaron en base a las translocaciones recurrentes coexistentes.

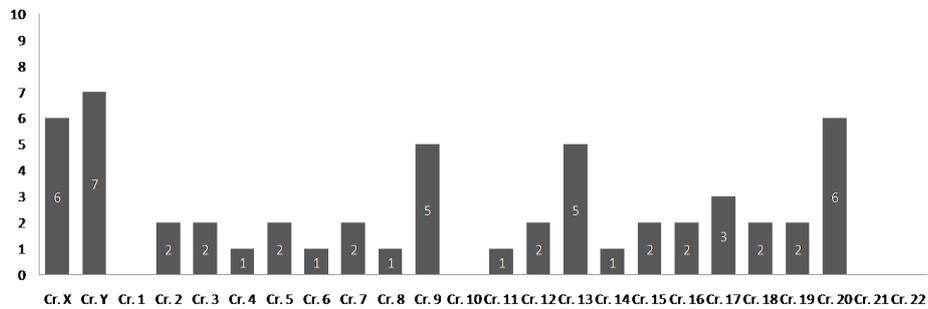
El grupo con otras alteraciones numéricas incluyó aquellos con número de cromosomas comprendido entre 42 – 45 (hipodiploidía alta,  $n= 5$ ), 47 – 49 (hiperdiploidía baja,  $n= 9$ ) y también aquellos con ganancias y pérdidas cromosómicas pero con número final de cromosomas de 46 (pseudodiploidías,  $n= 2$ ). Dieciséis pacientes más asociaron otras alteraciones estructurales no recurrentes [hipodiploidía alta ( $n= 7$ ), hiperdiploidía baja ( $n= 7$ ) y pseudodiploidía ( $n= 2$ )] y se clasificaron en dicho grupo. Once (4,2%) de estos pacientes cumplieron los criterios de cariotipo monosómico.

Los cromosomas más frecuentemente ganados fueron X, 4, 6, 8, 10, 14, 17, 18 y 21 (Figura 13). El cromosoma 21 se halló en tetraploidía en 31 casos y en pentaploidía en tres casos.



**Figura 13.** Cromosomas adicionales hallados en el estudio de citogenética convencional en la serie global.

Las pérdidas cromosómicas fueron menos frecuentes que las ganancias ( $n=55$  vs. 347, respectivamente). Los cromosomas monosómicos hallados con mayor frecuencia fueron los sexuales junto con el 9, el 13 y el 20 (Figura 14).



**Figura 14.** Monosomías halladas en el estudio de citogenética convencional en la serie global.

### 5.2.3. Concurrencia de alteraciones

Algunos pacientes presentaron de manera concurrente más de una de las alteraciones enumeradas en la Tabla 19. En la Figura 15 se muestra el número de casos de cada una de las concurrencias encontradas, pero ninguna mostró una asociación estadísticamente significativa. Se han indicado aquellos casos con  $\geq 5$

alteraciones y presencia de translocaciones recurrentes en la línea de cariotipo complejo, motivo por el cual aparecen sombreados.

P= n.s.

|                |         |         |       |          |         |       |       |         |         |        |           |       |         |          |      |    |  |  |  |
|----------------|---------|---------|-------|----------|---------|-------|-------|---------|---------|--------|-----------|-------|---------|----------|------|----|--|--|--|
| Cariotipo      | t(9;22) |         |       |          |         |       |       |         |         |        |           |       |         |          |      |    |  |  |  |
| t(9;22)        | 36      | t(4;11) |       |          |         |       |       |         |         |        |           |       |         |          |      |    |  |  |  |
| t(4;11)        | 0       | 9       | 11q23 |          |         |       |       |         |         |        |           |       |         |          |      |    |  |  |  |
| t(11q23)       | 0       | 0       | 8     | t(12;21) |         |       |       |         |         |        |           |       |         |          |      |    |  |  |  |
| t(12;21)       | 0       | 0       | 1     | 34       | t(1;19) |       |       |         |         |        |           |       |         |          |      |    |  |  |  |
| t(1;19)        | 0       | 0       | 0     | 0        | 3       | 14q32 |       |         |         |        |           |       |         |          |      |    |  |  |  |
| t(14q32)       | 1       | 0       | 0     | 0        | 0       | 5     | 14q11 |         |         |        |           |       |         |          |      |    |  |  |  |
| t(14q11)       | 0       | 0       | 0     | 0        | 0       | 2     | 2     | del(9p) |         |        |           |       |         |          |      |    |  |  |  |
| del(9p)        | 0       | 0       | 0     | 0        | 1       | 0     | 0     | 7*      | del(6q) |        |           |       |         |          |      |    |  |  |  |
| del(6q)        | 0       | 0       | 0     | 2        | 0       | 0     | 1     | 0       | 2       | Hipod. |           |       |         |          |      |    |  |  |  |
| Hipod.         | 0       | 0       | 0     | 0        | 0       | 1     | 0     | 0       | 0       | 2      | Hiperdip. |       |         |          |      |    |  |  |  |
| Hiperdip.      | 3       | 0       | 0     | 4        | 0       | 0     | 0     | 0       | 0       | 0      | 50        | Trip. |         |          |      |    |  |  |  |
| Trip.          | 0       | 0       | 0     | 1        | 0       | 0     | 0     | 0       | 0       | 0      | 0         | 3     | Tetrap. |          |      |    |  |  |  |
| Tetrap.        | 0       | 0       | 1     | 2        | 0       | 0     | 0     | 0       | 0       | 0      | 0         | 0     | 1       | Estruct. |      |    |  |  |  |
| Otras estruct. | 5       | 2       | 0     | 6        | 1       | 2     | 0     | 1       | 0       | 0      | 7         | 1     | 0       | 36       | Num. |    |  |  |  |
| Otras num.     | 4       | 0       | 1     | 3        | 0       | 0     | 0     | 1       | 1       | 0      | 0         | 0     | 0       | 12       | 15   | CC |  |  |  |
| CC             | 1       | 0       | 0     | 3        | 0       | 0     | 0     | 2       | 0       | 0      | 0         | 0     | 0       | 0        | 0    | 6  |  |  |  |

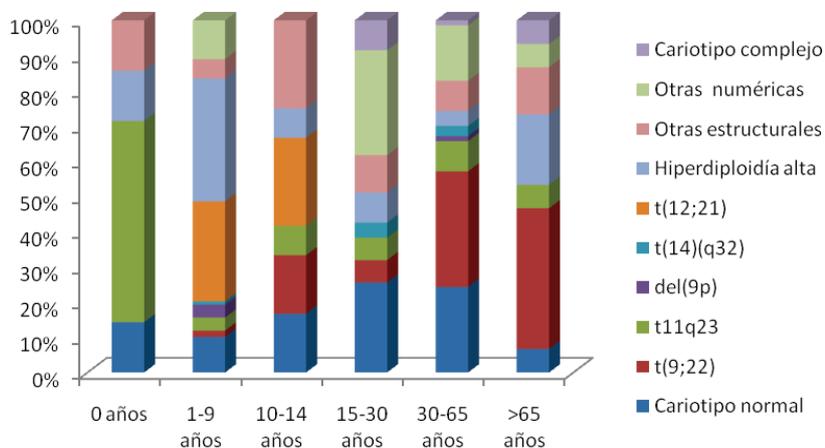
**Figura 15.** Concurrencia de distintas alteraciones en un mismo caso. Hipod: hipodiploidía; Hiperdip: hiperdiploidía; Trip: Triploidía; Tetrap: tetraploidía; Estruct: otras alteraciones estructurales; Num: otras alteraciones numéricas; CC: cariotipo complejo.

#### 5.2.4. Asociación de cada uno de los hallazgos citogenéticos con las características clínico-biológicas

Se compararon las variables estudiadas con cada subgrupo citogenético que albergó un mínimo de cinco pacientes, y se encuentran recogidas en las Tablas Suplementarias (Tabla Suplementaria 1 -Tabla Suplementaria 12). A continuación se detallan los hallazgos más relevantes.

Los pacientes con fenotipo T mostraron un cariotipo no valorable con mayor frecuencia que el resto de pacientes (38% vs. 19% respectivamente;  $P= 0,007$ ).

La edad de los pacientes se asoció significativamente con los hallazgos citogenéticos (Figura 16).



**Figura 16.** Representación proporcional de los hallazgos citogenéticos según la edad.

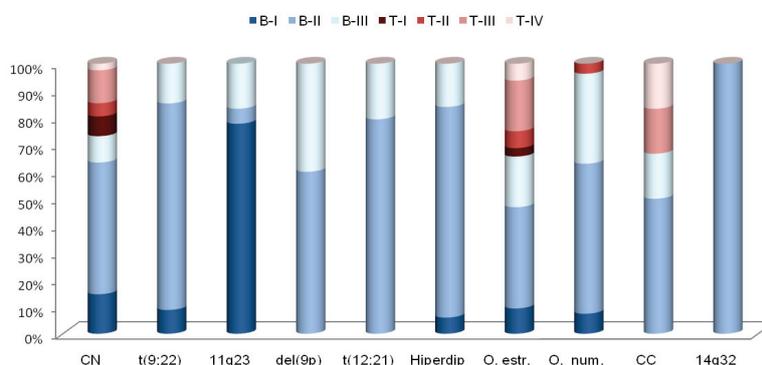
Las asociaciones con mayor significación estadística fueron:

- los reordenamientos de *MLL* y la edad < 1 año (57% vs. 1% en el resto de pacientes;  $P= 0,001$ ),
- la  $t(9;22)$  que aumentó de manera proporcional a la edad (3% de los casos pediátricos, 6% de los adultos jóvenes, 33% de los adultos de 30 a 65 años y 40% de los mayores de 65 años;  $P< 0,001$ ),
- la  $t(12;21)$  y la hiperdiploidía alta, que se presentaron de manera exclusiva o predominante en la edad pediátrica (100% y 76%, respectivamente;  $P< 0,001$ ) y
- el cariotipo complejo que sólo se dio en adultos y predominantemente adultos jóvenes (67% de los casos,  $P= 0,011$ ).

Otras diferencias relevantes fueron la mayor frecuencia de hiperleucocitosis en los pacientes con reordenamientos de *MLL* (58% con leucocitos  $>100 \times 10^9/L$  vs. 8% en el resto de pacientes, respectivamente;  $P< 0,001$ ) y también mayor frecuencia de hepatoesplenomegalia (60% vs. 27% en el resto de pacientes;  $P= 0,009$ ).

El fenotipo inmunológico se asoció a algunas alteraciones citogenéticas concretas (Figura 17).

## Resultados



**Figura 17.** Representación proporcional de la frecuencia del subtipo inmunofenotípico de cada uno de los hallazgos citogenéticos. CN: cariotipo normal; Hiperdip: Hiperdiploidía alta; O. estr.: Otras alteraciones estructurales; O. num.: Otras alteraciones numéricas; CC: cariotipo complejo.

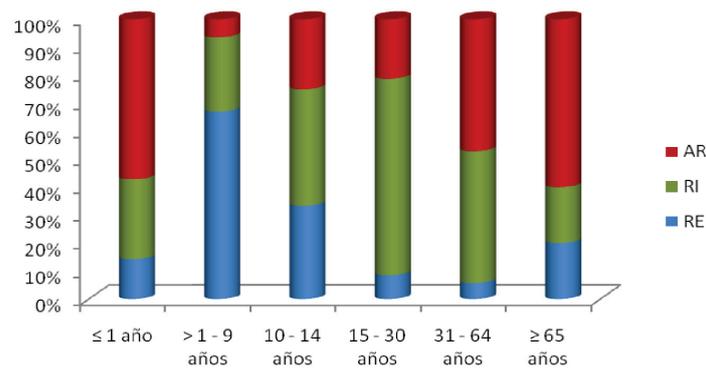
En concreto, el 42% de los pacientes con fenotipo T mostraron un cariotipo normal, frente al 14% de los pacientes con fenotipo B ( $P= 0,001$ ). Los pacientes con t(9;22), t(12;21), hiperdiploidía alta y reordenamientos de 14q32 mostraron con mayor frecuencia fenotipo B-común (72%, 78%, 79% y 100%;  $P= 0,045$ ,  $P= 0,005$ ,  $P= 0,003$  y  $P= 0,064$ , respectivamente). Por el contrario, los pacientes con reordenamientos de 11q23 mostraron fenotipo pro-B en un 74% de los casos vs. 7% del resto de pacientes ( $P< 0,001$ ).

Los pacientes con t(12;21) y con hiperdiploidía alta destacaron claramente por su mejor pronóstico (para la t(12;21), SG a los 3 años del 100% y SLR del 93% vs. 60% y 66% en el resto de pacientes;  $P< 0,001$  y  $P=0,005$ , respectivamente; y para la hiperdiploidía alta, SG a los 3 años del 80% y SLR del 87% vs. 63% y 66% en el resto de pacientes;  $P= 0,034$  y  $P=0,017$ , respectivamente). Los pacientes con t(9;22) mostraron peores supervivencias en comparación con el resto de pacientes (SG a los 3 años del 42% y SLR del 47% vs. 70% y 71% en el resto de pacientes;  $P= 0,009$  y  $P=0,017$ , respectivamente), pero no con respecto a los pacientes con cariotipo normal (67% y 63%;  $P= 0,233$  y  $P= 0,320$ , respectivamente). Los pacientes con t(4;11) mostraron peor pronóstico que el resto de pacientes (SG a los 3 años del 33% y SLR del 50% vs. 66% y 70%;  $P= 0,020$  y  $P= 0,093$ , respectivamente), y no lo hicieron los demás pacientes con otros reordenamientos de *MLL* (89% y 63%;  $P= 0,219$  y  $P= 0,447$ , respectivamente). Los pacientes con cariotipo complejo también mostraron una

SG a los 3 años inferior al resto de pacientes (20% vs. 67%, respectivamente;  $P=0,003$ ).

### 5.2.5. Grupos de riesgo citogenético

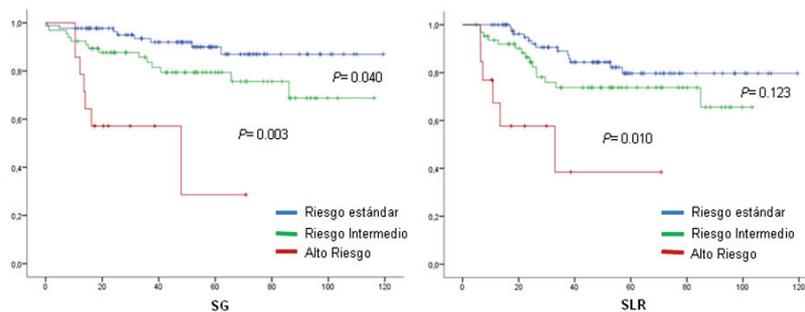
En función de las alteraciones encontradas, los pacientes se estratificaron en grupos de riesgo citogenético. La edad influyó significativamente en la presencia de algunas alteraciones y la proporción de pacientes con alteraciones consideradas de alto riesgo, riesgo intermedio o riesgo estándar (Figura 18). La edad también influyó notablemente en la supervivencia y la respuesta al tratamiento (Tabla 15 y Tabla 16). Por ello, se emplearon estratificaciones diferentes para los pacientes en edad pediátrica y en edad adulta.



**Figura 18.** Relación de grupos de riesgo citogenético del MRC en función de la edad. AR: alto riesgo; RI: riesgo intermedio; RE: riesgo estándar. La única diferencia entre la estratificación de riesgo del grupo SHOP y del MRC es la asignación de riesgo estándar/favorable al cariotipo normal en el grupo SHOP y riesgo intermedio en el MRC.

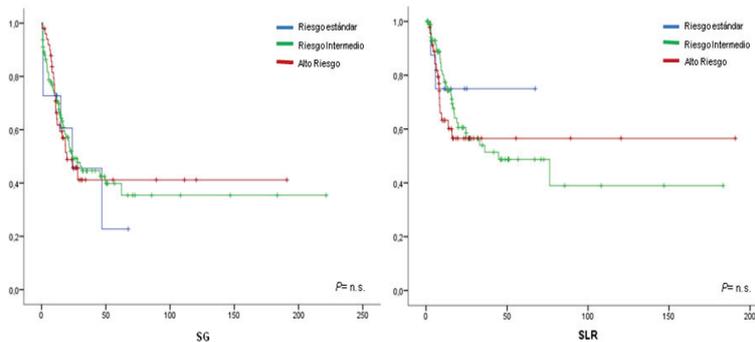
Para los pacientes pediátricos se utilizó la clasificación empleada por el grupo SHOP, especificada en la sección de Material y Métodos en la Tabla 8. Esta clasificación separó tres grupos de pacientes: los de riesgo estándar ( $n=88$ , 53%), los de riesgo intermedio ( $n=65$ , 39%) y los de alto riesgo ( $n=14$ , 8%). Los tres grupos mostraron diferencias para la supervivencia global (SG a los tres años 94%, 83% y

57%, respectivamente;  $P < 0,001$ ) y para la probabilidad de recaída (SLR a los tres años 89%, 73% y 39%, respectivamente;  $P < 0,001$ ) (Figura 19).



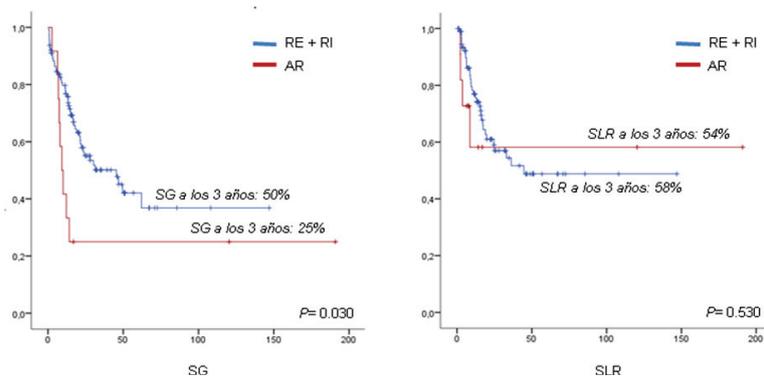
**Figura 19.** Curvas de supervivencia de los pacientes pediátricos según los grupos de riesgo citogenético del SHOP.

Para los pacientes en edad adulta se utilizó la clasificación propuesta por el MRC (Tabla 4), por ser esta la serie más amplia estudiada en la edad adulta. Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas entre los tres grupos (Figura 20), ni tampoco para el grupo de alto riesgo individualmente. Al seleccionar los pacientes adultos  $< 65$  años siguió sin reproducirse la estratificación pronóstica propuesta.



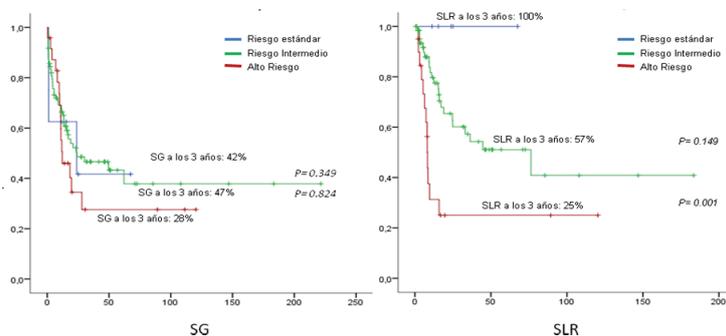
**Figura 20.** Curvas de supervivencia de los pacientes adultos según los grupos de riesgo citogenético del MRC. No se observaron diferencias estadísticamente significativas para ningunos de los grupos, ni en la SG ni en la SLR.

Al excluir a los pacientes con la t(9;22) y a los mayores de 65 años, sí se consiguió diferenciar al grupo de alto riesgo [t(4;11), hipodiploidía/casi tetraploidía y cariotipo complejo] del resto de pacientes (riesgo intermedio y estándar) para la SG (Figura 21). Sin embargo, tampoco en esta población se reprodujo la estratificación del MRC para la SLR (54% a los tres años en el grupo de riesgo estándar e intermedio vs. 58% en el de alto riesgo;  $P= 0,530$ ) o la CIR (33% vs. 40%, respectivamente;  $P= 0,641$ ).



**Figura 21.** Curvas de SG y SLR en los pacientes adultos <65 años con LLA Philadelphia negativa según los grupos de riesgo citogenético del MRC.

Cuando se testó esta estratificación en los pacientes que no recibieron un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos en primera remisión completa, sí se pudieron distinguir los diferentes grupos de riesgo para la SLR (100% vs. 57% vs. 25% de SLR a los 3 años para los pacientes de riesgo estándar vs. intermedio vs. alto;  $P= 0,001$ ) y CIR (0% vs. 33% vs. 70%, respectivamente;  $P= 0,002$ ), pero no para la SG (Figura 22).



**Figura 22.** Curvas de SLR y SG para los grupos de riesgo citogenético del MRC en los pacientes que no recibieron TPH en RC1.

### 5.3. Alteraciones en *IKZF1*

En todos los pacientes con muestra disponible se estudió la expresión (n=319, 93%), las deleciones intragénicas (n=294, 86%) y la presencia de mutaciones en el gen *IKZF1* (n=267, 78%), tal y como se muestra a continuación.

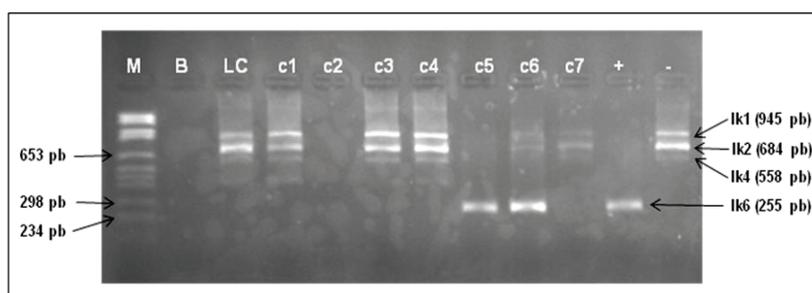
Además de los controles sanos pertinentes, también se estudió este gen en la línea celular RCH-ACV, de fenotipo pre-B y con la t(1;19)(q23;p13) y +8 en el estudio citogenético. El patrón de expresión de esta línea celular fue normal y no se hallaron ni deleciones intragénicas ni mutaciones.

#### 5.3.1. Patrón de isoformas

Se estudiaron un total de 319 (93%) pacientes. En ellos, se consiguieron discriminar con claridad las siguientes isoformas de *IKZF1* en el gel de agarosa: La isoforma Ik1, que genera una banda a la altura de 945pb con los cebadores utilizados; la isoforma Ik2, de 684pb; la isoforma Ik4, de 558pb y la isoforma más corta, Ik6, de 255pb, que de hallarse como isoforma predominante, se consideró patológica.

En algunos casos, la expresión de Ik6 se encontró junto con expresión tenue de las isoformas largas. Este hecho se ha relacionado con el porcentaje de blastos hallado en MO (Iacobucci, Blood 2008), por lo que se consideraron positivos aquellos casos con expresión mayoritaria de la isoforma Ik6, aunque pudieran apreciarse isoformas largas en escasa cuantía (Figura 23).

En 36 (11%) pacientes se encontró la expresión mayoritaria de la isoforma Ik6. En 3 (1%) casos se halló ausencia de la expresión de cualquier isoforma, pese a la correcta amplificación del gen control (*ABL*). En el resto de pacientes (280; 88%) se halló un patrón normal de coexpresión de isoformas con predominio claro de isoformas largas.



**Figura 23.** Gel de agarosa con los productos de PCR tras amplificación del cDNA con primers específicos para amplificar las diferentes isoformas del gen *IKZF1*. M: marcador de peso molecular; B: blanco, producto de PCR sin cDNA; LC: línea celular RCH-ACV que muestra un patrón de isoformas normal, con predominio de isoformas largas, c1, c3, c4 y c7: casos con expresión de isoformas normales; c2: caso con ausencia de expresión de *IKZF1*, que se correlacionó con delección homocigota del gen completo; c5 y c6: casos con expresión de la isoforma corta Ik6 de manera exclusiva o mayoritaria, respectivamente; +: control positivo; -: control negativo.

La expresión anómala de *IKZF1* se halló sólo en casos de fenotipo B y se asoció con la t(9;22) en el cariotipo [15 (43%) casos con la t(9;22) vs. 24 (9%) con resto de alteraciones;  $P < 0.001$ ]. Estos pacientes con expresión anómala de *IKZF1* se asociaron también a edad avanzada, además de presentar con mayor frecuencia una respuesta lenta al tratamiento de inducción y supervivencias más cortas (Tabla 21).

**Tabla 21.** Asociación de la expresión de isoformas de *IKZF1* con las variables estudiadas.

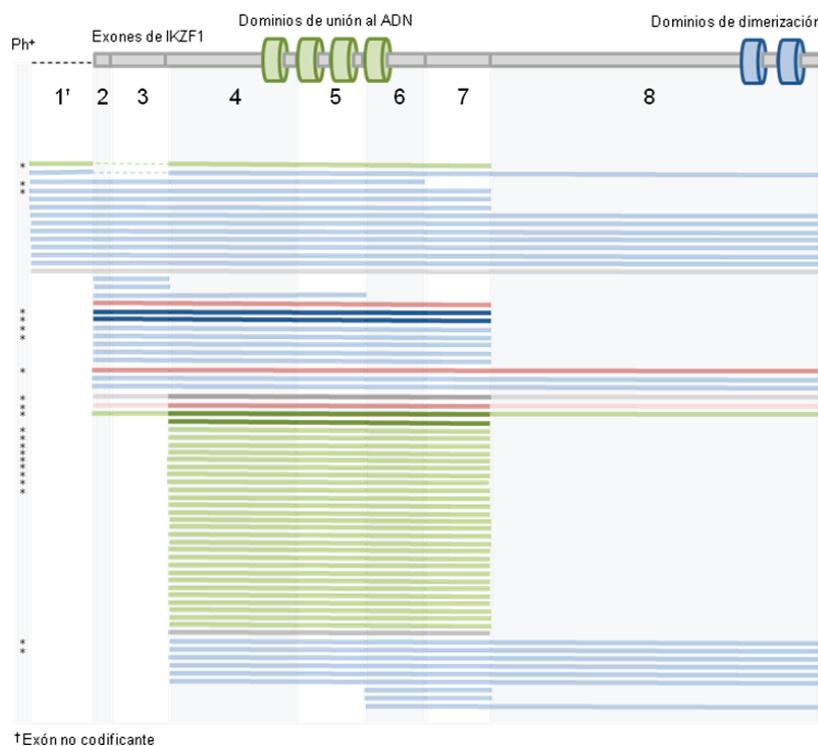
| Expresión del gen <i>IKZF1</i>      | Expresión anómala*<br>n (%) | Expresión normal n (%) | P                 |
|-------------------------------------|-----------------------------|------------------------|-------------------|
| n = 319                             | 39 (12)                     | 281 (88)               |                   |
| <b>Características demográficas</b> |                             |                        |                   |
| sexo masculino                      | 24 (63)                     | 157 (56)               | 0,499             |
| edad (años), media                  | 34                          | 21                     | <b>&lt; 0,001</b> |

| Expresión del gen IKZF1                      | Expresión anómala*<br>n (%) | Expresión normal n (%) | P                 |
|--|-----------------------------|------------------------|-------------------|
| ≤ 1 año                                      | 0 (0)                       | 7 (3)                  | 0,408             |
| > 1 - 9 años                                 | 4 (10)                      | 131 (46)               | <b>&lt; 0,001</b> |
| 10 - 14 años                                 | 3 (8)                       | 17 (6)                 | 0,434             |
| 15 - 30 años                                 | 13 (34)                     | 44 (16)                | <b>0,010</b>      |
| 31 - 64 años                                 | 12 (32)                     | 69 (24)                | 0,462             |
| ≥ 65 años                                    | 7 (18)                      | 12 (4)                 | <b>0,004</b>      |
| <b>Características clínico-biológicas</b>    |                             |                        |                   |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L), media      | 58,2                        | 41,8                   | 0,278             |
| Hemoglobina (g/dL), media                    | 9,5                         | 8,7                    | 0,095             |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L), media       | 85                          | 86                     | 0,939             |
| Blastos en MO (%), media                     | 84                          | 87                     | 0,344             |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                       | 4 (11)                      | 19 (7)                 | 0,299             |
| Ácido úrico elevado                          | 8 (27)                      | 40 (17)                | 0,154             |
| LDH elevada                                  | 30 (79)                     | 205 (78)               | 0,857             |
| Infiltración del SNC                         | 0 (0)                       | 7 (3)                  | 0,359             |
| Masa mediastínica                            | 0 (0)                       | 5 (9)                  | 0,237             |
| Adenopatías                                  | 9 (28)                      | 39(22)                 | 0,635             |
| Hepatomegalia                                | 6 (19)                      | 52 (30)                | 0,137             |
| Esplenomegalia                               | 5 (16)                      | 60 (64)                | 0,057             |
| <b>Inmunofenotipo B</b>                      | 39 (100)                    | 240 (87)               | 0,006             |
| Pro-B o B nula                               | 5 (13)                      | 28 (10)                | <b>0,354</b>      |
| B común                                      | 22 (58)                     | 168 (60)               | 0,963             |
| Pre-B  | 9 (24)                      | 44 (16)                | 0,310             |
| <b>Citogenética</b>                          |                             |                        |                   |
| No valorable                                 | 6 (16)                      | 59 (21)                | 0,594             |
| Cariotipo Normal                             | 6 (16)                      | 35 (12)                | 0,359             |
| t(9;22)                                      | 15 (38)                     | 20 (7)                 | <b>&lt; 0,001</b> |
| t(11q23)                                     | 1 (3)                       | 17 (6)                 | 0,342             |
| t(12;21)                                     | 0 (0)                       | 33 (12)                | <b>0,012</b>      |
| Hiperdiploide                                | 4 (10)                      | 43 (15)                | 0,592             |
| Otras alt. numéricas                         | 2 (5)                       | 18 (6)                 | 0,566             |
| Otras alt. estructurales                     | 5 (16)                      | 30 (14)                | 0,496             |
| Cariotipo Complejo                           | 0 (0)                       | 6 (2)                  | 0,464             |
| <b>Respuesta al tratamiento de inducción</b> |                             |                        |                   |
| Respuesta lenta                              | 12 (39)                     | 51 (20)                | <b>0,023</b>      |
| Tasa de RC                                   | 32 (89)                     | 254 (96)               | 0,073             |
| Resistencia                                  | 4 (11)                      | 10 (4)                 | 0,073             |
| Mortalidad                                   | 3 (8)                       | 14 (5)                 | 0,349             |
| <b>Supervivencia</b>                         |                             |                        |                   |
| SG a los 3 años                              | 46%                         | 70%                    | <b>0,003</b>      |
| SLR a los 3 años                             | 47%                         | 73%                    | <b>0,026</b>      |
| CIR a los 3 años                             | 37%                         | 26%                    | 0,444             |

\*Expresión de Ik6 (n=36) o ausencia de expresión (n=3)

### 5.3.2. Deleciones intragénicas

Se estudiaron un total de 294 (86%) pacientes. Sesenta y nueve (24%) pacientes mostraron deleciones del gen *IKZF1*, siendo ocho de ellas (12%) homocigotas y el resto heterocigotas (Tabla 22 y Figura 24). Además, se hallaron 3 casos con ganancias correspondientes a casos con hiperdiploidía alta en el estudio del cariotipo (n=2) o cariotipo no valorable (n=1).



**Figura 24.** Representación gráfica de la estructura del gen *IKZF1* que muestra la extensión de cada una de las deleciones halladas en la serie global. El asterisco marca los casos con reordenamiento BCR-ABL. Las barras abarcan la extensión de la deleción en cada uno de los casos. En azul se representan los casos con expresión normal; en verde los casos con expresión de la isoforma *ik6* de manera mayoritaria; en rosa aquellas con ausencia de expresión; en gris aquellas sin datos de expresión. Además, se han coloreado en oscuro las deleciones homocigotas.

Se encontraron dos tipos de deleciones: las que abarcaron todos o prácticamente todos los exones del gen (más de cinco exones seguidos) (n=26; 38%) y las parciales, que comprendieron de dos a cinco exones contiguos (n=43, 62%). La deleción más frecuente fue la de los exones 4 al 7, que se halló en 30 (43%) casos (tres junto con deleción completa en el otro alelo y una con deleción discontinua del exón 1), seguida de ocho (12%) casos con deleción completa de todo el gen. Dos casos mostraron deleciones discontinuas (exones 1,4-7 y 1,4-8).

**Tabla 22.** Casos hallados con deleción en dos o más exones del gen.

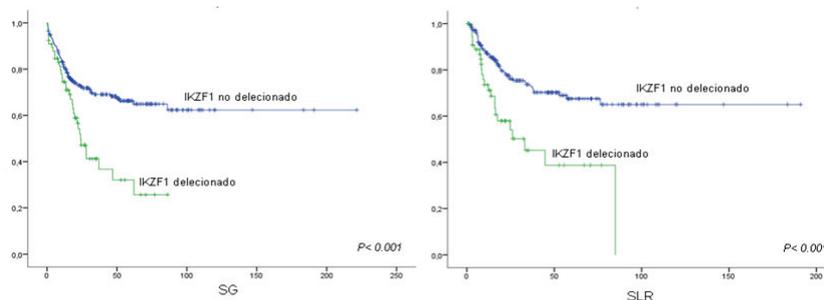
| Exones delecionados                          | Deleciones heterocigotas | Deleciones homocigotas | Total (%)  |
|--|--------------------------|------------------------|------------|
| <b>Deleciones completas o casi completas</b> |                          |                        |            |
| 1-8  | 8                        | 0                      | 12         |
| 1-7  | 3                        | 0                      | 4          |
| 1-6  | 1                        | 0                      | 1          |
| 2-8  | 3                        | 1                      | 4          |
| 4-7/2-8                                      | 3                        | 3                      | 4          |
| 2-7  | 8                        | 3                      | 12         |
| <b>Total</b>                                 | <b>26</b>                | <b>7</b>               | <b>38</b>  |
| <b>Deleciones parciales</b>                  |                          |                        |            |
| 4-7  | 29                       | 1                      | 42         |
| 1,4-7  | 1                        | 0                      | 1          |
| 4-8  | 6                        | 0                      | 9          |
| 1,4-8  | 1                        | 0                      | 1          |
| 2-3  | 2                        | 0                      | 3          |
| 6-7  | 2                        | 0                      | 3          |
| 2-5  | 1                        | 0                      | 1          |
| 6-8  | 1                        | 0                      | 1          |
| <b>Total</b>                                 | <b>43</b>                | <b>1</b>               | <b>62</b>  |
| <b>Total</b>                                 | <b>69</b>                | <b>8</b>               | <b>100</b> |

En la Tabla 23 se muestran las características principales de los pacientes con y sin deleción en el gen *IKZF1*. Los pacientes con deleción fueron significativamente más mayores y ninguno presentó masa mediastínica al diagnóstico. Todos ellos mostraron fenotipo B y se asociaron a la t(9;22) [20 (61%) pacientes con t(9;22) y 46 (17%) con otras alteraciones;  $P < 0,001$ ]. Además, mostraron con mayor frecuencia una respuesta lenta al tratamiento de inducción y supervivencias más cortas (Figura 25).

**Tabla 23.** Características principales de los pacientes con delección de *IKZF1* en la serie global.

| Delección de <i>IKZF1</i>                    | Delecionado<br>n (%) | No delecionado<br>n (%) | P                 |
|--|----------------------|-------------------------|-------------------|
| n=294  | 69 (20)              | 228 (81)                |                   |
| <b>Características demográficas</b>          |                      |                         |                   |
| Sexo masculino                               | 40 (61)              | 132 (58)                | 0,801             |
| Edad (años), media                           | 36                   | 21                      | <b>&lt; 0,001</b> |
| ≤ 1 año                                      | 0 (0)                | 7 (3)                   | 0,165             |
| > 1 - 9 años                                 | 9 (14)               | 103 (45)                | <b>&lt; 0,001</b> |
| 10 - 14 años                                 | 2 (5)                | 2 (3)                   | 0,499             |
| 15 - 30 años                                 | 20 (30)              | 40 (18)                 | <b>0,036</b>      |
| 31 - 64 años                                 | 27 (41)              | 56 (25)                 | <b>0,015</b>      |
| ≥ 65 años                                    | 10 (12)              | 11 (5)                  | <b>0,039</b>      |
| <b>Características clínico-biológicas</b>    |                      |                         |                   |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L), media      | 41,1                 | 48,3                    | 0,556             |
| Hemoglobina (g/dL), media                    | 9,3                  | 8,6                     | 0,058             |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L), media       | 74                   | 89                      | 0,165             |
| Blastos en MO (%), media                     | 86                   | 86                      | 0,898             |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                       | 6 (9)                | 17 (8)                  | 0,429             |
| Ácido úrico elevado                          | 12 (23)              | 33 (18)                 | 0,229             |
| LDH elevada                                  | 51 (80)              | 164 (77)                | 0,419             |
| Infiltración del SNC                         | 0 (0)                | 8 (4)                   | 0,109             |
| Masa mediastínica                            | 0 (0)                | 9 (20)                  | <b>0,010</b>      |
| Adenopatías                                  | 10 (16)              | 41 (28)                 | 0,086             |
| Hepatomegalia                                | 10 (17)              | 48 (33)                 | 0,027             |
| Esplenomegalia                               | 12 (20)              | 54 (37)                 | 0,009             |
| <b>Inmunofenotipo B</b>                      | <b>69 (100)</b>      | <b>184 (82)</b>         | <b>&lt; 0,001</b> |
| Pro-B o B nula                               | 6 (9)                | 26 (11)                 | 0,759             |
| B común                                      | 52 (77)              | 116 (51)                | <b>&lt; 0,001</b> |
| Pre-B  | 8 (12)               | 40 (17)                 | 0,389             |
| <b>Citogenética</b>                          |                      |                         |                   |
| No valorable                                 | 14 (21)              | 43 (19)                 | 0,395             |
| Cariotipo Normal                             | 9 (14)               | 30 (13)                 | 0,531             |
| t(9;22)                                      | 20 (30)              | 13 (6)                  | <b>&lt; 0,001</b> |
| t(11q23)                                     | 0 (0)                | 18 (8)                  | <b>0,009</b>      |
| t(12;21)                                     | 1 (1)                | 30 (13)                 | <b>0,013</b>      |
| Hiperdiploide                                | 5 (8)                | 34 (15)                 | 0,180             |
| Otras alt. numéricas                         | 3 (4)                | 8 (3)                   | 0,465             |
| Otras alt. estructurales                     | 11 (17)              | 19 (8)                  | 0,082             |
| Cariotipo Complejo                           | 0 (0)                | 6 (3)                   | 0,214             |
| <b>Respuesta al tratamiento de inducción</b> |                      |                         |                   |
| Respuesta lenta                              | 19 (36)              | 40 (20)                 | <b>0,025</b>      |
| Tasa de RC                                   | 56 (92)              | 207 (96)                | 0,172             |
| Resistencia                                  | 5 (8)                | 9 (4)                   | 0,172             |
| Mortalidad                                   | 5 (8)                | 10 (4)                  | 0,233             |
| <b>Supervivencia</b>                         |                      |                         |                   |
| SG a los 3 años                              | 41%                  | 69%                     | <b>&lt; 0,001</b> |
| SLR a los 3 años                             | 45%                  | 73%                     | <b>&lt; 0,001</b> |
| CIR a los 3 años                             | 41%                  | 24%                     | <b>0,003</b>      |

## Resultados



**Figura 25.** Curvas de supervivencia de los pacientes con y sin delección de *IKZF1* en la serie global.

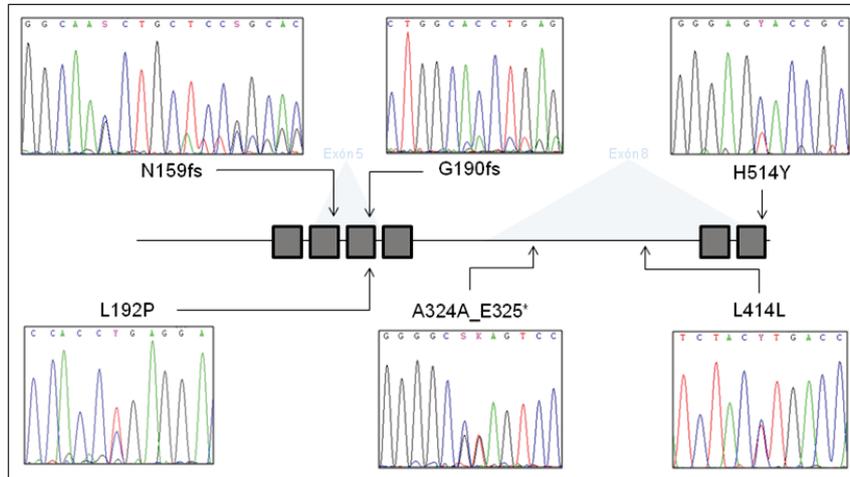
### 5.3.3. Mutaciones exónicas

Se realizó estudio de mutaciones en los siete exones codificantes del gen *IKZF1* en 267 (78%) pacientes. Seis pacientes tenían mutaciones (2%): tres en el exón 5 (una mutación puntual y dos mutaciones con cambio en la pauta de lectura) y tres en el exón 8 (una mutación sin sentido y dos mutaciones puntuales, una sinónima y otra no sinónima). Las principales características de los pacientes, así como la nomenclatura y localización de cada una de ellas se detallan en la Tabla 24 y en la Figura 26).

**Tabla 24.** Principales características de los pacientes con mutaciones en *IKZF1*.

| Mutación                         | Edad | IF      | Cariotipo                                | SG (m) | Evolución            |
|----------------------------------|------|---------|--|--------|----------------------|
| c.474_491del;<br>p.N159fs        | 18   | Pro-B   | 45,XX,-15[3]/<br>46,XX[17]               | 3,4    | Muerte por toxicidad |
| c.570delC;<br>p.G190fs           | 23   | B común | 46,XX[20]                                | 11,7   | Recaída              |
| c.575T>C;<br>p.L192P             | 51   | Pro-B   | 46,XY,t(9;22)(q34;q11)<br>[10]/46,XY[10] | 18,6   | Muerte por infección |
| c.972_973CG>GT;<br>p.A324A_E325* | 68   | Pre-B   | 46,XX,add(9)(p22)[19]/<br>46,XX[1]       | 4,27   | Resistencia          |
| c.1240C>T;<br>p.L414L            | 24   | Pre-B   | 45,XX,-8,der(9)<br>t(8;9)(q13;p21)[15]   | 2,8    | Muerte por toxicidad |
| c.1540C>T; p.H514Y               | 60   | B común | n.d.                                     | 4,1    | Resistencia          |

IF: inmunofenotipo; n.d.: no disponible.



**Figura 26.** Localización de las mutaciones halladas en la serie global. Los cuadrados grises representan los dominios C2H2 de la proteína. La extensión de los exones 5 y 8 se han sombreado en gris.

Ninguna de las mutaciones coincidió con las descritas previamente en LLA por otros autores, ni con las publicadas en COSMIC v74 (*Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*) pero se localizaron en las mismas regiones del gen (dominios de dedos de zinc, exones 5 y 8) que las descritas por otros autores.

En el caso de la mutación G190fs, la hebra mutada fue amplificada mayoritariamente, apareciendo como una mutación en homocigosis y la escasa proporción de alelo normal se atribuyó a la infiltración no leucémica de la muestra (86% de blastos). En los casos de las mutaciones N159fs y E325\*, los pacientes presentaron de manera concomitante delección de los exones 4 al 7. En el primer caso, dado que la mutación se halló en el exón 5 y uno de los alelos estaba delecionado, probablemente el clon mutado fuera un subclón del clon mayoritario portador de la delección. En el caso de la mutación E325\*, localizada en el exón 8, deducimos que la mutación se hallaba en el alelo no delecionado, ya que se encontró expresión de la isoforma lk6. En el resto de casos, las mutaciones se mostraron en heterocigosis.

Como hallazgo adicional al estudio mutacional, se encontraron algunos SNPs descritos previamente que vienen detallados en la Tabla 25.

**Tabla 25.** Características de los SNPs hallados en el estudio mutacional en la serie global.

| SNP        | Tipo de variación   | Localización               | Cambio de base | Casos       | SNP database |
|------------|---------------------|----------------------------|----------------|-------------|--------------|
| rs61731355 | sinónimo ( p.P334P) | 7:50400069<br>(exón 8)     | C>A            | 80* (30,3%) | 14,9%        |
| rs61731356 | sinónimo (p.N392N)  | 7:50400243<br>(exón 8)     | C>T            | 12 (4,5%)   | 5,9%         |
| rs7789106  | intrónico           | 7:50382722<br>(intrón 5-6) | T>C            | 6 (2,3%)    | 3,8%         |

\*Ocho casos mostraron el SNP en homocigosis.

Estos SNPs se hallaron en frecuencia similar a la descrita en repositorios públicos, con la excepción del SNP rs61731355 que se encontró con mayor frecuencia, si bien este estudio no ha sido diseñado para analizar variaciones poblacionales. Ninguno de ellos ha sido relacionado con susceptibilidad a LLA.

Al no disponer de las muestras necesarias, no se han podido realizar estudios para averiguar los cambios proteicos derivados de las mutaciones encontradas. Sin embargo, se podría predecir que las mutaciones con cambio en el marco de lectura y codón stop conllevarían la formación de proteínas anómalas (la N159fs y la G190fs sin capacidad de unión al ADN y la E325\* sin dominios de dimerización) y las mutaciones puntuales halladas en los dedos de zinc (L192P y H514Y) provocarían disfunción en la unión al ADN o una localización anómala de la proteína en la célula. Por ello estas mutaciones se han tenido en cuenta a la hora de analizar aquellos pacientes con *IKZF1* alterado.

Por el contrario, las variaciones intrónicas o sinónimas no se han tenido en cuenta en los análisis por no producir anomalías esperables en el transcrito del gen.

#### 5.3.4. Correlación de las diferentes alteraciones en *IKZF1*

En total 78 (26%) pacientes de aquellos evaluables (n= 300; 294 con todos los estudios más 6 con expresión de Ik6 sin muestra de DNA) presentaron una alteración en *IKZF1* (Tabla 26). En 11 de ellos se detectó una anomalía en los dos alelos del gen, provocando una ausencia total de proteína normofuncionante. En los otros 67 casos, sólo uno de los alelos se halló alterado, y fue la expresión de la isoforma dominante negativa Ik6 (n=34) o un probable mecanismo de haploinsuficiencia (n= 33) lo que provocó un fenotipo anómalo (Tabla 26).

**Tabla 26.** Correlación de las distintas alteraciones encontradas en el estudio del gen *IKZF1* y el fenotipo anómalo esperable provocado por las mismas.

| Delección (exones)      | Mutación | Expresión                    | Fenotipo anómalo esperable                     | n= 300   |
|-------------------------|----------|------------------------------|--|----------|
| Alteración heterocigota |          |                              |  | 67 (22%) |
| 1,4-7                   |          | Ik6                          | isoforma dominante negativa                    | 1        |
| 1,4-8                   |          | normal                       | haploinsuficiencia                             | 1        |
| 1-6                     |          | normal                       | haploinsuficiencia                             | 1        |
| 1-7                     |          | normal                       | haploinsuficiencia                             | 3        |
| 1-8                     |          | normal                       | haploinsuficiencia                             | 8        |
| 2-3                     |          | normal                       | haploinsuficiencia                             | 2        |
| 2-5                     |          | normal                       | haploinsuficiencia                             | 1        |
| 2-7                     |          | normal                       | haploinsuficiencia                             | 5        |
| 2-8                     |          | normal                       | haploinsuficiencia                             | 2        |
| 4-7                     |          | Ik6                          | isoforma dominante negativa                    | 26       |
| 4-8                     |          | normal                       | haploinsuficiencia                             | 6        |
| 6-7                     |          | normal                       | haploinsuficiencia                             | 2        |
| 6-8                     |          | normal                       | haploinsuficiencia                             | 1        |
| 0                       | p.L192P  | normal                       | haploinsuficiencia                             | 1        |
| 0                       | p.H514Y  | normal                       | haploinsuficiencia                             | 1        |
| -                       |          | Ik6                          | isoforma dominante negativa                    | 6        |
| Alteración homocigota   |          |                              |  | 11 (4%)  |
| 2-7                     |          | ausencia/normal <sup>‡</sup> | ausencia de proteína                           | 3        |
| 2-8                     |          | ausencia                     | ausencia de proteína                           | 1        |
| 4-7                     | p.E325*  | Ik6                          | isoforma dominante negativa/haploinsuficiencia | 1        |
| 4-7                     | p.N159fs | Ik6                          | isoforma dominante negativa/haploinsuficiencia | 1        |
| 4-7                     |          | Ik6                          | isoforma dominante negativa                    | 1        |
| 4-7/2-8                 |          | Ik6/ausencia <sup>†</sup>    | isoforma dominante negativa/haploinsuficiencia | 3        |
| 0                       | p.G190fs | normal <sup>‡</sup>          | ausencia de proteína                           | 1        |
| Total                   |          |                              |  | 78 (26%) |

<sup>†</sup>En un caso se halló expresión mayoritaria de Ik6, en otro ausencia de expresión y en otro no se pudo analizar la expresión.

<sup>‡</sup> Probable expresión normal de la población no tumoral de la muestra.

### 5.3.5. Asociación con las características clínico-biológicas y el pronóstico

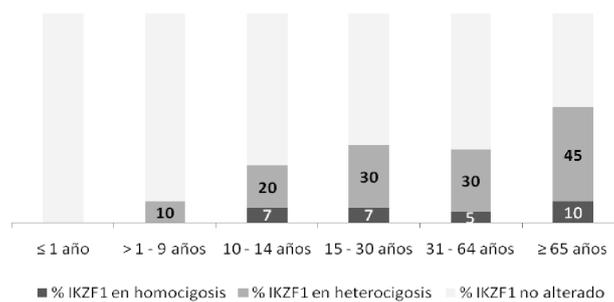
Las principales características de los pacientes con alteraciones en *IKZF1* se comparan con el resto de pacientes en la Tabla 27. También se han analizado las diferencias entre los pacientes con alteraciones homocigotas y heterocigotas en la Tabla 28.

**Tabla 27.** Principales características de los pacientes con y sin alteraciones en *IKZF1*.

|  | <b>IKZF1<br/>alterado</b> | <b>IKZF1<br/>no alterado</b> | <b>P</b>          |
|--|---------------------------|------------------------------|-------------------|
|  | n= 300                    | n= 78 (26%)                  | n= 222 (74%)      |
| <b>Características demográficas</b>          |                           |                              |                   |
| sexo masculino                               | 45 (58)                   | 131 (59)                     | 0,945             |
| edad (años), media                           | 36                        | 20                           | <b>&lt; 0,001</b> |
| ≤ 1 año                                      | 0 (0)                     | 7 (3)                        | 0,119             |
| > 1 - 9 años                                 | 11 (14)                   | 103 (46)                     | <b>&lt; 0,001</b> |
| 10 - 14 años                                 | 4 (5)                     | 11 (5)                       | 0,578             |
| 15 - 30 años                                 | 23 (29)                   | 38 (17)                      | <b>0,030</b>      |
| 31 - 64 años                                 | 29 (37)                   | 54 (24)                      | <b>0,042</b>      |
| ≥ 65 años                                    | 11 (14)                   | 9 (4)                        | <b>0,005</b>      |
| <b>Características clínico-biológicas</b>    |                           |                              |                   |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L), media      | 46,4                      | 48,1                         | 0,884             |
| Hemoglobina (g/dL), media                    | 9,3                       | 8,6                          | <b>0,044</b>      |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L), media       | 81                        | 88                           | 0,549             |
| Blastos en MO (%), media                     | 85                        | 86                           | 0,658             |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                       | 6 (8)                     | 17 (8)                       | 0,994             |
| Ácido úrico elevado                          | 14 (23)                   | 33 (18)                      | 0,367             |
| LDH elevada                                  | 59 (80)                   | 162 (78)                     | 0,741             |
| Infiltración del SNC                         | 0 (0)                     | 8 (5)                        | 0,074             |
| masa mediastínica                            | 0 (0)                     | 9 (21)                       | <b>0,005</b>      |
| Adenopatías                                  | 14 (21)                   | 39 (28)                      | 0,366             |
| Hepatomegalia                                | 10 (15)                   | 48 (34)                      | <b>0,008</b>      |
| Esplenomegalia                               | 13 (20)                   | 53 (38)                      | <b>0,013</b>      |
| <b>Inmunofenotipo B</b>                      | <b>78 (100)</b>           | <b>178 (82)</b>              | <b>&lt; 0,001</b> |
| Pro-B o B nula                               | 7 (9)                     | 25 (11)                      | 0,727             |
| B común                                      | 57 (73)                   | 113 (51)                     | <b>0,001</b>      |
| Pre-B  | 12 (15)                   | 39 (17)                      | 0,790             |
| <b>Citogenética</b>                          |                           |                              |                   |
| No valorable                                 | 16 (20)                   | 43 (19)                      | 0,472             |
| Cariotipo Normal                             | 10 (13)                   | 29 (13)                      | 0,956             |
| t(9;22)                                      | 25 (32)                   | 10 (4)                       | <b>&lt; 0,001</b> |
| t(11q23)                                     | 1 (1)                     | 17 (8)                       | <b>0,029</b>      |
| t(12;21)                                     | 1 (1)                     | 30 (14)                      | <b>0,005</b>      |
| Hiperdiploide                                | 6 (8)                     | 34 (15)                      | 0,131             |
| Otras alt. Numéricas                         | 4 (5)                     | 8 (4)                        | 0,799             |
| Otras alt. estructurales                     | 11 (14)                   | 19 (8)                       | 0,120             |
| Cariotipo Complejo                           | 0 (0)                     | 6 (3)                        | 0,161             |
| <b>Respuesta al tratamiento de inducción</b> |                           |                              |                   |
| Respuesta lenta                              | 21 (34)                   | 38 (19)                      | <b>0,030</b>      |
| Tasa de RC                                   | 66 (90)                   | 203 (97)                     | <b>0,041</b>      |
| Resistencia                                  | 7 (10)                    | 7 (3)                        | <b>0,041</b>      |

|                      | <b>IKZF1 alterado</b> | <b>IKZF1 no alterado</b> | <b>P</b>          |
|----------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------|
| Mortalidad           | 5 (6)                 | 10 (4)                   | 0,351             |
| <b>Supervivencia</b> |                       |                          |                   |
| SG a los 3 años      | 43%                   | 70%                      | <b>&lt; 0,001</b> |
| SLR a los 3 años     | 45%                   | 74%                      | <b>&lt; 0,001</b> |
| CIR a los 3 años     | 41%                   | 23%                      | <b>0,004</b>      |

La frecuencia de estas alteraciones aumentó progresivamente con la edad de manera significativa, e incluso esta asociación se detectó más en el caso de las alteraciones heterocigotas, que no se hallaron en ningún paciente <10 años (Figura 27). Se encontró una asociación significativa con la t(9;22), que estuvo presente en un tercio de los casos ( $P < 0.001$ ). Todos los casos fueron de fenotipo B, frecuentemente B-común.



**Figura 27.** Frecuencia de las alteraciones de *IKZF1* según la edad. Porcentajes mostrados en las barras ( $P < 0.001$ ).

**Tabla 28.** Principales características de los pacientes con alteraciones homocigotas y heterocigotas en *IKZF1*.

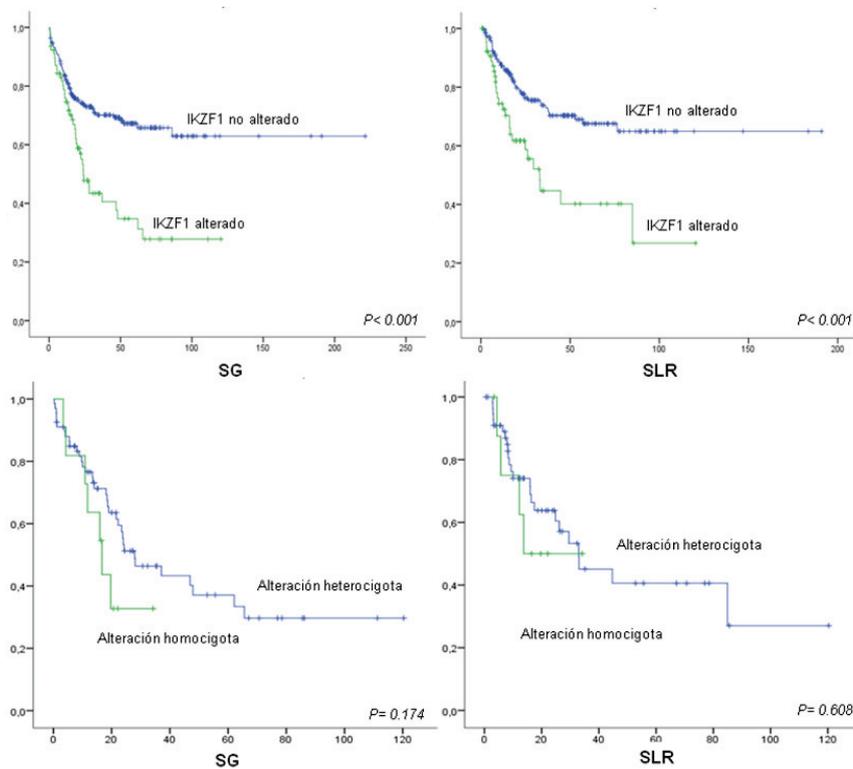
|                                     | <b>Alteración <i>IKZF1</i> homocigota</b> | <b>Alteración <i>IKZF1</i> heterocigota</b> | <b>P</b> |
|-------------------------------------|---|---|----------|
|                                     | n= 78                                     | n= 67 (22%)                                 |          |
| <b>Características demográficas</b> |   |   |          |
| sexo masculino                      | 7 (64)                                    | 38 (57)                                     | 0,465    |
| edad (años), media                  | 40  | 35  | 0,549    |
| ≤ 1 año                             | 0 (0)                                     | 0 (0)                                       | -        |
| > 1 - 9 años                        | 0 (0)                                     | 11 (16)                                     | 0,165    |

Resultados

|  | Alteración <i>IKZF1</i><br>homocigota | Alteración <i>IKZF1</i><br>heterocigota | P       |
|--|---------------------------------------|---|---------|
| 10 - 14 años                                 | 1 (9)                                 | 3 (4)                                   | 0,463   |
| 15 - 30 años                                 | 4 (36)                                | 19 (28)                                 | 0,414   |
| 31 - 64 años                                 | 4 (36)                                | 25 (37)                                 | 0,616   |
| ≥ 65 años                                    | 2 (18)                                | 9 (13)                                  | 0,484   |
| <b>Características clínico-biológicas</b>    |                                       |   |         |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L), media      | 27,5                                  | 49,5                                    | 0,387   |
| Hemoglobina (g/dL), media                    | 8,8                                   | 9,4                                     | 0,508   |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L), media       | 35                                    | 88                                      | < 0,001 |
| Blastos en MO (%), media                     | 84                                    | 86                                      | 0,709   |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                       | 1 (10)                                | 5 (8)                                   | 0,595   |
| Ácido úrico elevado                          | 2 (25)                                | 12 (23)                                 | 0,605   |
| LDH elevada                                  | 6 (55)                                | 53 (84)                                 | 0,035   |
| Infiltración del SNC                         | 0 (0)                                 | 0 (0)                                   | -       |
| Masa mediastínica                            | 0 (0)                                 | 0 (0)                                   | -       |
| Adenopatías                                  | 1 (9)                                 | 13 (23)                                 | 0,272   |
| Hepatomegalia                                | 0 (0)                                 | 10 (18)                                 | 0,139   |
| Esplenomegalia                               | 0 (0)                                 | 13 (23)                                 | 0,074   |
| <b>Inmunofenotipo B</b>                      | 11 (100)                              | 67 (100)                                | -       |
| Pro-B o B nula                               | 2 (18)                                | 5 (8)                                   | 0,255   |
| B común                                      | 7 (64)                                | 50 (75)                                 | 0,334   |
| Pre-B  | 2 (18)                                | 10 (15)                                 | 0,536   |
| <b>Citogenética</b>                          |                                       |   |         |
| No valorable                                 | 0 (0)                                 | 16 (24)                                 | 0,065   |
| Cariotipo Normal                             | 2 (18)                                | 8 (12)                                  | 0,429   |
| t(9;22)                                      | 6 (55)                                | 19 (28)                                 | 0,087   |
| t(11q23)                                     | 0 (0)                                 | 1 (1)                                   | 0,859   |
| t(12;21)                                     | 0 (0)                                 | 1 (1)                                   | 0,859   |
| Hiperdiploide                                | 0 (0)                                 | 6 (9)                                   | 0,389   |
| Otras alt. Numéricas                         | 1 (9)                                 | 3 (4)                                   | 0,463   |
| Otras alt. Estructurales                     | 2 (18)                                | 9 (13)                                  | 0,484   |
| Cariotipo Complejo                           | 0 (0)                                 | 0 (0)                                   | -       |
| <b>Respuesta al tratamiento de inducción</b> |                                       |   |         |
| Respuesta lenta                              | 4 (57)                                | 17 (31)                                 | 0,168   |
| Tasa de RC                                   | 9 (82)                                | 57 (92)                                 | 0,283   |
| Resistencia                                  | 2 (18)                                | 5 (8)                                   | 0,283   |
| Mortalidad                                   | 0 (0)                                 | 5 (7)                                   | 0,457   |
| <b>Supervivencia</b>                         |                                       |   |         |
| SG a los 3 años                              | 46%                                   | 32%                                     | 0,174   |
| SLR a los 3 años                             | 50%                                   | 45%                                     | 0,608   |
| CIR a los 3 años                             | n.a.                                  | 41%                                     | 0,771   |

n.a.: no alcanza.

Las alteraciones de *IKZF1* y los reordenamientos de *MLL* o la *t(12;21)* fueron mutuamente excluyentes. La asociación observada con la cifra de hemoglobina es probablemente debida a la asociación con edades más avanzadas (en adultos se vio menor grado de anemia) y la ausencia de masa mediastínica y hepatoesplenomegalia con el fenotipo B. Los pacientes con *IKZF1* alterado mostraron mayor tasa de resistencia a la quimioterapia, respuesta lenta al tratamiento de inducción con más frecuencia, y peores supervivencias que el resto de pacientes (Tabla 27 y Tabla 28). Este mal pronóstico pareció acentuarse en los pacientes con alteraciones en homocigosis (*P* no significativas) (Figura 28).



**Figura 28.** Curvas de supervivencia de los pacientes con o sin alteraciones en *IKZF1* (en la fila superior) y de los pacientes con alteraciones en *IKZF1* heterocigotas u homocigotas.

Este efecto se mantuvo al separar a los pacientes según su edad pediátrica o adulta, aunque con menor potencia estadística. En el caso de los niños, las alteraciones en *IKZF1* influyeron significativamente en la SLR (57% vs. 83% de SLR a los tres años;  $P= 0,046$ ) y se halló una tendencia hacia la significación en el caso de la SG (83% vs. 86% de SG a los tres años;  $P= 0,096$ ) (Tabla 29).

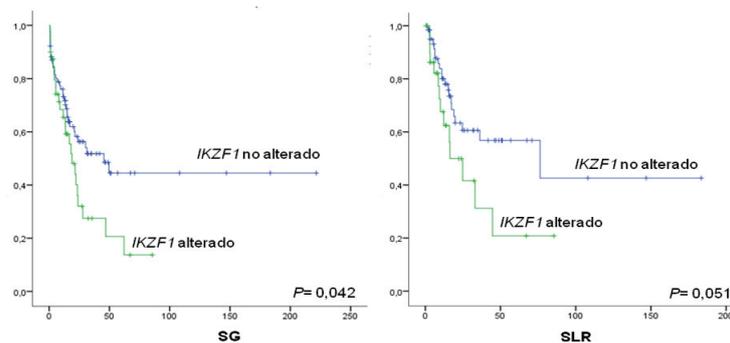
**Tabla 29.** Influencia de las diferentes alteraciones de *IKZF1* en los pacientes pediátricos de la serie estudiada.

| Pacientes pediátricos            | Mortalidad en inducción |       | SG a los 3 años |              | SLR a los 3 años |              | CIR a los 3 años |              |
|----------------------------------|-------------------------|-------|-----------------|--------------|------------------|--------------|------------------|--------------|
|                                  | n (%)                   | P     | %               | P            | %                | P            | %                | P            |
| <b>Anomalías en <i>IKZF1</i></b> |                         |       |                 |              |                  |              |                  |              |
| Deleción de <i>IKZF1</i>         | 0 (0)                   | 0,84  | 86              | 0,741        | 75               | 0,433        | 25               | 0,422        |
| <i>IKZF1</i> monoalélica         | 0 (0)                   | 0,985 | 86              | 0,672        | 74               | 0,369        | 26               | 0,368        |
| <i>IKZF1</i> bialélica           | 0 (0)                   | 0,853 | 100             | 0,753        | 100              | 0,730        | n.a.             | 0,739        |
| Expresión anómala                | 0 (0)                   | 0,874 | 83              | <b>0,078</b> | 43               | 0,099        | 57               | 0,084        |
| <i>IKZF1</i> alterado            | 0 (0)                   | 0,789 | 83              | <b>0,096</b> | 57               | <b>0,046</b> | 43               | <b>0,033</b> |
| Alteración monoalélica           | 0 (0)                   | 0,803 | 83              | <b>0,077</b> | 57               | <b>0,035</b> | 43               | <b>0,026</b> |
| Alteración bialélica             | 0 (0)                   | 0,985 | 100             | 0,746        | 100              | 0,725        | n.a.             | 0,739        |

En el caso de los pacientes adultos, las deleciones de *IKZF1* mostraron una tendencia a empeorar la SLR tanto en la serie global como en los pacientes sin la t(9;22). Esta tendencia alcanzó significación estadística cuando se estudió tan sólo la población que no recibió un trasplante alogénico en primera remisión completa (Tabla 30). También alcanzó significación estadística al evaluar su papel en los pacientes de riesgo citogenético estándar e intermedio según el MRC (SG a los tres años de 27% vs. 52% para los pacientes con y sin alteraciones de *IKZF1*,  $P= 0,042$ ; SLR 31% vs. 61%, respectivamente;  $P= 0,051$ ) (Figura 29).

**Tabla 30.** Influencia de las diferentes alteraciones de *IKZF1* en los pacientes adultos.

| Pacientes adultos  | Mortalidad en inducción |       | SG a los 3 años |              | SLR a los 3 años |              | CIR a los 3 años |       |
|--|-------------------------|-------|-----------------|--------------|------------------|--------------|------------------|-------|
|  | n (%)                   | P     | %               | P            | %                | P            | %                | P     |
| <b>Anomalías en <i>IKZF1</i> (n=174)</b>                 |                         |       |                 |              |                  |              |                  |       |
| Deleción de <i>IKZF1</i>                                 | 5 (9)                   | 0,481 | 31              | 0,230        | 34               | 0,062        | 45               | 0,150 |
| <i>IKZF1</i> monoalélica                                 | 5 (10)                  | 0,401 | 35              | 0,361        | 35               | 0,140        | 44               | 0,300 |
| <i>IKZF1</i> bialélica                                   | 0 (0)                   | 0,546 | 36              | 0,976        | 50               | 0,752        | n.a.             | 0,591 |
| Expresión anómala  | 3 (9)                   | 0,584 | 37              | 0,657        | 53               | 0,703        | 31               | 0,408 |
| <i>IKZF1</i> alterado                                    | 5 (8)                   | 0,610 | 32              | 0,247        | 41               | 0,186        | 41               | 0,452 |
| Alteración monoalélica                                   | 5 (9)                   | 0,428 | 35              | 0,513        | 35               | 0,140        | 41               | 0,513 |
| Alteración bialélica                                     | 0 (0)                   | 0,422 | 25              | 0,263        | 43               | 0,396        | n.a.             | 0,602 |
| <b>Pacientes adultos Phi negativos (n= 142)</b>          |                         |       |                 |              |                  |              |                  |       |
| Deleción de <i>IKZF1</i>                                 | 4 (11)                  | 0,443 | 28              | 0,138        | 25               | 0,070        | 49               | 0,169 |
| <i>IKZF1</i> monoalélica                                 | 4 (11)                  | 0,418 | 31              | 0,222        | 33               | 0,253        | 45               | 0,362 |
| <i>IKZF1</i> bialélica                                   | 0 (0)                   | 0,822 | 50              | 0,855        | 0                | 0,259        | n.a.             | 0,645 |
| Expresión anómala  | 2 (10)                  | 0,650 | 35              | 0,679        | 62               | 0,616        | 24               | 0,170 |
| <i>IKZF1</i> alterado                                    | 4 (10)                  | 0,552 | 30              | 0,186        | 36               | 0,223        | 42               | 0,560 |
| Alteración monoalélica                                   | 4 (11)                  | 0,429 | 33              | 0,431        | 39               | 0,476        | 42               | 0,545 |
| Alteración bialélica                                     | 0 (0)                   | 0,614 | 20              | 0,120        | 0                | <b>0,050</b> | n.a.             | 0,679 |
| <b>Pacientes adultos no trasplantados en RC1 (n=120)</b> |                         |       |                 |              |                  |              |                  |       |
| Deleción de <i>IKZF1</i>                                 | 5 (15)                  | 0,397 | 18              | <b>0,037</b> | 11               | <b>0,004</b> | 50               | 0,094 |
| <i>IKZF1</i> monoalélica                                 | 5 (15)                  | 0,397 | 29              | 0,196        | 18               | <b>0,040</b> | 47               | 0,273 |
| <i>IKZF1</i> bialélica                                   | 0 (0)                   | 0,675 | 0               | 0,363        | 33               | 0,427        | n.a.             | 0,166 |
| Expresión anómala  | 3 (15)                  | 0,540 | 26              | 0,336        | 41               | 0,634        | 31               | 0,298 |
| <i>IKZF1</i> alterado                                    | 5 (12)                  | 0,586 | 25              | <b>0,080</b> | 25               | <b>0,040</b> | 44               | 0,315 |
| Alteración monoalélica                                   | 5 (14)                  | 0,408 | 31              | 0,388        | 26               | 0,133        | 44               | 0,412 |
| Alteración bialélica                                     | 0 (0)                   | 0,458 | 0               | <b>0,035</b> | 25               | 0,149        | n.a.             | 0,254 |

**Figura 29.** SG y SLR de los pacientes adultos de riesgo citogenético estándar e intermedio según la clasificación del MRC con y sin alteraciones de *IKZF1*.

Los 36 pacientes con la t(9;22) en los que se realizó estudio de alteraciones en *IKZF1* no mostraron diferencias significativas en la probabilidad de recaída (CIR a los 3 años 46% en los pacientes con alteraciones de *IKZF1* vs. 18% en los que no las presentaron;  $P= 0,349$ ) ni en la supervivencia global (29% vs. 54%, respectivamente;  $P= 0,897$ ).

#### 5.4. Deleciones intragénicas en otros genes implicados en la LLA

Se estudió la presencia de deleciones en los genes *CDKN2A/B*, *PAX5*, *ETV6*, *EBF1*, *BTG1*, *RB1* y la región pseudoautosómica de los cromosomas sexuales (PAR1). Con la técnica empleada, también se detectaron ganancias en el número de copias de las regiones estudiadas.

##### 5.4.1. Frecuencia de deleciones intragénicas

La frecuencia de cada una de las deleciones y ganancias, así como su estado homocigoto o heterocigoto, se detallan en la Tabla 31.

**Tabla 31.** Resultado del estudio de variación en el número de copias (ganancias y deleciones) en las regiones estudiadas.

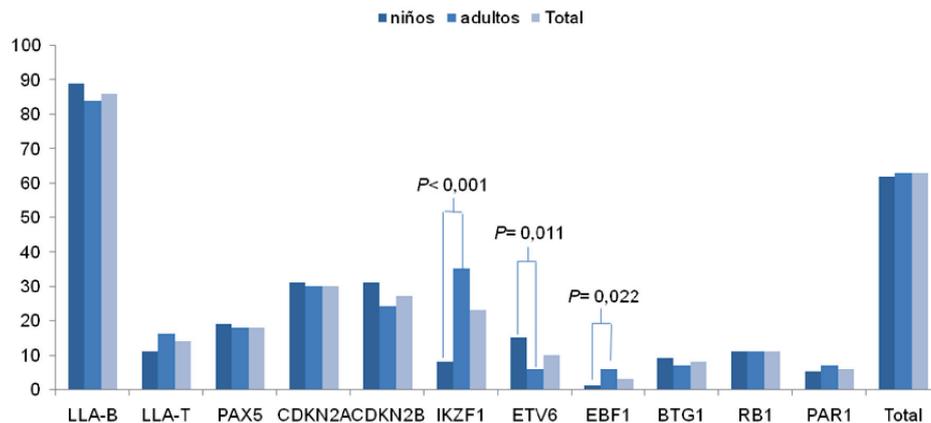
| Genes estudiados | Ganancias | Deleciones homocigotas | Deleciones heterocigotas | Deleciones totales n (%) |
|------------------|-----------|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| CDKN2A           | 2         | 43                     | 46                       | 89 (30)                  |
| CDKN2B           | 2         | 41                     | 39                       | 80 (27)                  |
| PAX5             | 5         | 0                      | 55                       | 55 (18)                  |
| ETV6             | 3         | 1                      | 28                       | 29 (10)                  |
| RB1              | 2         | 9                      | 22                       | 31 (11)                  |
| BTG1             | 1         | 2                      | 22                       | 24 (8)                   |
| XPAR             | 37        | 1                      | 16                       | 17 (6)                   |
| EBF1             | 3         | 0                      | 10                       | 10 (3)                   |
| Total            | 55        | 97                     | 238                      | 335                      |

Se encontraron un total de 335 deleciones, que junto con las deleciones en *IKZF1* detalladas en el apartado anterior, dieron un total de 413 deleciones (108

homocigotas y 305 heterocigotas) en 183 (63%) pacientes, con una mediana de 2 deleciones por caso (rango 1 – 6). El 41% de los pacientes presentó  $\geq 2$  deleciones, el 21%,  $\geq 3$  deleciones y el 10%,  $\geq 4$  deleciones. El resto de pacientes ( $n= 110$ , 37%) no mostraron ninguna deleción en las regiones estudiadas. Las ganancias en las regiones estudiadas fueron menos frecuentes (55 vs. 335) y la más frecuente fue la ganancia en la región PAR1, reflejo de trisomías X en el contexto de cariotipos hiperdiploides.

Los pacientes pediátricos mostraron similar porcentaje de deleciones (62% de los pacientes pediátricos con deleciones vs. 63% de los adultos;  $P= 0,799$ ) y similar frecuencia en el número de alteraciones por caso (media de 2,1 en los niños vs. 2,3 en los adultos;  $P= 0,347$ ). La frecuencia de deleciones en cada uno de los genes también fue similar, salvo para los genes *ETV6* (15% en niños vs 6% en adultos;  $P= 0,011$ ) y *EBF1* (1% en niños vs 6% en adultos;  $P= 0,022$ ) (Figura 30).

Los pacientes con y sin deleciones mostraron características clínico-biológicas similares, salvo mayor frecuencia de elevación de la LDH y menor frecuencia de infiltración del SNC al diagnóstico (Tabla 32).



**Figura 30.** Porcentaje de deleciones en cada uno de los genes estudiados en niños, en adultos y en el total de pacientes. Los dos primeros grupos de barras muestran un porcentaje similar de LLA-B y LLA-T en cada grupo de edad. Las diferencias que fueron significativas se han marcado con el nivel de significación de la P.

Los pacientes con reordenamientos de *MLL* presentaron menos deleciones que el resto de pacientes (27%;  $P= 0.002$ ), y por el contrario, los pacientes con anomalías

## Resultados

estructurales distintas a los reordenamientos clásicos y aquellos con cariotipo complejo, las mostraron con mayor frecuencia (78 y 100%;  $P= 0.023$  y  $0.058$ , respectivamente). Los pacientes con y sin deleciones mostraron la misma frecuencia de inmunofenotipo B y T y no hubo diferencias en cuanto a supervivencia o respuesta al tratamiento.

**Tabla 32.** Principales características de los pacientes con y sin hallazgo de deleciones en los genes estudiados.

|   | ≥ 1 deleción | Sin deleciones | P            |
|---|--------------|----------------|--------------|
| n= 294                                    | n= 183 (63%) | n= 110 (37%)   |              |
| <b>Características demográficas</b>       |              |                |              |
| Sexo masculino                            | 106 (57)     | 66 (60)        | 0,779        |
| Edad (años), media                        | 25           | 24             | 0,757        |
| ≤ 1 año                                   | 2 (1)        | 5 (4)          | 0,071        |
| > 1 - 9 años                              | 72 (39)      | 40 (36)        | 0,727        |
| 10 - 14 años                              | 7 (4)        | 6 (5)          | 0,348        |
| 15 - 30 años                              | 38 (21)      | 22 (20)        | 0,893        |
| 31 - 64 años                              | 51 (28)      | 32 (29)        | 0,905        |
| ≥ 65 años                                 | 14 (8)       | 5 (4)          | 0,430        |
| <b>Características clínico-biológicas</b> |              |                |              |
| Leucocitos ( $\times 10^9/L$ ), media     | 45,3         | 49,1           | 0,722        |
| Hemoglobina (g/dL), media                 | 8,7          | 8,8            | 0,804        |
| Plaquetas ( $\times 10^9/L$ ), media      | 80           | 95             | 0,186        |
| Blastos en MO (%), media                  | 87           | 85             | 0,468        |
| Creatinina $\geq 1,2$ mg/dL               | 16 (9)       | 7 (7)          | 0,323        |
| Ácido úrico elevado                       | 33 (22)      | 12 (14)        | 0,167        |
| LDH elevada                               | 145(83)      | 70 (70)        | <b>0,014</b> |
| Infiltración del SNC                      | 1 (1)        | 7 (8)          | <b>0,007</b> |
| Masa mediastínica                         | 6 (13)       | 3 (12)         | 0,645        |
| Adenopatías                               | 28 (21)      | 23 (31)        | 0,143        |
| Hepatomegalia                             | 35 (27)      | 23 (31)        | 0,614        |
| Esplenomegalia                            | 42 (32)      | 24 (32)        | 0,999        |
| <b>Inmunofenotipo</b>                     |              |                |              |
| Fenotipo B                                | 157 (86)     | 93 (86)        | 0,971        |
| Pro-B o B nula                            | 16 (9)       | 16 (14)        | 0,172        |
| B común                                   | 106 (58)     | 61 (56)        | 0,811        |
| Pre-B                                     | 33 (18)      | 15 (14)        | 0,423        |
| Fenotipo T                                | 27 (14)      | 17 (14)        | 0,971        |
| Pre-T (supracortical)                     | 3 (2)        | 6 (5)          | 0,070        |
| T cortical (común)                        | 15 (8)       | 5 (4)          | 0,343        |
| T madura                                  | 3 (2)        | 2 (2)          | 0,619        |

|  | ≥ 1 deleción | Sin deleciones | P            |
|--|--------------|----------------|--------------|
| <b>Citogenética</b>                          |              |                |              |
| No valorable                                 | 36 (20)      | 21 (19)        | 0,921        |
| Cariotipo Normal                             | 21 (11)      | 18 (16)        | 0,301        |
| t(9;22)                                      | 24 (13)      | 9 (8)          | 0,277        |
| t(11q23)                                     | 5 (3)        | 13 (12)        | <b>0,002</b> |
| t(12;21)                                     | 20 (11)      | 11 (10)        | 0,969        |
| Hiperdiploide                                | 24 (13)      | 15 (14)        | 0,885        |
| Otras alt. numéricas                         | 7 (4)        | 9 (8)          | 0,182        |
| Otras alt. estructurales                     | 29 (20)      | 8 (9)          | <b>0,023</b> |
| Cariotipo Complejo                           | 3 (3)        | 0 (0)          | 0,058        |
| <b>Respuesta al tratamiento de inducción</b> |              |                |              |
| Respuesta lenta                              | 33 (21)      | 26 (27)        | 0,304        |
| Tasa de RC                                   | 163 (94)     | 100 (96)       | 0,668        |
| Resistencia                                  | 10 (6)       | 4 (4)          | 0,668        |
| Mortalidad                                   | 10 (5)       | 5 (5)          | 0,957        |
| <b>Supervivencia</b>                         |              |                |              |
| SG a los 3 años                              | 59%          | 71%            | 0,184        |
| SLR a los 3 años                             | 68%          | 69%            | 0,644        |
| CIR a los 3 años                             | 27%          | 28%            | 0,568        |

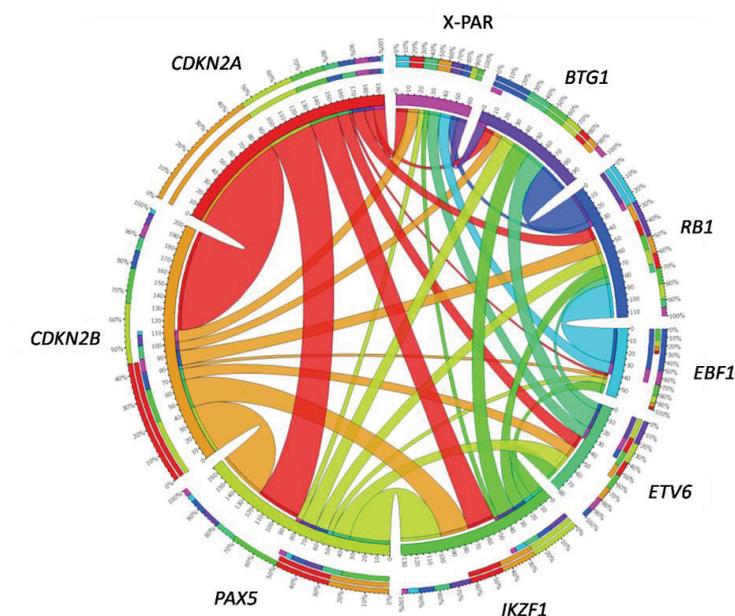
#### 5.4.2. Patrón de concurrencias

El patrón de deleciones halladas simultáneamente en el mismo paciente se detalla en la Figura 31 y se representa en la Figura 32.

| Deleciones<br>n (%)   |                                    |                                    |                                    |                                    |                           |                           |                                   |                          |             |  |  |
|-----------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------------|--------------------------|-------------|--|--|
| <b>CDKN2A</b><br>n=89 | <b>CDKN2A</b>                      |                                    |                                    |                                    |                           |                           |                                   |                          |             |  |  |
| <b>CDKN2B</b><br>n=80 | <b>79 (89)</b><br><i>P</i> < 0,001 | <b>CDKN2B</b>                      |                                    |                                    |                           |                           |                                   |                          |             |  |  |
| <b>PAX5</b><br>n=55   | <b>35 (40)</b><br><i>P</i> < 0,001 | <b>34 (42)</b><br><i>P</i> < 0,001 | <b>PAX5</b>                        |                                    |                           |                           |                                   |                          |             |  |  |
| <b>IKZF1</b><br>n=78  | 21 (24)<br><i>P</i> = n.s.         | 20 (25)<br><i>P</i> = n.s.         | <b>19 (34)</b><br><i>P</i> = 0,027 | <b>IKZF1</b>                       |                           |                           |                                   |                          |             |  |  |
| <b>ETV6</b><br>n=29   | 10 (11)<br><i>P</i> = n.s.         | 8 (10)<br><i>P</i> = n.s.          | 8 (14)<br><i>P</i> = n.s.          | 9 (14)<br><i>P</i> = n.s.          | <b>ETV6</b>               |                           |                                   |                          |             |  |  |
| <b>EBF1</b><br>n=10   | 2 (2)<br><i>P</i> = n.s.           | 2 (2)<br><i>P</i> = n.s.           | 3 (5)<br><i>P</i> = n.s.           | <b>6 (9)</b><br><i>P</i> = 0,010   | 0 (0)<br><i>P</i> = n.s.  | <b>EBF1</b>               |                                   |                          |             |  |  |
| <b>RB1</b><br>n=31    | 10 (11)<br><i>P</i> = n.s.         | 10 (12)<br><i>P</i> = n.s.         | 6 (11)<br><i>P</i> = n.s.          | 9 (14)<br><i>P</i> = n.s.          | 2 (7)<br><i>P</i> = n.s.  | 3 (30)<br><i>P</i> = n.s. | <b>RB1</b>                        |                          |             |  |  |
| <b>BTG1</b><br>n= 24  | 7 (8)<br><i>P</i> = n.s.           | 6 (7)<br><i>P</i> = n.s.           | 7 (13)<br><i>P</i> = n.s.          | <b>12 (18)</b><br><i>P</i> = 0,002 | 5 (17)<br><i>P</i> = n.s. | 0 (0)<br><i>P</i> = n.s.  | <b>8 (26)</b><br><i>P</i> = 0,001 | <b>BTG1</b>              |             |  |  |
| <b>PAR1</b><br>n=17   | 9 (10)<br><i>P</i> = n.s.          | 8 (10)<br><i>P</i> = n.s.          | 3 (5)<br><i>P</i> = n.s.           | 3 (5)<br><i>P</i> = n.s.           | 3 (10)<br><i>P</i> = n.s. | 1 (11)<br><i>P</i> = n.s. | 2 (7)<br><i>P</i> = n.s.          | 2 (8)<br><i>P</i> = n.s. | <b>PAR1</b> |  |  |

**Figura 31.** Patrón de concomitancia de las deleciones intragénica halladas en los diferentes genes en la serie global. Se han resaltado en negra y con la casilla sombreada aquellas asociaciones estadísticamente significativas.

Las deleciones en *CDKN2A* se dieron casi siempre junto con las de *CDKN2B* (89% de los casos) y también con mayor frecuencia con las de *PAX5* (en el 40 y 42% de los casos, respectivamente). Los tres genes se localizan en el brazo corto del cromosoma 9. Las deleciones en *IKZF1* se dieron más frecuentemente de manera significativa junto con deleciones en *PAX5*, *EBF1* y *BTG1* (34%, 60% y 50%, respectivamente). Por último, un tercio de los pacientes con deleción en *BTG1* asoció deleción en *RB1* (*P* = 0,001).



**Figura 32.** Diagrama “circos” mostrando las concomitancias de las distintas deleciones de los genes estudiados en la serie global. El grosor de cada arco es proporcional al porcentaje de casos concomitantes. Destacan las asociaciones de *CDKN2A* y *CDKN2B* con *PAX5*, así como las de *IKZF1* con *PAX5*, *EBF1* y *BTG1*

#### 5.4.3. Asociación con variables demográficas y clínicas

Se han analizado las asociaciones de cada una de las deleciones con las distintas variables clínico-biológicas y el pronóstico (Tabla Suplementaria 13 - Tabla Suplementaria 23). Las principales diferencias encontradas se detallan a continuación.

Las LLA-T mostraron deleciones de *CDKN2A/B* con mayor frecuencia que las B (52% vs. 26%;  $P= 0,001$ ), especialmente deleciones homocigotas (68% vs. 42%;  $P= 0,032$ ). La presencia de estas deleciones también se asoció a elevación de creatinina, LDH y ácido úrico, presencia de masa mediastínica e hiperleucocitosis, parámetros relacionados con el fenotipo T (Tabla 13).

Los pacientes con deleciones en *PAX5* mostraron significativamente mayor trombopenia al diagnóstico que el resto de pacientes ( $61$  vs.  $91 \times 10^9/L$ ;  $P= 0,008$ ) y fueron más frecuentemente de inmunofenotipo pre-B (25% vs. 14%;  $P= 0,026$ ).

Las deleciones de *ETV6* se hallaron fundamentalmente en niños <10 años (62% vs. 36% en los pacientes sin deleción;  $P= 0,005$ ) y el 83% de los casos mostraron fenotipo B común ( $P= 0,006$ ).

Los pacientes con deleción del gen *RB1* mostraron con mayor frecuencia hiperleucocitosis al diagnóstico (23,1 vs. 49,5  $\times 10^9/L$ ;  $P= 0,004$ ) y fenotipo T cortical (16% vs. 6%;  $P= 0,046$ ). Además, las deleciones homocigotas se hallaron en pacientes más mayores, encontrándose el 88% en pacientes adultos (media de edad de 43 años vs. 23 en pacientes con deleción homocigota vs. heterocigota, respectivamente;  $P= 0,004$ ).

Por último, las deleciones de *BTG1* se hallaron exclusivamente en pacientes con fenotipo B (100% vs. 85% en el resto de pacientes;  $P= 0,024$ ).

#### **5.4.4. Asociación con la citogenética**

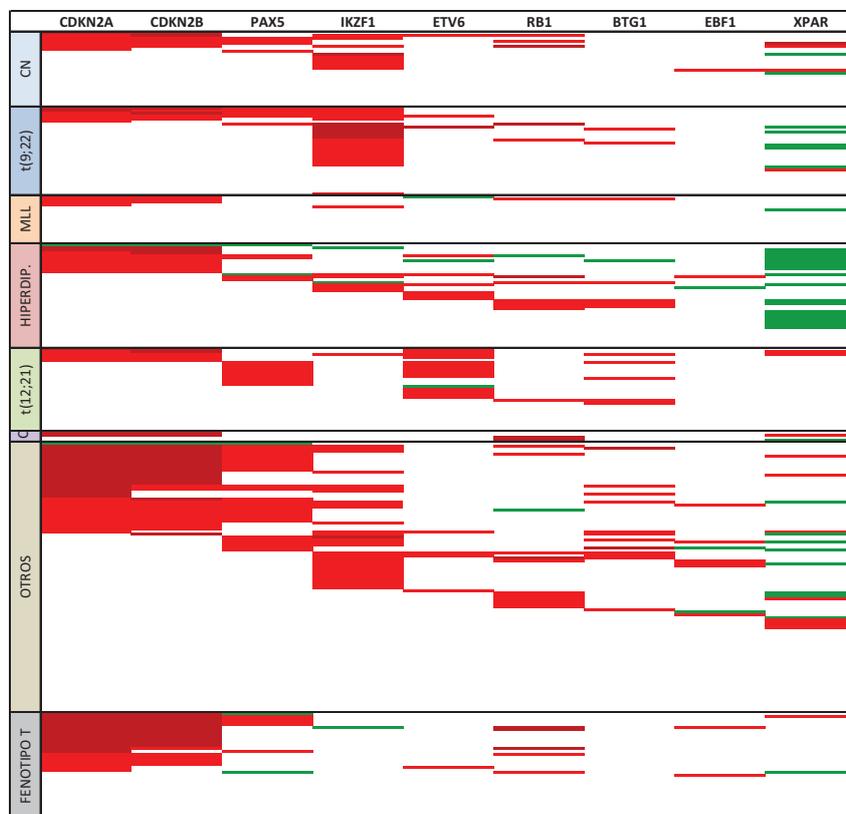
Las deleciones halladas en cada una de los subgrupos citogenéticos se han representado en la Figura 33. Algunas de estas deleciones ya habían sido detectadas en el cariotipo y fueron confirmadas mediante MLPA (n=21):

- Una deleción heterocigota completa de *IKZF1* en un cariotipo con monosomía 7.
- Cuatro casos con del(9p), dos con monosomía 9 y dos con isocromosoma 9 en el cariotipo se confirmaron como deleciones de *CDKN2A/B* (n= 8) y uno de ellos (monosomía 9) con *PAX5* adicionalmente. Sin embargo, tres de ellas aparecieron como homocigotas en el estudio mediante MLPA.
- Un caso con deleción de *ETV6* y del(12)(p13).

- Tres casos con delección de *RB1* y monosomía 13 (n= 2) o del(13q) en el cariotipo.
- Seis casos con delección de la región PAR1 y monosomía X (n=4) o pérdida del cromosoma Y (n=2).

Sin embargo, otras delecciones informadas en el análisis citogenético no se confirmaron en el estudio mediante MLPA (n=15):

- Una monosomía 7 sin delección apreciable de *IKZF1*.
- Tres casos con monosomía 9 y dos con del(9p) no mostraron delección de *CDKN2A/B* ni *PAX5*.
- Un caso con del(12)(p13) y ausencia de delección detectable en *ETV6* mediante MLPA.
- Tres casos con monosomía 13 y sin delección detectable en *RB1* mediante MLPA.
- Cuatro casos con pérdida del cromosoma Y y un caso con un subclón con monosomía X en los que no se detectó delección de la región PAR1.
- Se halló una asociación entre las delecciones homocigotas de *CDKN2A/B* y los cariotipos con anomalías estructurales no encuadrables en ninguna categoría (39% vs. 14%;  $P= 0,001$ ). También se hallaron con frecuencia en pacientes con cariotipo complejo (60% vs. 35% en el resto de casos,  $P= 0,049$ ).
- Las delecciones de *PAX5* y los reordenamientos de *MLL* fueron mutuamente excluyentes ( $P= 0,021$ ), como también lo fueron las delecciones de *BTG1* y el cariotipo normal (0% vs. 14%;  $P= 0,028$ ). Prácticamente la mitad de las delecciones de *ETV6* se hallaron en casos con la t(12;21) (48% vs. 6% en el resto de los casos,  $P< 0,001$ ). Los pacientes con cariotipo complejo asociaron frecuentemente delecciones de *RB1* (10% vs. 1% en el resto de pacientes,  $P= 0,017$ ), todas ellas homocigotas, y también delecciones de la región PAR1 (12% vs. 1% en el resto de pacientes;  $P= 0,042$ ). Las delecciones de *EBF1* y la región PAR1 se asociaron a cariotipos con alteraciones estructurales distintas a las translocaciones recurrentes (40% y 29% vs. 12% y 11% en el resto de pacientes;  $P= 0,026$  y  $P= 0,044$ , respectivamente).



**Figura 33.** Mapa de las alteraciones en el número de copias halladas en la serie global (n=294). Los pacientes se han agrupado en función de los hallazgos citogenéticos e inmunofenotipo y posteriormente por frecuencia de las distintas deleciones. En la barra izquierda se agrupan las categorías: cariotipo normal (CN), t(9;22), reordenamientos de MLL (MLL), hiperdiploidía alta (HIPERDIP.), t(12;21), cariotipo complejo (C), miscelánea (OTROS) y fenotipo T.

#### 5.4.5. Asociación con el pronóstico

Las deleciones de *CDKN2A/B* heterocigotas se asociaron a mayor tasa de mortalidad en inducción (13% vs. 4%;  $P= 0,037$ ) y las deleciones de *PAX5* a mayor frecuencia de resistencia a la quimioterapia de inducción (12% vs. 3%;  $P= 0,024$ ). Los pacientes con deleciones de *BTG1* mostraron respuesta lenta a la inducción en un 42% de los casos frente al 21% de los casos sin deleciones ( $P= 0,048$ ). Sin embargo,

el porcentaje de resistencias no fue significativamente mayor en estos pacientes (12% vs. 4% en los pacientes sin deleciones;  $P= 0,110$ ). El resto de deleciones no mostraron diferencias significativas en la serie global. Los pacientes con 3 ó más deleciones mostraron similar respuesta a la quimioterapia de inducción, pero peor SG que aquellos con menos de 3 deleciones (50% vs. 67% a los tres años, respectivamente;  $P= 0,017$ ). Lo mismo ocurrió con los pacientes con 4 ó más deleciones (40% vs. 66% a los tres años, respectivamente;  $P= 0,013$ ), que mostraron también una tendencia a peor SLR que los pacientes con menos de 4 deleciones (54% vs. 70% a los tres años, respectivamente;  $P= 0,065$ ).

Al diferenciar la influencia de las deleciones en el pronóstico de niños y adultos, se observaron algunas diferencias (Tabla 33 y Tabla 34). En los niños ninguna de estas deleciones influyó significativamente en la probabilidad de muerte durante la quimioterapia de inducción ni en el pronóstico. Tampoco lo hizo el número de deleciones halladas por caso (ni con  $\geq 2$ ,  $\geq 3$  ó  $\geq 4$  deleciones).

**Tabla 33.** Supervivencia y mortalidad en la quimioterapia de inducción para los pacientes pediátricos con cada una de las distintas deleciones génicas estudiadas.

| Pacientes pediátricos     | Mortalidad en inducción |       | SG a los 3 años |       | SLR a los 3 años |       | CIR a los 3 años |       |
|---------------------------|-------------------------|-------|-----------------|-------|------------------|-------|------------------|-------|
|                           | n (%)                   | P     | %               | P     | %                | P     | %                | P     |
| Deleción <i>CDKN2A</i>    | 0 (0)                   | 0,470 | 89              | 0,515 | 86               | 0,928 | 13               | 0,893 |
| <i>CDKN2A</i> monoalélica | 0 (0)                   | 0,730 | 88              | 0,560 | 87               | 0,665 | 11               | 0,445 |
| <i>CDKN2A</i> bialélica   | 0 (0)                   | 0,717 | 88              | 0,971 | 84               | 0,534 | 16               | 0,539 |
| Deleción <i>CDKN2B</i>    | 0 (0)                   | 0,470 | 89              | 0,515 | 86               | 0,928 | 13               | 0,893 |
| <i>CDKN2B</i> monoalélica | 0 (0)                   | 0,730 | 88              | 0,560 | 87               | 0,665 | 12               | 0,614 |
| <i>CDKN2B</i> bialélica   | 0 (0)                   | 0,691 | 89              | 0,797 | 86               | 0,768 | 16               | 0,763 |
| Deleción <i>PAX5</i>      | 0 (0)                   | 0,654 | 96              | 0,089 | 91               | 0,218 | 9                | 0,226 |
| Deleción <i>ETV6</i>      | 0 (0)                   | 0,717 | 100             | 0,163 | 93               | 0,454 | 7                | 0,450 |
| Deleción <i>BTG1</i>      | 0 (0)                   | 0,825 | 100             | 0,147 | 87               | 0,772 | 13               | 0,778 |
| Deleción <i>EBF1</i>      | 0 (0)                   | 0,985 | 100             | 0,689 | 100              | 0,625 | 0                | 0,603 |
| Deleción <i>RB1</i>       | 0 (0)                   | 0,797 | 84              | 0,815 | 84               | 0,490 | 16               | 0,489 |
| <i>RB1</i> monoalélica    | 0 (0)                   | 0,811 | 82              | 0,922 | 83               | 0,365 | 17               | 0,370 |
| <i>RB1</i> bialélica      | 0 (0)                   | 0,895 | 100             | 0,653 | 100              | 0,593 | 0                | 0,579 |
| Deleción <i>PAR1</i>      | 0 (0)                   | 0,910 | 83              | 0,190 | 67               | 0,960 | 28               | 0,924 |

En los adultos, las deleciones de *CDKN2A* y *CDKN2B* condicionaron peor SG (mediana de 13 vs. 45 meses para los pacientes con deleciones de *CDKN2A* y para el

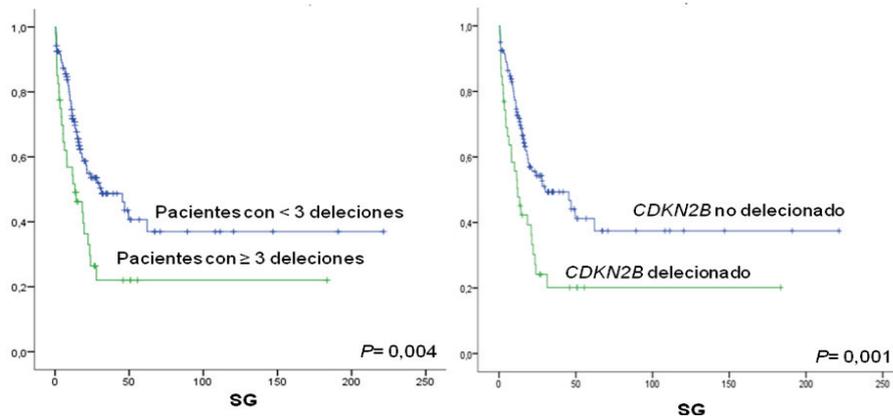
resto de pacientes respectivamente,  $P= 0,005$ ; mediana de 12 vs. 30 meses para los pacientes con deleciones de *CDKN2B* y para el resto de pacientes respectivamente,  $P= 0,001$ ) (Figura 34), en parte debido a mayor mortalidad en inducción (17% vs. 4% para los pacientes con y sin deleciones de *CDKN2A* respectivamente,  $P= 0,014$ ; 15% vs. 6% para los pacientes con y sin deleciones de *CDKN2B* respectivamente,  $P= 0,066$ ). Los pacientes con deleciones de *ETV6* mostraron también una peor SG (mediana de 12 vs. 24 meses en el resto de pacientes,  $P= 0,008$ ), y peor SLR (mediana de 4 vs. 45 meses en el resto de pacientes,  $P< 0,001$ ) y CIR (mediana de 4 vs. n.a. en el resto de pacientes;  $P< 0,001$ ) (Figura 35).

**Tabla 34.** Supervivencia y mortalidad en la quimioterapia de inducción para los pacientes adultos con cada una de las distintas deleciones génicas estudiadas.

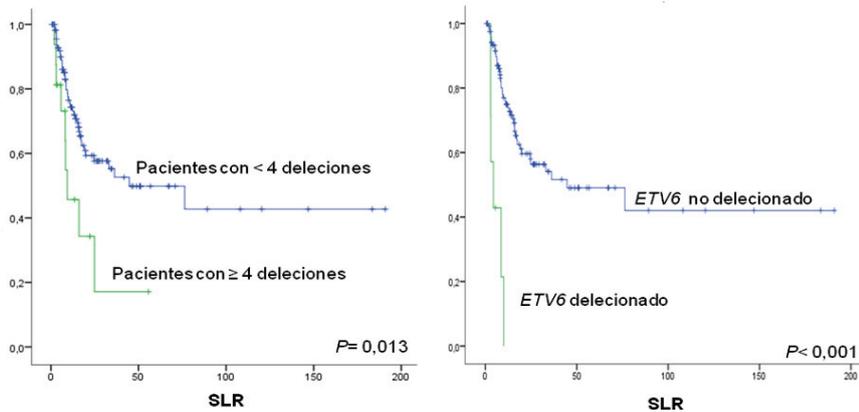
| Pacientes adultos              | Mortalidad en inducción |              | SG a los 3 años |              | SLR a los 3 años |                  | CIR a los 3 años |                  |
|--------------------------------|-------------------------|--------------|-----------------|--------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                                | n (%)                   | P            | %               | P            | %                | P                | %                | P                |
| <b>Deleciones intragénicas</b> |                         |              |                 |              |                  |                  |                  |                  |
| Deleción <i>CDKN2A</i>         | 8 (17)                  | <b>0,014</b> | 25              | <b>0,005</b> | 46               | 0,644            | 43               | 0,813            |
| <i>CDKN2A</i> monoalélica      | 6 (24)                  | <b>0,007</b> | 36              | 0,382        | 58               | 0,546            | 37               | 0,693            |
| <i>CDKN2A</i> bialélica        | 2 (8)                   | 0,586        | 14              | <b>0,005</b> | 35               | 0,176            | 47               | 0,516            |
| Deleción <i>CDKN2B</i>         | 6 (15)                  | 0,066        | 20              | <b>0,001</b> | 37               | 0,184            | 47               | 0,488            |
| <i>CDKN2B</i> monoalélica      | 5 (25)                  | <b>0,013</b> | 28              | 0,072        | 34               | 0,366            | 54               | 0,357            |
| <i>CDKN2B</i> bialélica        | 1 (5)                   | 0,522        | 16              | <b>0,015</b> | 40               | 0,385            | 41               | 0,983            |
| Deleción <i>PAX5</i>           | 4 (14)                  | 0,190        | 37              | 0,605        | 53               | 0,460            | 37               | 0,469            |
| Deleción <i>ETV6</i>           | 1 (11)                  | 0,546        | 11              | <b>0,008</b> | 0                | <b>&lt;0,001</b> | n.a.             | <b>&lt;0,001</b> |
| Deleción <i>BTG1</i>           | 0 (0)                   | 0,348        | 19              | 0,312        | 43               | 0,573            | 44               | 0,786            |
| Deleción <i>EBF1</i>           | 1 (11)                  | 0,543        | 52              | 0,780        | 57               | 0,724            | 37               | 0,646            |
| Deleción <i>RB1</i>            | 0 (0)                   | 0,240        | 33              | 0,950        | 66               | 0,396            | 31               | 0,547            |
| <i>RB1</i> monoalélica         | 0 (0)                   | 0,457        | 33              | 0,601        | 57               | 0,708            | 39               | 0,882            |
| <i>RB1</i> bialélica           | 0 (0)                   | 0,536        | 26              | 0,567        | 83               | 0,394            | 17               | 0,436            |
| Deleción <i>PAR1</i>           | 0 (0)                   | 0,376        | 22              | 0,475        | 67               | 0,354            | 21               | 0,726            |

Además, el aumento en el número de deleciones por paciente influyó significativamente en la SG de manera progresiva (SG a los tres años 34% para los pacientes con  $\geq 1$  deleción, 30% para aquellos con  $\geq 2$ , 22% para aquellos con  $\geq 3$  y 11% para aquellos con  $\geq 4$ ), pero en la comparación por pares se observó que el número más discriminatorio fue  $\geq 3$  deleciones, con SG a los tres años de 22% vs. 49% en el resto de pacientes ( $P= 0,004$ ) (Figura 34). En la SLR tan sólo los pacientes con  $\geq 4$  deleciones mostraron peor SLR que los demás (17% vs. 55% respectivamente,  $P= 0,013$ ) (Figura 35) y la CIR mostró una tendencia hacia la

significación estadística (CIR a los tres años 59% vs. 39% para los pacientes con  $\geq 4$  deleciones vs.  $<4$ , respectivamente;  $P= 0,073$ ). Cabe destacar la asociación encontrada entre los pacientes con  $\geq 3$  deleciones y leucocitos  $>50 \times 10^9/L$  (41% vs. 16% en el resto de pacientes,  $P= 0,001$ ) y con la presencia de un cariotipo complejo (10% vs. 2% en el resto de pacientes,  $P= 0,033$ ).



**Figura 34.** SG para los pacientes adultos con con  $\geq 3$  deleciones y para aquellos con deleciones de *CDKN2B*.



**Figura 35.** SLR de los pacientes adultos con  $\geq 4$  deleciones y aquellos con deleción de *ETV6*.

## 5.5. Análisis multivariante de los factores pronóstico

Dadas las diferencias biológicas de la población pediátrica y adulta se han analizado por separado los factores pronóstico en las dos poblaciones. El valor pronóstico de cada una de las variables estudiadas en este trabajo se encuentra detallado en la sección de Tablas Suplementarias tanto para la serie de pacientes pediátricos (Tabla Suplementaria 24) como para la de pacientes adultos (Tabla Suplementaria 25).

### 5.5.1. Pacientes pediátricos

Las variables que mostraron significación estadística en el análisis univariante para la supervivencia global de la población pediátrica se recogen en la Tabla 35. Las variables que retuvieron significación estadística fueron la respuesta lenta a la quimioterapia de inducción y la estratificación citogenética usada por el grupo SHOP.

**Tabla 35.** Variables incluidas en el análisis multivariante para la supervivencia global en los pacientes pediátricos.

| Análisis univariante                |                     |         |
|-------------------------------------|---------------------|---------|
| Variabes                            | SG a los 3 años (%) | P       |
| Edad <1 y > 10 años                 | 65 vs. 90           | 0,001   |
| Leucocitos > 30 x10 <sup>9</sup> /L | 76 vs. 90           | 0,034   |
| Hemoglobina < 8 g/dL                | 79 vs. 93           | 0,100   |
| Fenotipo B común                    | 92 vs. 77           | 0,046   |
| Citogenética (SHOP)                 | 57 vs. 83 vs. 94    | < 0,001 |
| Alteraciones de <i>IKZF1</i>        | 84 vs. 86           | 0,096   |
| Deleciones de <i>PAX5</i>           | 96 vs. 84           | 0,089   |
| Respuesta lenta a la inducción*     | 71 vs. 92           | 0,004   |
| Análisis multivariante              |                     |         |
| Variable                            | HR (IC 95%)         | P       |
| Respuesta lenta a la inducción*     | 3,4 (1,3 - 9,2)     | 0,016   |
| Citogenética (SHOP)                 | 2,8 (1,4 - 5,8)     | 0,004   |

\*Blastos en MO ≥ 5% en el día +14 de inducción

Para la SLR, la única variable que retuvo significación estadística en el análisis multivariante fue la citogenética, clasificada en los grupos de riesgo definidos por el SHOP (Tabla 36).

**Tabla 36.** Variables incluidas en el análisis multivariante para la supervivencia libre de recaída en los pacientes pediátricos.

| Análisis univariante                 |                      |         |
|--------------------------------------|----------------------|---------|
| Variables                            | SLR a los 3 años (%) | P       |
| Edad <1 y > 10 años                  | 82 vs. 67            | 0,136   |
| Sexo masculino                       | 76 vs. 86            | 0,036   |
| Leucocitos > 100 x10 <sup>9</sup> /L | 53 vs. 83            | 0,001   |
| Inmunofenotipo B vs. T               | 81 vs. 64            | 0,012   |
| Fenotipo B común                     | 87 vs. 68            | 0,012   |
| Citogenética (SHOP)                  | 39 vs. 73 vs. 89     | < 0,001 |
| Alteraciones de <i>IKZF1</i>         | 57 vs. 83            | 0,046   |
| Análisis multivariante               |                      |         |
| Variable                             | HR (IC 95%)          | P       |
| Citogenética (SHOP)                  | 2,9 (1,6 - 5,6)      | 0,001   |

En el caso de la CIR, también la estratificación pronóstica empleada por el SHOP fue la única que retuvo significación estadística (Tabla 37).

**Tabla 37.** Variables incluidas en el análisis multivariante para la incidencia acumulada de riesgo de recaída en los pacientes pediátricos.

| Análisis univariante                         |                      |         |
|--|----------------------|---------|
| Variables                                    | CIR a los 3 años (%) | P       |
| Sexo masculino                               | 24 vs. 13            | 0,024   |
| Leucocitos > 100 x10 <sup>9</sup> /L         | 40 vs. 17            | 0,010   |
| Ácido úrico elevado                          | 37 vs. 17            | 0,018   |
| Inmunofenotipo B vs. T                       | 18 vs. 34            | 0,026   |
| Fenotipo B común                             | 13 vs. 31            | 0,018   |
| Citogenética (SHOP)                          | 11 vs. 26 vs. 54     | 0,003   |
| Alteraciones de <i>IKZF1</i>                 | 43 vs. 18            | 0,040   |
| Análisis regresión para eventos competitivos |                      |         |
| Variable                                     | HR (IC 95%)          | P       |
| Citogenética (SHOP)                          | 2,42 (1,45 - 4,02)   | < 0,001 |

### 5.5.2. Pacientes adultos

Las variables que mostraron significación estadística en el análisis univariante para la supervivencia global de la población adulta se recogen en la Tabla 38. Las variables que retuvieron significación estadística fueron la presencia de deleciones en el gen *CDKN2B* (*HR* 2,2, I.C. 95%: 1,2 - 3,9; *P*= 0,011) y *ETV6* (*HR* 3,3, I.C. 95%: 1,3 - 8,5; *P*= 0,014).

**Tabla 38.** Variables incluidas en el análisis multivariante para la supervivencia global en los pacientes adultos.

| Análisis univariante            |                     |        |
|---------------------------------|---------------------|--------|
| Variables                       | SG, mediana (meses) | P      |
| Edad (<30, 30-64, >65 años)     | 4 vs. 22 vs. 50     | <0,001 |
| Ácido úrico elevado             | 14 vs. 24           | 0,030  |
| Cariotipo complejo              | 12 vs. 24           | 0,089  |
| Deleciones de <i>CDKN2A</i>     | 13 vs. 45           | 0,005  |
| Deleciones de <i>CDKN2B</i>     | 12 vs. 30           | 0,001  |
| Deleciones de <i>ETV6</i>       | 12 vs. 24           | 0,008  |
| Número de deleciones ≥ 3        | 13 vs. 31           | 0,004  |
| Respuesta lenta a la inducción* | 15 vs. 45           | 0,010  |
| Análisis multivariante          |                     |        |
| Variables                       | HR (IC 95%)         | P      |
| Deleciones de <i>CDKN2B</i>     | 2,2 (1,2 – 3,9)     | 0,011  |
| Deleciones de <i>ETV6</i>       | 3,3 (1,3 - 8,5)     | 0,014  |

\*Blastos en MO ≥ 10% en el día +14 de inducción

En el análisis de la SLR, las variables tenidas en cuenta en la ecuación se recogen en la Tabla 39. La presencia de deleciones en *ETV6* y la edad > 65 años fueron las variables que retuvieron significación estadística. En el caso de la CIR, también la deleción de *ETV6* fue la única que retuvo significación estadística (Tabla 40). Cuando se analizaron tan sólo aquellos pacientes que no recibieron un TPH en primera remisión completa, además de las deleciones de *ETV6*, otras variables como la cifra de leucocitos al diagnóstico y la clasificación de riesgo citogenético del MRC alcanzaron significación estadística (Tabla 41).

**Tabla 39.** Variables incluidas en el análisis multivariante para la supervivencia libre de recaída en los pacientes adultos.

| Análisis univariante                |                      |         |
|-------------------------------------|----------------------|---------|
| Variables                           | SLR, mediana (meses) | P       |
| Edad > 65 años                      | 11 vs. 76            | 0,042   |
| Leucocitos > 50 x10 <sup>9</sup> /L | 16 vs. 76            | 0,078   |
| Deleciones de <i>IKZF1</i>          | 16 vs. 76            | 0,062   |
| Deleciones de <i>ETV6</i>           | 4 vs. 45             | < 0,001 |
| Número de deleciones ≥ 4            | 9 vs. 45             | 0,013   |
| Respuesta lenta a la inducción      | 20 vs. n.a.          | 0,095   |
| Análisis multivariante              |                      |         |
| Variable                            | HR (IC 95%)          | P       |
| Deleciones de <i>ETV6</i>           | 6,1 (2,1 – 17,9)     | 0,001   |
| Edad > 65 años                      | 3,4 (1,1 – 11,4)     | 0,047   |

**Tabla 40.** Variables incluidas en el análisis multivariante para la incidencia acumulada de riesgo de recaída en los pacientes adultos.

| Análisis univariante                            |                      |         |
|---|----------------------|---------|
| Variables                                       | CIR a los 3 años (%) | P       |
| Sexo F vs. M                                    | 46 vs. 35            | 0,070   |
| Edad > 65 años                                  | n.a. vs. 38          | 0,066   |
| Plaquetas < 100 x10 <sup>9</sup> /L             | 45 vs. 39            | 0,056   |
| Deleciones de <i>ETV6</i>                       | n.a. vs. 40          | < 0,001 |
| Número de deleciones ≥ 4                        | 59 vs. 37            | 0,073   |
| Análisis de regresión para eventos competitivos |                      |         |
| Variable  | HR (IC 95%)          | P       |
| Deleciones de <i>ETV6</i>                       | 12,3 (5,9 – 25,9)    | < 0,001 |
| Número de deleciones ≥ 4                        | 2,8 (1,3 – 6,1)      | < 0,001 |

**Tabla 41.** Variables incluidas en el análisis multivariante para la incidencia acumulada de riesgo de recaída en los pacientes adultos que no recibieron un TPH en primera remisión completa.

| <b>Análisis univariante</b>                            |                             |                   |
|--|-----------------------------|-------------------|
| <b>Variables</b>                                       | <b>CIR a los 3 años (%)</b> | <b>P</b>          |
| Edad > 65 años   | n.a. vs. 39                 | 0,051             |
| Leucos > 50 x10 <sup>9</sup> /L                        | 77 vs. 35                   | <b>0,006</b>      |
| t(9;22)/BCR-ABL  | 71 vs. 38                   | <b>0,030</b>      |
| Riesgo citogenético MRC                                | 0 vs. 37 vs. 71             | <b>0,001</b>      |
| Alteraciones de <i>IKZF1</i>                           | 58 vs. 34                   | 0,097             |
| Deleciones de <i>ETV6</i>                              | n.a. vs. 40                 | <b>&lt; 0,001</b> |
| Número de deleciones ≥ 4                               | n.a. vs. 37                 | <b>0,011</b>      |
| <b>Análisis de regresión para eventos competitivos</b> |                             |                   |
| <b>Variable</b>  | <b>HR (IC 95%)</b>          | <b>P</b>          |
| Deleciones de <i>ETV6</i>                              | 6,6 (2,5 - 17,0)            | <b>&lt;0,001</b>  |
| Riesgo citogenético MRC                                | 3,2 (1,6 - 6,2)             | <b>&lt;0,001</b>  |
| Número de deleciones ≥ 4                               | 3,5 (1,6 - 7,2)             | <b>0,001</b>      |

## **6.DISCUSIÓN**



En esta Tesis Doctoral se analiza la presencia de anomalías cromosómicas, alteraciones en el gen *IKZF1* y microdeleciones intragénicas en los genes *CDKN2A*, *CDKN2B*, *PAX5*, *ETV6*, *EBF1*, *BTG1*, *RB1* y la región PAR1 en la LLA. Se ha estudiado una serie de 342 pacientes diagnosticados de LLA en edad pediátrica y adulta.

### 6.1. Limitaciones del estudio

Existen varias limitaciones intrínsecas a este estudio que hay que tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados. En primer lugar, se trata de un estudio retrospectivo que reúne pacientes diagnosticados en un largo período de tiempo (1993 – 2013) y que han recibido tratamientos diferentes en función del riesgo de recaída asignado en el momento del diagnóstico. Durante estos años el manejo de los pacientes ha ido perfeccionándose y se han incorporado mejoras y adaptaciones a los tratamientos. Además, los pacientes han sido tratados en siete centros diferentes. Todo ello puede haber influido en la evaluación del pronóstico de las variables estudiadas pese a que no se encontraron diferencias significativas en la supervivencia entre los pacientes tratados en distintos periodos o centros hospitalarios.

En segundo lugar, en este estudio se han incluido pacientes con disponibilidad de muestra biológica para la realización de los estudios citogenéticos y moleculares. Es por ello que la distribución de los pacientes a lo largo del periodo de estudio no es homogénea, siendo el 82% de los pacientes diagnosticados a partir de 2003. Esta limitación de muestras biológicas ha sido la que ha condicionado que el estudio completo de todas las alteraciones planteadas en este trabajo se haya realizado en 245 pacientes.

Por otro lado, se han incluido pacientes pediátricos y adultos. Las diferencias entre la LLA infantil y del adulto son evidentes tanto en las características clínicas al diagnóstico y la respuesta al tratamiento, como en las alteraciones genéticas encontradas. En esta serie, los pacientes pediátricos fueron diagnosticados con mayor grado de anemia, de trombopenia, de infiltración medular y de presencia de visceromegalia, probablemente reflejo de la mejor tolerancia de los niños a estos cambios. Sin embargo, los adultos presentaron con mayor frecuencia insuficiencia renal, quizás por un mayor deterioro de los órganos en la edad adulta. La respuesta a la quimioterapia y la supervivencia fue radicalmente distinta entre pacientes pediátricos

y adultos, incrementándose el porcentaje de resistencia al tratamiento y la tasa de recidiva de la enfermedad a partir de los 30 años. El grupo de niños entre 1 y 10 años fue el de mejor pronóstico, con ausencia de resistencia al tratamiento, casi nula tasa de mortalidad en la inducción y supervivencias >90% a los tres años del diagnóstico. De forma contraria, en los pacientes mayores de 65 años hubo mayor mortalidad tanto en la inducción como durante el tratamiento.

En esta tesis se ha dividido a los pacientes por su edad pediátrica o adulta a partir de los 14 años. Este punto de corte es puramente administrativo, ya que es el utilizado en nuestro país para ser asignado a unidades de pediatría. En esta serie no hubo diferencias significativas en la SG y la SLR entre los pacientes de 10 a 14 años y los de 15 a 30 años, y sí las hubo en la SG entre los niños <10 años y los de 10 a 14 años. Además, de los 10 a los 30 años de edad se observa un periodo de transición biológica, donde ocurren la gran mayoría de LLA-T, una disminución progresiva de las translocaciones t(12;21) y un aumento incipiente de LLA-Ph<sup>+</sup>. Por otro lado, en los lactantes se observan LLA muy agresivas, frecuentemente con reordenamientos de *MLL* de origen intraútero. Esta alteración tiene un corto periodo de latencia y necesita muy pocas alteraciones adicionales para el desarrollo de la leucemia. En línea con esta teoría, en este estudio hemos visto la baja frecuencia de microdeleciones ocurridas en este tipo de leucemias. Con todo esto, vemos que la transición biológica de la LLA es dinámica y es difícil establecer un claro punto de corte, pero probablemente sería más apropiado establecerlo en 10 años, ya que es el tiempo límite de latencia de una posible translocación silente que requiere la sumación de otras alteraciones para su desarrollo. Apoyando estas observaciones, recientemente se ha descrito un grupo específico de edad que comprende a los adolescentes y adultos jóvenes (AYAs, del inglés *Adolescents and Young Adults*) y en los que se ha visto que obtienen mayores tasas de curación cuando reciben tratamientos similares a los pediátricos (Curran *et al*, 2015). De hecho, los protocolos de tratamiento en los que se incluyen estos pacientes actualmente (SHOP alto riesgo en pacientes pediátricos y PETHEMA riesgo estándar en pacientes adultos) son muy similares. Por todos estos factores, en el presente trabajo se han mantenido cinco grupos de edad (< 1 año, 1 – 9 años, 10 – 14 años, 15 – 30 años, 30 – 64 años y > 65 años) para la comparación de las variables.

## 6.2. Hallazgos en el estudio citogenético

En el 83% de los pacientes se encontraron alteraciones citogenéticas, de las cuales el 57% corresponden a las subentidades específicas definidas en la clasificación de la OMS. Cabe destacar la alta frecuencia que hemos encontrado de cariotipos no valorables (26%), lo que lo convierte en el hallazgo más frecuente de nuestra serie. Esto se debió tanto a la ausencia de mitosis de los blastos leucémicos como a la obtención de metafases de mala calidad. Es conocido el bajo índice mitótico *in vitro* de los blastos leucémicos linfoides, siendo nuestro porcentaje coherente con el reportado por otras series [27% (Secker-Walker *et al*, 1997), 42% (Wetzler *et al*, 1999), 25% (Mancini, 2005), 19% (Moorman *et al*, 2009)]. Esto parece deberse a un problema metodológico y no a las características de la célula leucémica, ya que no hubo diferencias demográficas ni clínicas entre los pacientes con cariotipo valorable o no valorable. De hecho, se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de cariotipos no valorables realizados antes y después de 2008 (33% vs. 23%;  $P= 0,037$ ).

### *Alteraciones estructurales*

El 80% de las translocaciones halladas fueron translocaciones recurrentes en la LLA [t(9;22), t(11q23), t(12;21), t(1;19), t(14q32) y t(14q11)], en proporciones parecidas a las reportadas por la literatura y con similar distribución en los grupos de edad (Pui *et al*, 1990). El otro 20% representó a translocaciones de menor frecuencia y cuyos genes implicados fueron desconocidos. Cabe destacar la implicación recurrente de 9q34, banda donde se localiza el gen *ABL*. Pudiera ser que estos casos albergaran reordenamientos activadores de tirosín-cinasa, de manera análoga al reordenamiento BCR-ABL, y formaran parte del grupo de LLA-Ph-like descrito en los últimos años (Roberts *et al*, 2012; Roberts & Mullighan, 2015). A favor de esta hipótesis está el hecho de que en los tres casos de esta serie se demostró una delección intragénica de *IKZF1*, anomalía frecuentemente asociada a este subgrupo de LLA.

Otros reordenamientos se detectaron en forma de alteraciones estructurales como inversiones o presencia de material adicional, en los que la literatura ha demostrado que se establecen translocaciones. Algunos ejemplos de ellos son inv(2)(p23q13), en el que se fusionan RANBP2-ALK y que ha sido descrito en neoplasias hematológicas (Maesako *et al*, 2013; Lee *et al*, 2014) y otros tumores (Li *et al*, 2013; Chen & Lee, 2008), inv(14)(q11q32) en LLA-B que provoca el reordenamiento IGH/CEBPE (Huret, 2011), o los casos de add(14q32) en los que

ocurren reordenamientos de *IGH*, ampliamente descritos en síndromes linfoproliferativos (Gozzetti *et al*, 2002) y mielomas (Avet-Loiseau *et al*, 2000). Esta tesis doctoral no ha centrado sus esfuerzos en la caracterización de nuevos reordenamientos de baja frecuencia. Sin embargo, se sabe que no ocurren de manera casual, sino que provocan alteración en el funcionamiento de diferentes rutas celulares (Jabbour *et al*, 2015; Harrison, 2013). El estudio de estos reordenamientos de menor frecuencia permitirá clasificarlos en el futuro en función de la ruta celular alterada y no tan sólo del gen implicado.

Encontramos la presencia de isocromosomas en un bajo porcentaje (2%). Estos hallazgos son coherentes con la literatura (Pui *et al*, 1992), en la que los i(9q) se asocian a fenotipo B y edad <10 años (Shippey *et al*, 1989), los i(8q) se han visto como evento secundario a la t(9;22) (Mossafa *et al*, 1994), como es el caso de esta serie, y los i(7q) e i(Xp) son raros pero existentes en neoplasias hematológicas (Adeyinka *et al*, 2007).

En cuanto a las deleciones, las más frecuentes fueron las localizadas en 9p y 6q, regiones frecuentemente implicadas en LLA (Sarhadi *et al*, 2013; Heerema *et al*, 2000). En el caso de las del(9p), la región comúnmente delecionada implica a los genes supresores de tumores *CDKN2A* y *CDKN2B*, que en otros casos también se ven alterados por pérdida de heterocigosidad o metilación del promotor (Sarhadi *et al*, 2013). Sin embargo, la patogenia de las del(6q) no es tan conocida debido a la mayor variabilidad de la región implicada (Thelander *et al*, 2008; Heerema *et al*, 2000).

#### *Alteraciones numéricas*

La hiperdiploidía alta fue la alteración numérica más frecuente, afectando principalmente a los cromosomas pares junto con el X, el 17 y el 21. Otros autores han mostrado el mejor pronóstico de las hiperdiploidías más altas en los paciente pediátricos (58 – 66 cromosomas) (Paulsson *et al*, 2010; Dastugue *et al*, 2013). En nuestra serie también se observó esta asociación, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas, probablemente por el escaso número de pacientes (SG y SLR a los tres años de 100% en los pacientes con >58 cromosomas vs. 89% en aquellos con <58 cromosomas). En los diez casos con hiperdiploidía de pacientes adultos no se observó mejor pronóstico que en el resto de pacientes, probablemente por su edad más avanzada.

Los cariotipos hipodiploides fueron poco frecuentes. Se hallaron dos casos con baja hipodiploidía y tres con casi triploidía. Estos pacientes representan probablemente dos caras de un mismo grupo de LLA, en las que el clon hipodiploide sufre endorreplicación y muestra un número de cromosomas cercano a la triploidía (Harrison *et al*, 2004; Mühlbacher *et al*, 2014).

Mención especial merecen los cariotipos con hiperdiploidía baja (47 - 49 cromosomas) e hipodiploidía alta (42 - 45 cromosomas). Diversos autores han intentado otorgar valor pronóstico a estas entidades sin encontrar resultados consistentes, debido a la gran heterogeneidad de ambos grupos. Un ejemplo serían los cariotipos monosómicos (Mottl *et al*, 2014) y la hiperdiploidía baja (Gómez-Seguí *et al*, 2011). La hipodiploidía alta también ha sido estudiada, diferenciándola de las hipodiploidías bajas y haploidías que tienen un pronóstico claramente peor (Harrison *et al*, 2004). Probablemente, este efecto sea debido a que es frecuente que las monosomías o trisomías en escaso número se asocien a anomalías estructurales, edades más avanzadas y cariotipos complejos. En la LLA se ha definido cariotipo complejo como aquel que contiene cinco o más alteraciones, siendo al menos una de ella estructural y excluyendo aquellos cariotipos con alteraciones recurrentes en la LLA (Moorman *et al*, 2007; Moorman *et al*, 2009). En otras neoplasias hematológicas mieloides, se habla de cariotipo complejo a partir de tres alteraciones que conllevan frecuentemente monosomía o delección de los cromosomas 7/7q y 5/5q (Bowen *et al*, 2008; Haase *et al*, 2007). No es así en la LLA (los cromosomas monosómicos más frecuentes fueron los sexuales junto con el 9, el 13 y el 20). Por lo tanto, estos casos estarían a mitad de camino entre la gran inestabilidad genómica de los cariotipos complejos con cinco o más alteraciones y el resto de anomalías citogenéticas con alteraciones más definidas. El conocimiento adquirido en los últimos años sobre la repercusión molecular de estas alteraciones apoya esta hipótesis, caracterizando a la hipodiploidía baja por el hallazgo de mutaciones germinales de *TP53* (Mühlbacher *et al*, 2014) y activación de las vías de señalización PI3K/mTOR y MEK-ERK (Holmfeldt *et al*, 2013). Es probable que el estudio de estas LLA “perieuploides” mediante tecnologías de alta resolución permita una mejor comprensión de sus mecanismos leucemogénicos.

#### *Valor pronóstico de las alteraciones citogenéticas*

Las alteraciones citogenéticas encontradas en niños y adultos fueron diferentes: el 63% de los niños <10 años presentó alteraciones citogenéticas de buen

pronóstico (hiperdiploidía y t(12;21)/ETV6-RUNX1), mientras que las de mal pronóstico se incrementaron proporcionalmente con la edad (cariotipo complejo y t(9;22)/BCR-ABL). Este hecho abre el debate sobre si la LLA pediátrica tiene mejor pronóstico que la del adulto por las características de la enfermedad o por el peor estado general de los pacientes adultos. En nuestra serie, los pacientes pediátricos con cariotipo normal mostraron una mayor SG a los tres años que los pacientes adultos con cariotipo normal (90% vs. 46%;  $P= 0,009$ ) pero sin diferencias en la probabilidad de recaída (CIR a los tres años 25% vs. 33%;  $P= 0,586$ ), apoyando una mayor mortalidad de los adultos por características intrínsecas a la edad. Sin embargo, los pacientes adultos con hiperdiploidía alta mostraron peor supervivencia y mayor tasa de recaída que los niños (SG 89% vs. 37%,  $P< 0,001$ ; CIR 9% vs. n.a.,  $P= 0,043$ ), indicando mayor agresividad en la edad adulta de este subtipo de leucemia. Por último, los pacientes con t(9;22)/BCR-ABL o t(11q23)/MLL presentaron similar pronóstico tanto en niños como en adultos [SG 50% vs. 41%;  $P= 0,633$  y CIR n.a. vs. 34%;  $P=0,638$  para la t(9;22) y SG 67% vs. 56%;  $P= 0,427$ ; CIR 33% vs. 44%;  $P=0,433$  para t(11q23)]. Sumando todos estos datos, se podría concluir que ciertamente existe una alteración biológica más agresiva de la enfermedad en la edad adulta que en la pediátrica, con mayor representación de los subtipos de peor pronóstico (no se halló ningún caso de paciente adulto con t(12;21) ni paciente pediátrico con cariotipo complejo).

De forma general, las alteraciones citogenéticas encontradas en nuestros pacientes reprodujeron los subtipos de LLA con características clínicas concretas definidos en la clasificación de la OMS (Swerdlow *et al*, 2008).

En los pacientes pediátricos, los hallazgos en el cariotipo permitieron definir tres grupos con diferente riesgo de muerte y/o recaída. Cabría destacar sin embargo, que más del 80% de las recaídas ocurrieron en los grupos de riesgo intermedio y riesgo favorable ( $n=15$ , 44% y  $n=13$ , 38%; respectivamente). Esto ha impulsado a muchos grupos a buscar otros marcadores predictores de recidiva, como la cinética de aclaramiento de la EMR en diferentes puntos del tratamiento o nuevas alteraciones moleculares. En este sentido, tanto el grupo SHOP como otros grupos internacionales ya han incluido en el algoritmo de tratamiento la determinación de la EMR en varios momentos del tratamiento, rescatando así a pacientes con alto riesgo de recaída no detectados al diagnóstico (Bader *et al*, 2009; Borowitz *et al*, 2008). En cuanto a los nuevos marcadores moleculares, se han descrito numerosas alteraciones como las de *IKZF1*, que han sido objeto de estudio de esta tesis y se especificarán más adelante,

pero también alteraciones activadoras de cinasas (reordenamientos de *ABL*, *CSF1R*, *EPOR*, *JAK2*, *PDGFRB*) (Dirse *et al*, 2015) o mutaciones de *TP53* (Hof *et al*, 2011).

En los pacientes adultos, las alteraciones citogenéticas no mostraron un valor pronóstico claro en nuestra serie estratificándolas en los tres grupos de riesgo propuestos por el MRC. De forma similar, el grupo SWOG comunicó la separación de tan sólo dos grupos de riesgo, incluyendo en el alto riesgo a la t(9;22) y aquellos con t(4;11), hipodiploidía y cariotipo complejo (Pullarkat *et al*, 2007) y el grupo PETHEMA ha comunicado recientemente la ausencia de pronóstico adverso en los pacientes adultos con LLA y cariotipo complejo (Motlló *et al*, 2014).

Existen diversos motivos que podrían explicar la ausencia de reproducibilidad de la estratificación pronóstica del MRC en nuestra serie:

- En primer lugar, el factor que más influye en el pronóstico de los pacientes es el tratamiento aplicado. Así, la t(1;19) que se asoció a un riesgo desfavorable con los tratamientos de los años 80 - 90 (Crist *et al*, 1990), ha perdido el mal pronóstico con los tratamientos más intensivos aplicados en los últimos años (Moorman *et al*, 2010). Esto mismo ha ocurrido con la t(8;14) en la leucemia de Burkitt (Oriol *et al*, 2008; Thomas *et al*, 1999). De este modo se explicaría, que si la t(9;22) ha sido tratada de manera más intensiva, con inhibidores de tirosín-cinasas y TPH en primera remisión completa, se justificaría en nuestra serie unas supervivencias similares al resto de pacientes con LLA en la edad adulta. Este hecho ha sido comunicado por otros autores (Brissot *et al*, 2014).
- Otra posibilidad sería la inclusión en nuestra serie de pacientes mayores de 65 años, edad limitante en la mayoría de ensayos clínicos. Estos pacientes reciben además frecuentemente tratamientos atenuados por la mala tolerancia al mismo y/o las comorbilidades asociadas. Sin embargo, en nuestra serie, la clasificación de riesgo citogenético tampoco se reprodujo en los pacientes < 65 años, por lo que éste no ha sido, al menos en gran medida, un factor determinante.
- Por otro lado, una de las limitaciones de este estudio ha sido la ausencia de medición de EMR al final de la inducción o consolidación en la gran

mayoría de casos, por lo que no se ha podido tener en cuenta en los análisis.

- Por último, al excluir en nuestra serie a los pacientes adultos que no recibieron un TPH alogénico en primera remisión completa sí se reprodujeron los tres grupos de riesgo citogenético del MRC. Esto indica que en los pacientes en los que se realiza TPH se reduce la probabilidad inicial de recaída.

Teniendo en cuenta todos estos datos, podríamos concluir que la aplicación de tratamientos adaptados al riesgo de recaída, tal y como se realiza en los protocolos del grupo PETHEMA utilizados en el 96% de esta serie, matiza el pronóstico adverso asignado a alteraciones citogenéticas de alto riesgo tratadas con otros esquemas terapéuticos.

### 6.3. Alteraciones de *IKZF1*

En esta tesis se ha estudiado la expresión, las mutaciones y las deleciones del gen *IKZF1*. El abordaje integral de las principales alteraciones descritas en este gen en la LLA nos ha permitido correlacionar los diferentes hallazgos y establecer un fenotipo final patológico para este gen en cada caso.

*IKZF1* se halló alterado en un alto porcentaje de casos (26%) y de manera exclusiva en pacientes con LLA-B. En total, el 31% de los pacientes con LLA-B mostraron alteraciones de *Ikaros*: 13% expresaron la isoforma dominante-negativa Ik6, un 1% mostró ausencia completa de expresión, el 27% mostró deleciones (24% intragénicas y 3% del gen completo) y un 2% presentó mutaciones exónicas con cambio de sentido. Llama la atención que ninguno de los pacientes estudiados con LLA de fenotipo T mostró alteraciones de este gen con la metodología empleada pese a que en los estudios murinos las anomalías de *IKZF1* desarrollan una neoplasia T (Winandy *et al*, 1995).

#### *Hallazgo de alteraciones en IKZF1 y sus implicaciones fisiopatológicas*

Todos los casos con expresión de la isoforma Ik6 mostraron deleción de los exones 4 – 7. Estos hallazgos son coherentes con los reportados en los últimos años

(Mullighan *et al*, 2009) y discrepa con la hipótesis inicial de algunos autores que comunicaron un mecanismo de *splicing* alternativo como causante de la expresión de esta isoforma (Sun *et al*, 1999b; Iacobucci *et al*, 2008b). Este fenómeno, de ocurrir en la LLA, debe ser de muy baja frecuencia. No hemos detectado expresión de otras isoformas cortas I<sub>k</sub>9 e I<sub>k</sub>10 reportadas por otros autores en el caso de deleciones de los exones 3 – 7 o 2 – 7, respectivamente (Mullighan *et al*, 2008a; Tokunaga *et al*, 2013). Sin embargo, el 12% de las microdeleciones halladas en nuestra serie abarcaron los exones 2 – 7. Es cierto que la metodología empleada (RT-PCR) es menos sensible que otras técnicas como la electroforesis capilar para la discriminación de isoformas, si bien algunos estudios que han utilizado este método tampoco han encontrado las isoformas I<sub>k</sub>9 o I<sub>k</sub>10 (Iacobucci *et al*, 2008a). El 31% de las deleciones encontradas mostraron pérdida de exones distintos a 4 – 7 ó 2 – 7. Estas deleciones también han mostrado causar haploinsuficiencia o localización anómala y se asocian a un peor pronóstico de manera similar al resto de deleciones (Lana *et al*, 2015).

Otro hallazgo a destacar en nuestra serie es la ausencia de expresión de isoformas normales en los casos con expresión de I<sub>k</sub>6. Tan sólo en algunos casos se encontró coexpresión con isoformas largas en muy escasa cuantía. Otros autores han encontrado que este hallazgo se correlaciona con el porcentaje de infiltración no tumoral en la muestra (Iacobucci *et al*, 2008b). En ratones portadores heterocigotos de una deleción causante de expresión de I<sub>k</sub>6 se ha visto que al mes de crecimiento existe expresión de ambos alelos (isoformas largas y cortas), pero a los tres meses hay expresión exclusiva de la isoforma I<sub>k</sub>6, momento en el que se desarrolla un cuadro de LLA franco (Winandy *et al*, 1995). Los mecanismos por los que se anula la expresión del alelo no mutado permanecen desconocidos, pero podrían estar inducidos por la propia isoforma I<sub>k</sub>6, ya que el cambio de expresión ocurre en un corto periodo de latencia y sin ningún otro evento leucemogénico concomitante (Winandy *et al*, 1995). De hecho, la expresión de isoformas dominantes-negativas de *IKZF1* es el mecanismo fisiológico de regulación de este factor de transcripción (Rebollo & Schmitt, 2003). En este sentido, se ha visto que la coexpresión de I<sub>k</sub>2 e I<sub>k</sub>6 localiza a ambas proteínas en el citoplasma (Yagi, 2002), localización anómala para I<sub>k</sub>2 que posee los dominios de unión al ADN.

El 43% de los pacientes con deleción de *IKZF1* mostró un patrón de isoformas normal. En estos casos se ha postulado un mecanismo de haploinsuficiencia del gen por la pérdida de uno de los alelos. Este estudio no ha podido determinar una expresión disminuida del gen al no realizar técnicas de expresión cuantitativas, pero existe evidencia de este mecanismo en la LLA. En estudios con ratones, aquellos con

expresión atenuada de *IKZF1* muestran un bloqueo parcial de la maduración linfocítica B (Kirstetter et al, 2002). Además, la haploinsuficiencia de *IKZF1* por delección de uno de sus alelos contribuye al desarrollo de una LLA en modelos experimentales con expresión de BCR-ABL (Collins-Underwood, 2010; Virely et al, 2010). Más recientemente se han descrito delecciones heterocigotas de la línea germinal en *IKZF1* como causantes de inmunodeficiencia común variable. Estos autores han demostrado que existe haploinsuficiencia del gen en estos pacientes e incluso describen el desarrollo de una LLA en uno de los miembros de la familia afectada (Kumanovics et al, 2012).

Por último, también hemos encontrado mutaciones con cambio de sentido en la región codificante del gen en 5 (2%) pacientes. La técnica de HRM es una técnica que ofrece mayor sensibilidad que la secuenciación convencional tipo Sanger, por lo que es poco probable que algunas mutaciones representadas en clones minoritarios no hubieran sido detectadas, al menos en los exones 3, 4, 5, 6 y 7, en los que se realizó cribado con esta tecnología. Los trabajos que analizan la presencia de mutaciones en *IKZF1* son escasos y han comunicado porcentajes muy variables que incluyen desde ausencia de mutaciones en población asiática (Yang et al, 2011; Tokunaga et al, 2013), hasta 5,7% (Olsson et al, 2015) ó 12,2% en población pediátrica (Lana et al, 2015). Este último estudio empleó técnicas de NGS, más sensibles para la detección de mutaciones, lo que podría justificar el elevado porcentaje que comunican. Las mutaciones que hemos encontrado se localizan en los exones 5 y 8 fundamentalmente. En la LLA se han hallado mutaciones de todo tipo y a lo largo de todo el gen. El efecto oncogénico de estas mutaciones podría ser de tres tipos: las mutaciones con cambio de sentido en los dominios de unión al ADN provocarían un efecto similar a la isoforma I<sub>k</sub>6 (Mullighan et al, 2009; Lana et al, 2015), las mutaciones con cambio en el marco de lectura provocarían haploinsuficiencia por ausencia de uno de los alelos afectados (Lana et al, 2015), y aquellas mutaciones en los dominios de dimerización, también provocarían una actividad anómala por localización citoplasmática de la proteína (Cobb et al, 2000). Es cierto que el valor pronóstico que pudieran conferir las mutaciones podría ser diferente al de las delecciones del gen. Sin embargo, a la vista de que la repercusión celular es similar, la mayoría de autores asemejan su valor (Olsson et al, 2015; Mullighan et al, 2009), e incluso se ha publicado recientemente evidencia del mal pronóstico que confieren similar al de las delecciones (Lana et al, 2015).

Otros mecanismos no estudiados en esta tesis podrían afectar a la correcta función de *IKZF1*. Por ejemplo, *IKZF1* se encuentra desmetilado en el feto y desmetilado o con bajos grados de metilación en tejido hematopoyético en la edad adulta y en la glándula pituitaria. En este sentido, existe escasa evidencia con respecto a la regulación epigenética de *IKZF1* en la LLA. Su metilación en la isla CpG de la región promotora que precede al exón 1 no codificante es el mecanismo de regulación natural que provoca la ausencia de expresión en tejidos humanos del adulto diferentes al hematopoyético y la glándula pituitaria (Ezzat *et al*, 2005). Algunos adenomas de la glándula pituitaria muestran metilación de la isla CpG por encima del 30% lo que conlleva ausencia de expresión de *IKZF1* (Zhu *et al*, 2007). También en este tipo de tumores se halla expresión aberrante de la isoforma dominante-negativa Iκ6 (Ezzat *et al*, 2003). Todo ello hace posible que también en tumores hematopoyéticos pudiera existir expresión anómala de *IKZF1* por mecanismos de hipermetilación. En este estudio demostramos que todos los casos con ausencia de expresión de *IKZF1* presentan alteración homocigota del gen, ya sea por delección o por mutación. Por tanto, la ausencia de expresión de *IKZF1* en la LLA debida a metilación aberrante debe ser poco frecuente. Sin embargo, no se sabe por qué las delecciones heterocigotas de los exones 4-7 provocan expresión exclusiva de la isoforma Iκ6 sin expresión de isoformas normofuncionantes codificadas por el alelo no deleccionado. En nuestra serie, dos pacientes mostraron delección homocigota de *IKZF1* de los exones 4 al 7 en un alelo y de los exones 2 al 7 en el otro alelo. Uno de ellos mostró ausencia de expresión del gen y el otro, expresión única de la isoforma Iκ6. Estos casos podrían explicarse por la metilación de uno de los alelos.

#### *Correlación clínica y pronóstica de las alteraciones de IKZF1*

En nuestra serie, el porcentaje de pacientes con alteraciones de *IKZF1* fue aumentando progresivamente con la edad, de manera análoga al fenómeno que se observa en los pacientes con la t(9;22). El fenotipo B común fue el más frecuente, que es el fenotipo asociado también a la LLA-Ph<sup>+</sup>. En modelos experimentales con *IKZF1* anulado o en pacientes con ausencia de uno de los alelos o expresión de la isoforma Iκ6 se desarrolla una leucemia pre-B con un bloqueo de la maduración en este estadio (Collins-Underwood, 2010; Virely *et al*, 2010; Joshi *et al*, 2014). En ratones con ausencia de expresión del gen se observa un bloqueo en el estadio pro-B con imposibilidad de expresar IgM en la superficie (Kirstetter *et al*, 2002). Es probable que una de las causas de la variabilidad en el grado de maduración entre pre-B y pro-B

sea debido al tipo de alteración del propio gen *IKZF1* y, quizás en mayor grado, al resto de alteraciones acompañantes al clon leucémico.

En un tercio de los casos las alteraciones de *IKZF1* se asociaron a la t(9;22), pero es destacable que dos tercios de ellas se hallaron en casos de LLA-Ph<sup>+</sup>. Estos pacientes no asociaron otros factores de mal pronóstico, como mayor cifra de leucocitos u otras alteraciones citogenéticas de alto riesgo (cariotipo complejo, reordenamientos de *MLL*), que de hecho fueron menos frecuentes. Sin embargo, mostraron mayor tasa de resistencia a la quimioterapia, una respuesta lenta al tratamiento de inducción con más frecuencia, y peores supervivencias que el resto de pacientes, efecto que pareció acentuarse en los pacientes con alteraciones en homocigosis. El peor pronóstico de las alteraciones de *IKZF1* en homocigosis no ha sido comunicado previamente, por lo que deberá ser validado en otras series.

Nuestros resultados confirman la asociación de las alteraciones de *IKZF1* al pronóstico adverso mostrada también en otras series, tanto pediátricas (Yang *et al*, 2011; Volejnikova *et al*, 2012; Olsson *et al*, 2013; Asai *et al*, 2013; Feng & Tang, 2013; Waanders *et al*, 2011; van der Veer *et al*, 2013a; Clappier *et al*, 2015) como de adultos (Martinelli *et al*, 2009; Ribera *et al*, 2015), donde la evidencia es mucho menor. Son escasos los estudios que no han mostrado asociación con alto riesgo o no han encontrado deleciones o expresión aberrante del gen, lo que nos hace pensar en diferencias importantes en el tipo de pacientes o en la metodología de estudio (Qazi & Uckun, 2013; Palmi *et al*, 2013; Qazi *et al*, 2013).

En la serie pediátrica, aunque el número de pacientes ha sido insuficiente para alcanzar significación estadística, se ha visto una tendencia a un peor pronóstico. Cabe destacar que el 80% de las alteraciones de *IKZF1* se encontraron en pacientes asignados al grupo de riesgo citogenético favorable o intermedio del grupo SHOP, y una tercera parte de ellos recayó pese al tratamiento.

En los pacientes adultos, en los que ya se ha argumentado la influencia de los tratamientos adaptados al riesgo aplicados en esta serie y la ausencia de valor pronóstico de la citogenética, sí se ha hallado un valor pronóstico para las alteraciones de *IKZF1*, especialmente en aquellos pacientes de riesgo citogenético estándar e intermedio y en aquellos pacientes que no son sometidos a TPH en primera remisión completa, lo que hace muy útil su introducción en el algoritmo terapéutico. De hecho,

ya existe evidencia de que tratamientos específicos intensificados disminuyen el riesgo de recaída en estos pacientes (Lana *et al*, 2015; Clappier *et al*, 2015).

Algunos autores han reportado peores supervivencias en los pacientes con LLA-Ph<sup>+</sup> y alteraciones de *IKZF1* (Martinelli *et al*, 2009; van der Veer *et al*, 2013), efecto que no hemos podido demostrar en nuestra serie en la que la LLA- Ph<sup>+</sup> tuvo un comportamiento similar al del resto de pacientes.

#### 6.4. Microdeleciones intragénicas

Estudios en muestras tumorales de pacientes pediátricos con LLA mediante microarrays de SNPs han mostrado deleciones recurrentes de diferentes regiones cromosómicas de pequeño tamaño, a menudo, fragmentos intragénicos que abarcan tan sólo una parte del gen (Paulsson *et al*, 2008; Mullighan *et al*, 2007; Kawamata *et al*, 2008). Estas regiones delecionadas albergan genes importantes en el desarrollo linfocitario B, en la regulación del ciclo celular y apoptosis y algunos genes supresores de tumores (Mullighan *et al*, 2007). En esta tesis hemos querido analizar la frecuencia y características de estas microdeleciones en los genes implicados con mayor frecuencia en la LLA según estos estudios previos.

##### *Hallazgo de microdeleciones en la LLA*

El método de MLPA tiene un límite de resolución en torno al 20-30%, por lo que clones pequeños o infiltraciones tumorales bajas de la muestra podrían dar falsos negativos como resultado. Sin embargo, el porcentaje de deleciones encontradas se encuentra en el rango reportado por otras técnicas de más alta resolución, por ejemplo 18% de deleciones en *PAX5* (en otras series 18 – 33%), 30% de deleciones en *CDKN2A* (11 – 47%), 24% de deleciones en *IKZF1* (7 – 35%), 10% de deleciones en *ETV6* (7 – 28%) y 11% de deleciones en *RB1* (4 – 15%) (Okamoto *et al*, 2010; Baughn *et al*, 2015; Mullighan *et al*, 2009; Paulsson *et al*, 2008; Ribera *et al*, 2015). Además, esta técnica también presenta dificultades en la normalización de los resultados de casos con grandes aneuploidías en el cariotipo. Sin embargo, el MLPA ya ha sido utilizado y validado en la LLA por otros autores previamente, mostrando una buena correlación al comparar sus resultados con FISH y PCR genómica cuantitativa (gQ-PCR) (Schwab *et al*, 2010). En nuestra serie, hubo concordancia entre los hallazgos

del cariotipo y el estudio mediante MLPA. Los pocos casos en los que no se confirmaron los hallazgos cromosómicos detectados mediante citogenética convencional podrían explicarse por cariotipos de pobre calidad morfológica en los que haya errores en la asignación de banda cromosómica, presencia de cromosomas marcadores o reordenamientos no balanceados asumidos como balanceados.

El porcentaje de pacientes en los que se hallaron deleciones fue alto (63%), lo que confirma que la ocurrencia de microdeleciones en la LLA es un evento muy frecuente. Otros estudios realizados con arrays de SNPs o CGH (hibridación genómica comparada) han reportado presencia de anomalías en el número de copias (CNA) en prácticamente el 80 – 90% de los casos. Aunque la literatura ha profundizado más en la ocurrencia de este fenómeno en la LLA-B pediátrica, nosotros y otros autores hemos comprobado que es igualmente frecuente en la LLA-T (62%) (Dirse *et al*, 2015; Karrman *et al*, 2015) y en la LLA del adulto (63%) (Okamoto *et al*, 2010; Paulsson *et al*, 2008; Ribera *et al*, 2015).

En nuestra serie, las deleciones más frecuentes se hallaron en los genes *PAX5*, *CDKN2A* y *CDKN2B* e *IKZF1*, que además aparecieron frecuentemente de manera concomitante. Las deleciones fueron específicas para algunos subtipos de LLA. Por ejemplo, los reordenamientos de *MLL* y la presencia de microdeleciones fueron eventos mutuamente exclusivos, hecho ya descrito por otros autores (Mullighan *et al*, 2009). Esto sugiere la poca necesidad de lesiones cooperadoras en este tipo de leucemias, que se origina intraútero y se desencadena en los lactantes. Por el contrario, leucemias con otros reordenamientos como BCR-ABL o ETV6-RUNX1 presentaron frecuentemente más de dos deleciones por caso, indicando la necesidad de lesiones adicionales múltiples en su leucemogénesis. Las deleciones de *ETV6* mostraron una fuerte asociación con la t(12;21). Estudios mediante FISH han mostrado que la deleción ocurre en el alelo no reordenado (Forestier *et al*, 2007; Baughn *et al*, 2015). Por el contrario, las deleciones de *PAX5* aparecieron frecuentemente en LLA pre-B, sin asociarse a ningún subtipo específico, lo que apunta a su importancia global en la leucemogénesis de estirpe B. Otros genes involucrados en la diferenciación linfocítica B como *EBF1* y *BTG1* se hallaron de manera exclusiva en leucemias de fenotipo B. Curiosamente, cinco (9%) pacientes con deleciones de *PAX5* mostraron fenotipo T, indicando que quizás este gen también pueda tener un papel en el desarrollo linfocítico T.

### *Correlación clínica y pronóstica de las microdeleciones*

Las deleciones en *CDKN2A* y *CDKN2B* se asociaron a una menor supervivencia global en la edad adulta, en parte debido a altas tasas de mortalidad durante la quimioterapia de inducción. Aproximadamente la mitad de los casos se hallaron en homocigosis. Algunas series han reportado porcentajes incluso más altos (Bungaro *et al*, 2009; Karrman *et al*, 2015; Usvasalo *et al*, 2008) y otras han hallado también una asociación con peor pronóstico en pacientes adultos (Ribera *et al*, 2015). En nuestra serie, las deleciones en estos genes se asociaron a fenotipo T, presencia de masa mediastínica, LDH y ácido úrico elevados, todos ellos factores de riesgo para la muerte en inducción. La mayor frecuencia en LLA de estirpe T ha sido previamente reportada (Karrman *et al*, 2015; Kawamata *et al*, 2008) y asociada además a hiperleucocitosis y edad más avanzada.

Las deleciones de *RB1* se han asociado también a fenotipo T, edad adulta y pronóstico adverso en otros estudios (Dirse *et al*, 2015; Paulsson *et al*, 2008). En nuestra serie, las deleciones de *RB1* se hallaron en homocigosis en el 4% de los pacientes, y estos casos se asociaron a edad más avanzada, cariotipos complejos, cifras elevadas de leucocitos y concomitancia de otras deleciones.

Las deleciones de *ETV6* en los niños no tuvieron valor pronóstico; sin embargo, en los pacientes adultos aparecieron junto con otras deleciones y en el seno de cariotipos complejos, por lo que mostraron supervivencias significativamente más cortas al resto de pacientes.

Por otro lado, en consonancia con otros artículos, también hemos observado un detrimento en la supervivencia con el acúmulo de deleciones halladas en un mismo paciente (Ribera *et al*, 2015). Todos estos hallazgos apoyan la existencia de un subgrupo de LLA con mayor inestabilidad genómica, caracterizado por la presencia de múltiples alteraciones cromosómicas y subcromosómicas, edades más avanzadas e hiperleucocitosis, y que asociarían un peor pronóstico. Sin embargo, se deberá profundizar más en el estudio de estos pacientes para confirmar esta hipótesis.

## 6.5. Valor pronóstico de las alteraciones estudiadas

### *Valor pronóstico en pacientes pediátricos*

En los pacientes pediátricos el factor predictor de recaída más potente fue la estratificación citogenética, hallazgo bien conocido en esta enfermedad (Pui *et al*, 2011; Pui *et al*, 2006). También mostró relevancia pronóstica la respuesta lenta a la quimioterapia de inducción. Esta serie tiene la limitación de no disponer de los datos de aclaramiento de la enfermedad mediante monitorización de la EMR, por lo que la cinética post-tratamiento de inducción, que se ha mostrado fundamental en el manejo actual de la LLA, no se ha podido valorar. Otras alteraciones asociadas en el análisis univariante no retuvieron su valor pronóstico en el análisis multivariante. Éste es el caso de las alteraciones de *IKZF1*, cuyo valor pronóstico ha sido demostrado en otras series pediátricas (Volejnikova *et al*, 2012; Roberts & Mullighan, 2015; Mullighan *et al*, 2009). Quizás estos hallazgos en nuestra serie se deban al escaso número de pacientes afectados en la edad pediátrica.

### *Valor pronóstico en pacientes adultos*

En los pacientes adultos, las deleciones de *CDKN2B* se asociaron a supervivencias más cortas. Esta asociación pareció deberse, al menos en parte, a la hiperleucocitosis y fallo renal asociado al fenotipo T, que conlleva mayor riesgo de muerte en inducción. Otras series han comunicado recientemente peores supervivencias libres de recaída en los pacientes con deleciones de este gen (Ribera *et al*, 2015). También parecieron asociar un fuerte valor pronóstico las deleciones de *ETV6*. Sin embargo, estos resultados hay que interpretarlos con cautela, ya que en la edad adulta tan sólo nueve pacientes mostraron deleción de *ETV6*. Además, todos ellos presentaron de manera concomitante otros genes delecionados, frecuentemente *IKZF1*. No tenemos conocimiento de otras series que hayan comunicado resultados similares, si bien es cierto que son muy pocos los estudio de microdeleciones en la LLA del adulto.

Otro hallazgo destacable es la asociación de la presencia de cuatro o más alteraciones con el riesgo de recaída. De modo análogo a los cariotipos complejos, un mayor número de alteraciones se asociaría a una leucemia más agresiva. También otros autores han descrito este fenómeno con las microdeleciones en la LLA (Ribera *et al*, 2015). Futuros estudios con series más amplias de pacientes y tratados de manera homogénea deberán confirmar o no estos resultados.

Por último, el mal pronóstico de las alteraciones de *IKZF1* observado en el análisis univariante no retuvo significación estadística al competir con otras variables. La gran mayoría de estudios publicados hasta la fecha sí han demostrado peores supervivencias en los pacientes con estas alteraciones, algunos subrogándolas al estado de la EMR (Volejnikova *et al*, 2012; Waanders *et al*, 2011) o a la presencia/ausencia de otras alteraciones moleculares como alteración de *ERG* (Clappier *et al*, 2014) o sobreexpresión de *CRLF2* (Chen *et al*, 2012; van der Veer *et al*, 2013). Por ello, nuestros resultados deberían interpretarse teniendo en cuenta las particularidades comentadas de esta serie de pacientes que muestra ausencia de mal pronóstico en las LLA-Ph<sup>+</sup> y escasa reproducibilidad de los factores de riesgo habituales en la LLA del adulto.



## **7.CONCLUSIONES**



1. En relación con las alteraciones citogenéticas, hemos observado que la gran mayoría de los pacientes con LLA muestran anomalías en el cariotipo (83%), cuyas características más destacables fueron:
  - a. Los reordenamientos de *MLL* se asocian a la edad < 1 año e hiperleucocitosis.
  - b. La t(9;22) aumenta de manera proporcional a la edad y la t(12;21) y la hiperdiploidía alta son casi exclusivas de la edad pediátrica.
  - c. El cariotipo complejo se halla en adultos y, predominantemente, en adultos jóvenes.
  
2. En relación con las alteraciones del gen *IKZF1*, hemos encontrado que son frecuentes en la LLA (26%) y muestran las siguientes asociaciones:
  - a. Sólo se han encontrado alteraciones de *IKZF1* en la LLA de estirpe B y su frecuencia aumenta progresivamente con la edad.
  - b. Casi la totalidad (97%) de las alteraciones de *IKZF1* son microdeleciones intragénicas, siendo mutaciones las restantes alteraciones encontradas.
  - c. La microdelección más frecuente es la que afecta a los exones del 4 y al 7, resultando en la expresión de la isoforma patológica Ik6. En el resto de casos con microdeleciones observamos ausencia completa de expresión o un patrón normal de isoformas.
  - d. Las alteraciones de *IKZF1* ocurren con mayor frecuencia en la LLA-Ph positiva (71%) que en el resto (20%).
  
3. En relación con las microdeleciones intragénicas, hemos visto que son eventos igualmente frecuentes en la LLA-B (63%) y la LLA-T (62%), tanto pediátricas (62%) como de adulto (63%), destacando las siguientes particularidades:
  - a. Además de las microdeleciones en *IKZF1*, los genes más frecuentemente involucrados son *CDKN2A* (30%), *CDKN2B* (28%), *PAX5* (18%) y *ETV6* (10%), que se hallan de manera concomitante en muchos de los casos.

- b. Las deleciones que involucran a *CDKN2A* y *CDKN2B* son más frecuentes en las LLA-T, mientras que en las de *BTG1* y *EBF1* ocurren exclusivamente en las LLA-B.
4. En relación con el valor pronóstico de las alteraciones estudiadas podemos concluir lo siguiente:
  - a. En los pacientes pediátricos, la estratificación de riesgo citogenético ha sido el factor que más influye en la supervivencia y en la probabilidad de recaída.
  - b. En los pacientes adultos, las microdeleciones de *CDKN2A/B* y las de *ETV6* han mostrado tener valor pronóstico independiente para la supervivencia global, mientras que para la probabilidad de recaída lo han sido las deleciones de *ETV6* y la concurrencia de  $\geq 4$  deleciones.
  - c. Las alteraciones de *IKZF1* se han asociado a un pronóstico adverso, si bien el tamaño muestral y la heterogeneidad de los tratamientos pueden haber condicionado la ausencia de significación estadística en el análisis multivariante.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**



**A**

Adeyinka, A., Smoley, S., Fink, S., Sanchez, J., Van Dyke, D.L. & Dewald, G. (2007) Isochromosome (X)(p10) in hematologic disorders: FISH study of 14 new cases show three types of centromere signal patterns. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **179**, 25.

Asai, D., Imamura, T., Suenobu, S.-I., Saito, A., Hasegawa, D., Deguchi, T., Hashii, Y., Matsumoto, K., Kawasaki, H., Hori, H., Iguchi, A., Kosaka, Y., Kato, K., Horibe, K., Yumura-Yagi, K., Hara, J., Oda, M. The Japan Association of Childhood Leukemia Study (JACLS) (2013) IKZF1 deletion is associated with a poor outcome in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in Japan. *Cancer Medicine*, **2**, 412.

Asnafi, V., Buzyn, A., Le Noir, S., Baleyrier, F. & Simon, A. (2009) NOTCH1/FBXW7 mutation identifies a large subgroup with favorable outcome in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL): a Group for Research on on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (GRAALL) study. *Blood*, **113**, 3918.

Avet-Loiseau, H., Minvielle, S., Mellerin, M.-P., Magrangeas, F. & Bataille, R. (2000) 14q32 chromosomal translocations: a hallmark of plasma cell dyscrasias? *The Hematology Journal*, **1**, 292.

**B**

Bader, P., Kreyenberg, H. & Henze, G. (2009) Prognostic value of minimal residual disease quantification before allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: the ALL-REZ BFM Study Group. *Journal of Clinical Oncology*, **27**, 377.

Bamford, S., Dawson, E., Forbes, S. & Clements, J. (2004) The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *British journal of Cancer*, **91**, 355.

Baughn, L.B., Biegel, J.A., South, S.T., Smolarek, T.A., Volkert, S., Carroll, A.J., Heerema, N.A., Rabin, K.R., Zweidler-McKay, P.A., Loh, M. & Hirsch, B. (2015) Integration of cytogenomic data for furthering the characterization of pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia: a multi-institution, multi-platform microarray study. *Cancer Genetics*, **208**, 1.

Bene, M.C., Castoldi, G., Knapp, W., Ludwig, W.D. & Matutes, E. (1995) Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*, **9**, 1783–1786.

Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.-T., Flandrin, G., Galton, D.A.G., Gralnick, H.R. & Sultan, C. (1976) Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *British Journal of Haematology*, **33**, 451.

Boer, Den, M.L., van Slegtenhorst, M., De Menezes, R.X., Cheok, M.H., Buijs-Gladdines, J.G., Peters, S.T., Van Zutven, L.J., Beverloo, H.B., Van der Spek, P.J., Escherich, G., Horstmann, M.A., Janka-Schaub, G.E., Kamps, W.A., Evans, W.E. & Pieters, R. (2009) A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *The Lancet Oncology*, **10**, 125.

Boer, J.M., Koenders, J.E., van der Holt, B., Exalto, C., Sanders, M.A., Cornelissen, J.J., Valk, P.J.M., Boer, den, M.L. & Rijnveld, A.W. (2015a) Expression profiling of adult acute lymphoblastic leukemia identifies a BCR-ABL1-like subgroup characterized by high non-response and relapse rates. *Haematologica*, **100**, e261.

Boer, J.M., van der Veer, A., Rizopoulos, D., Fiocco, M., Sonneveld, E., de Groot-Kruseman, H.A., Kuiper, R.P., Hoogerbrugge, P., Horstmann, M., Zaliouva, M., Palmi, C., Trka, J., Emerenciano, M., do Socorro Pombo-de-Oliveira, M., Mlynarski, W., Szczepanski, T., Nebral, K., Attarbaschi, A., Venn, N., Sutton, R., et al (2015b) Prognostic value of rare IKZF1 deletion in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: an international collaborative study. *Leukemia*. n/a.

Borowitz, M.J., Devidas, M., Hunger, S.P. & Bowman, W.P. (2008) Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood*, **111**, 5477.

Bowen, D., Groves, M.J., Burnett, A.K., Patel, Y., Allen, C., Green, C., Gale, R.E., Hills, R. & Linch, D.C. (2008) TP53 gene mutation is frequent in patients with acute myeloid leukemia and complex karyotype, and is associated with very poor prognosis. *Leukemia*, **23**, 203.

Brissot, E., Labopin, M., Beckers, M.M., Socie, G., Rambaldi, A., Volin, L., Finke, J., Lenhoff, S., Kroger, N., Ossenkoppele, G.J., Craddock, C.F., Yakoub-Agha, I., Gurman, G., Russell, N.H., Aljurf, M., Potter, M.N., Nagler, A., Ottmann, O., Cornelissen, J.J., Esteve, J., et al (2014) Tyrosine kinase inhibitors improve long-term

outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for adult patients with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, **100**, 392.

Bungaro, S., Dell'Orto, M.C., Zangrando, A., Basso, D., Gorletta, T., Nigro, Lo, L., Leszl, A., Young, B.D., Basso, G., Bicciato, S., Biondi, A., Kronnie, te, G. & Cazzaniga, G. (2009) Integration of genomic and gene expression data of childhood ALL without known aberrations identifies subgroups with specific genetic hallmarks. *Genes, Chromosomes and Cancer*, **48**, 22.

### C

Charrin, C. (2004) A report from the LALA-94 and LALA-SA groups on hypodiploidy with 30 to 39 chromosomes and near-triploidy: 2 possible expressions of a sole entity conferring poor prognosis in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood*, **104**, 2444.

Chen, I.M., Harvey, R.C., Mullighan, C.G. & Gastier, J. (2012) Outcome modeling with CRLF2, IKZF1, JAK, and minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood*, **119**, 3512.

Chen, S.T. & Lee, J.C. (2008) An inflammatory myofibroblastic tumor in liver with ALK and RANBP2 gene rearrangement: combination of distinct morphologic, immunohistochemical, and genetic features. *Human Pathology*. **39**, 1854.

Chrousos, G.P. & Kino, T. (2005) Ikaros transcription factors: flying between stress and inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, **115**, 844.

Clappier, E., Auclerc, M.-F., Rapon, J., Bakkus, M. & Caye, A. (2014) An intragenic ERG deletion is a marker of an oncogenic subtype of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with a favorable outcome despite frequent IKZF1 deletions. *Leukemia*, **28**, 70.

Clappier, E., Gardel, N., Bakkus, M., Rapon, J., De Moerloose, B., Kastner, P., Caye, A., Vivent, J., Costa, V., Ferster, A., Lutz, P., Mazingue, F., Millot, F., Plantaz, D., Plat, G., Plouvier, E., Poirée, M., Sirvent, N., Uyttebroeck, A., Yakouben, K., et al (2015) IKZF1 deletion is an independent prognostic marker in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, and distinguishes patients benefiting from pulses during maintenance therapy: results of the EORTC Children's Leukemia Group study 58951. *Leukemia*. n/a.

Cobb, B.S. (2000) Targeting of Ikaros to pericentromeric heterochromatin by direct DNA binding. *Genes & Development*, **14**, 2146.

Collins-Underwood, J.R. (2010) Abstract 1961: Ikzf1 haploinsufficiency contributes to the pathogenesis of BCR-ABL1 positive acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Research*, **70**, 1961.

Craig, F.E. & Foon, K.A. (2008) Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*, **111**, 3941.

Crist, W.M., Carroll, A.J., Shuster, J.J. & Behm, F.G. (1990) Poor prognosis of children with pre-B acute lymphoblastic leukemia is associated with the t (1; 19)(q23; p13): a Pediatric Oncology Group study. *Blood*, **76**, 117.

Curran, E. & Stock, W. (2015) How I treat acute lymphoblastic leukemia in older adolescents and young adults. *Blood*, **125**, 3702.

#### D

Dastugue, N., Suciú, S., Plat, G., Speleman, F., Girard, S., Bakkus, M., Pages, M.P., Yakouben, K., Nelken, B., Uyttebroeck, A., Gervais, C., Lutz, P., Teixeira, M.R., Heimann, P., Ferster, A., Rohrlich, P., Collonge, M.A., Munzer, M., Luquet, I., Boutard, P., et al (2013) Hyperdiploidy with 58-66 chromosomes in childhood B-acute lymphoblastic leukemia is highly curable: 58951 CLG-EORTC results. *Blood*, **121**, 2415.

De Keersmaecker, K., Atak, Z.K., Li, N., Vicente, C., Patchett, S., Girardi, T., Gianfelici, V., Geerdens, E., Clappier, E., Porcu, M., Lahortiga, I., Lucà, R., Yan, J., Hulselmans, G., Vranckx, H., Vandepoel, R., Sweron, B., Jacobs, K., Mentens, N., Wlodarska, I., et al (2012) Exome sequencing identifies mutation in CNOT3 and ribosomal genes RPL5 and RPL10 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*, **45**, 186.

Dirse, V., Bertasiute, A., Gineikiene, E., Zvirblis, T., Dambrauskiene, R., Gerbutavicius, R., Juozaityte, E., Malciute, L., Paulsson, K. & Griskevicius, L. (2015) A Population-Based Single Nucleotide Polymorphism Array Analysis of Genomic Aberrations in Younger Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Patients. *Genes, Chromosomes and Cancer*, **54**, 326.

**E**

Ezzat, S., Mader, R., Yu, S., Ning, T., Poussier, P. & Asa, S.L. (2005) Ikaros integrates endocrine and immune system development. *Journal of Clinical Investigation*, **115**, 1021.

Ezzat, S., Yu, S. & Asa, S.L. (2003) Ikaros isoforms in human pituitary tumors: distinct localization, histone acetylation, and activation of the 5' fibroblast growth factor receptor-4 promoter. *The American journal of pathology*, **163**, 1177.

**F**

Feng, J. & Tang, Y. (2013) Prognostic significance of IKZF1 alteration status in pediatric B-lineage acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Leukemia & Lymphoma*, **54**, 889.

Forestier, E., Andersen, M.K., Autio, K., Blennow, E., Borgström, G., Golovleva, I., Heim, S., Heinonen, K., Hovland, R., Johannsson, J.H., Kerndrup, G., Nordgren, A., Rosenquist, R., Swolin, B., Johannsson, B., SCLSG, T.S.C.L.S.G. & NLCSG, A.T.N.L.C.S.G. (2007) Cytogenetic patterns in ETV6/RUNX1-positive pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: A Nordic series of 245 cases and review of the literature. *Genes, Chromosomes and Cancer*, **46**, 440.

**G**

Georgopoulos, K. (2002) HAEMATOPOIETIC CELL-FATE DECISIONS, CHROMATIN REGULATION AND IKAROS. *Nature Reviews Immunology*, **2**, 162.

Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J.-H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S. & Sharpe, A. (1994) The ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell*, **79**, 143.

Gozzetti, A., Davis, E.M., Espinosa, R. & Fernald, A.A. (2002) Identification of novel cryptic translocations involving IGH in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Research*, **62**, 5523.

Gómez-Seguí, I., Such, E., Martínez-Cuadrón, D., Luna, I., Ibáñez, M., López-Pavía, M., Gascón, A., Roig, M., Martínez, J., Sanz, J., Montesinos, P., Martín-Aragonés, G., Lorenzo, I., Senent, L., Barragán, E., Cordon, L., Sempere, A. & Sanz, M.A. (2011) Prognostic value of cytogenetics in adult patients with Philadelphia-negative acute lymphoblastic leukemia. *Annals of Hematology*, **91**, 19.

**H**

Haase, D., Germing, U., Schanz, J. & Pfeilstöcker, M. (2007) New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*, **110**, 4385.

Hahm, K., Ernst, P., Lo, K., Kim, G.S., Turck, C. & Smale, S.T. (1994) The lymphoid transcription factor LyF-1 is encoded by specific, alternatively spliced mRNAs derived from the Ikaros gene. *Molecular and Cellular Biology*, **14**, 7111.

Harrison, C.J. (2013) Targeting signaling pathways in acute lymphoblastic leukemia: new insights. *Hematology*, **2013**, 118.

Harrison, C.J., Moorman, A.V., Broadfield, Z.J., Cheung, K.L., Harris, R.L., Jalali, G.R., Robinson, H.M., Barber, K.E., Richards, S.M., Mitchell, C.D., Eden, T.O.B., Hann, I.M., Kinsey, S.E., Lilleyman, J., Vora, A., Goldstone, A.H., Franklin, I.M., Durrant, J. & Martineau, M. (2004) Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, **125**, 552.

Harrison, C.J., Moorman, A.V., Schwab, C., Carroll, A.J., Raetz, E.A., Devidas, M., Strehl, S., Nebral, K., Harbott, J., Teigler-Schlegel, A., Zimmerman, M., Dastuge, N., Baruchel, A., Soulier, J., Auclerc, M.-F., Attarbaschi, A., Mann, G., Stark, B., Cazzaniga, G., Chilton, L., et al (2013) An international study of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): cytogenetic characterization and outcome. *Leukemia*, **28**, 1015.

Harvey, R.C., Mullighan, C.G., Wang, X., Dobbin, K.K., Davidson, G.S., Bedrick, E.J., Chen, I.M., Atlas, S.R., Kang, H., Ar, K., Wilson, C.S., Wharton, W., Murphy, M., Devidas, M., Carroll, A.J., Borowitz, M.J., Bowman, W.P., Downing, J.R., Relling, M., Yang, J., et al (2010) Identification of novel cluster groups in pediatric high-risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia with gene expression profiling: correlation with genome-wide DNA copy number alterations, clinical characteristics, and outcome. *Blood*, **116**, 4874.

Heerema, N.A., Sather, H.N., Sensel, M.G., Lee, M.K., Hutchinson, R., Lange, B.J., Bostrom, B.C., Nachman, J.B., Steinherz, P.G., Gaynon, P.S. & Uckun, F.M. (2000) Clinical Significance of Deletions of Chromosome Arm 6q in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Report from the Children's Cancer Group. *Leukemia & Lymphoma*, **36**, 467.

Hof, J., Krentz, S., van Schewick, C., Korner, G., Shalpour, S., Rhein, P., Karawajew, L., Ludwig, W.D., Seeger, K., Henze, G., Stackelberg, von, A., Hagemeyer, C., Eckert, C. & Kirschner-Schwabe, R. (2011) Mutations and Deletions of the TP53 Gene Predict Nonresponse to Treatment and Poor Outcome in First Relapse of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, **29**, 3185.

Holmfeldt, L., Wei, L. & Diaz, E. (2013) The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*, **45**, 242.

Hosokawa, Y., Maeda, Y., Ichinohasama, R. & Miura, I. (2001) The Ikaros gene, a central regulator of lymphoid differentiation, fuses to the BCL6 gene as a result of t(3;7)(q27;p12) translocation in a patient with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, **95**, 2719.

Huret, J.L. (2011) t(14;14)(q11;q32) CEBPE/IGH - inv(14)(q11q32) CEBPE/IGH. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, **5**.

## I

Iacobucci, I., Lonetti, A., Cilloni, D., Messa, F., Ferrari, A., Zuntini, R., Ferrari, S., Ottaviani, E., Arruga, F., Paolini, S., Papayannidis, C., Piccaluga, P.P., Soverini, S., Saglio, G., Pane, F., Baruzzi, A., Vignetti, M., Berton, G., Vitale, A., Chiaretti, S., et al (2008a) Identification of different Ikaros cDNA transcripts in Philadelphia-positive adult acute lymphoblastic leukemia by a high-throughput capillary electrophoresis sizing method. *Haematologica*, **93**, 1814.

Iacobucci, I., Lonetti, A., Messa, F., Cilloni, D. & Arruga, F. (2008b) Expression of spliced oncogenic Ikaros isoforms in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: implications for a new mechanism of resistance. *Blood*, **112**, 3847.

Iacobucci, I., Storlazzi, C.T., Cilloni, D. & Lonetti, A. (2009) Identification and molecular characterization of recurrent genomic deletions on 7p12 in the IKZF1 gene in a large cohort of BCR-ABL1-positive acute leukemia patients: on behalf of Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto Acute Leukemia Working Party (GIMEMA AL WP). *Blood*, **114**, 2159.

Ichinohasama, R., Miura, I., Funato, T., Sato, I., Suzuki, C., Saito, Y., Decoteau, J.F., Myers, J.B., Kadin, M.E., Sawai, T. & Ooya, K. (1998) A Recurrent Nonrandom Translocation (3;7)(q27;p12) Associated with Bcl-6 Gene Rearrangement in B-Cell Diffuse Large Cell Lymphoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **104**, 19.

**J**

Jabbour, E., O'Brien, S., Konopleva, M. & Kantarjian, H. (2015) New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, **121**, 2517.

Jaffe, E.S. (2001) Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France. IARC Press.

Jia, M., Wang, Z.-J., Zhao, H.-Z., Shen, H.-P., Cheng, Y.-P., Luo, Z.-B. & Tang, Y.-M. (2015) Prognostic significance of cytokine receptor-like factor 2 alterations in acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *World Journal of Pediatrics*, **11**, 126.

Joshi, I., Yoshida, T., Jena, N., Qi, X. & Zhang, J. (2014) Loss of Ikaros DNA-binding function confers integrin-dependent survival on pre-B cells and progression to acute lymphoblastic leukemia. *Nature Immunology*, **15**, 294.

**K**

Kano, G., Morimoto, A., Takanashi, M., Hibi, S., Sugimoto, T., Inaba, T., Yagi, T. & Imashuku, S. (2008) Ikaros dominant negative isoform (Ik6) induces IL-3-independent survival of murine pro-B lymphocytes by activating JAK-STAT and up-regulating Bcl-xl levels. *Leukemia & Lymphoma*, **49**, 965.

Karrman, K., Castor, A., Behrendtz, M., Forestier, E., Olsson, L., Ehinger, M., Biloglav, A., Fioretos, T., Paulsson, K. & Johansson, B. (2015) Deep sequencing and SNP array analyses of pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia reveal NOTCH1 mutations in minor subclones and a high incidence of uniparental isodisomies affecting CDKN2A. *Journal of Hematology & Oncology*, **8**, 42.

Kawamata, N., Ogawa, S., Zimmermann, M. & Kato, M. (2008) Molecular allelotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemias by high-resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray. *Blood*, **111**, 776.

Kirstetter, P., Thomas, M., Dierich, A., Kastner, P. & Chan, S. (2002) Ikaros is critical for B cell differentiation and function. *European Journal of Immunology*, **32**, 720.

Klein, F., Feldhahn, N., Herzog, S., Sprangers, M., Mooster, J.L. & Jumaa, H. (2005) BCR-ABL1 induces aberrant splicing of IKAROS and lineage infidelity in pre-B lymphoblastic leukemia cells. *Oncogene*, **25**, 1118.

Kumanovics, A., Voelkerding, K., South, S., Rowe, L., Crim, J., Stephens, J., Whitney, T., Martins, T., Augustine, N. & Hill, H. (2012) Haploinsufficiency for the

hematopoietic transcription factor IKAROS causes common variable immunodeficiency. *The Journal of Immunology*, **188**, 63.6.

## L

Lana, T., de Lorenzo, P., Bresolin, S., Bronzini, I., Boer, den, M.L., Cavé, H., Froňková, E., Stanulla, M., Zaliova, M., Harrison, C.J., de Groot, H., Valsecchi, M.G., Biondi, A., Basso, G., Cazzaniga, G. & Kronnie, te, G. (2015) Refinement of IKZF1 status in pediatric Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, **29**, 2107.

Lee, S.E., Kang, S.Y. & Takeuchi, K. (2014) Identification of RANBP2–ALK fusion in ALK positive diffuse large B- cell lymphoma. *Hematological Oncology*, **32**, 221.

Li, J., Yin, W.-H., Takeuchi, K., Guan, H., Huang, Y.-H. & Chan, J.K. (2013) Inflammatory myofibroblastic tumor with RANBP2 and ALK gene rearrangement: a report of two cases and literature review. *Diagnostic Pathology*, **8**, 147.

## M

Maesako, Y., Izumi, K., Okamori, S., Takeoka, K., Kishimori, C., Okumura, A., Honjo, G., Akasaka, T. & Ohno, H. (2013) inv(2)(p23q13)/RAN-binding protein 2 (RANBP2)–ALK fusion gene in myeloid leukemia that developed in an elderly woman. *International Journal of Hematology*, **99**, 202.

Mancini, M., Scappaticci, D., Cimino, G., Nanni, M., Derme, V., Elia, L., Tafuri, A., Vignetti, M., Vitale, A., Cuneo, A., Castoldi, G., Saglio, G., Pane, F., Mecucci, C., Camera, A., Specchia, G., Tedeschi, A., Di Raimondo, F., Fioritoni, G., Fabbiano, F., et al (2005) A comprehensive genetic classification of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of the GIMEMA 0496 protocol. *Blood*, **105**, 3434–41.

Martinelli, G., Iacobucci, I., Storlazzi, C.T., Vignetti, M., Paoloni, F., Cilloni, D., Soverini, S., Vitale, A., Chiaretti, S., Cimino, G., Papayannidis, C., Paolini, S., Elia, L., Fazi, P., Meloni, G., Amadori, S., Saglio, G., Pane, F., Baccarani, M. & Foa, R. (2009) IKZF1 (Ikaros) Deletions in BCR-ABL1-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia Are Associated With Short Disease-Free Survival and High Rate of Cumulative Incidence of Relapse: A GIMEMA AL WP Report. *Journal of Clinical Oncology*, **27**, 5202.

McKenna, R.W. (2001) Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. *Blood*, **98**, 2498.

Molnar, A., Wu, P. & Largespada, D.A. (1996) The Ikaros gene encodes a family of lymphocyte-restricted zinc finger DNA binding proteins, highly conserved in human and mouse. *The Journal of Immunology*, **156**, 585–592.

Moorman, A.V., Chilton, L., Wilkinson, J., Ensor, H.M., Bown, N. & Proctor, S.J. (2009) A population-based cytogenetic study of adults with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **115**, 206.

Moorman, A.V., Ensor, H.M., Richards, S.M. & Chilton, L. (2010) Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *The Lancet Oncology*, **11**, 429.

Moorman, A.V., Harrison, C.J., Buck, G.A.N., Richards, S.M., Secker-Walker, L.M., Martineau, M., Vance, G.H., Cherry, A.M., Higgins, R.R., Fielding, A.K., Foroni, L., Paietta, E., Tallman, M.S., Litzow, M.R., Wiernik, P.H., Rowe, J.M., Goldstone, A.H. & Dewald, G.W. (2007a) Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. *Blood*, **109**, 3189.

Moorman, A.V., Richards, S.M., Robinson, H.M., Strefford, J.C., Kinsey, S.E., Eden, T.O.B., Vora, A.J., Mitchell, C.D. & Harrison, C.J. (2006) Prognosis of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21). *Blood*, **109**, 2327.

Moorman, A.V., Robinson, H., Schwab, C., Richards, S.M., Hancock, J., Mitchell, C.D., Goulden, N., Vora, A. & Harrison, C.J. (2013) Risk-directed treatment intensification significantly reduces the risk of relapse among children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia and intrachromosomal amplification of chromosome 21: a comparison of the MRC ALL97/99 and UKALL2003 trials. *Journal of Clinical Oncology*, **31**, 3389.

Mossafa, H., Huret, J.L., Brizard, A., Guilhot, F., Lessard, M. & Tanzer, J. (1994) Isochromosome 8q: a new recurring secondary anomaly in adults with B-lineage acute lymphoid leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **73**, 84.

Motlló, C., Ribera, J.-M., Morgades, M., Granada, I., Montesinos, P., González-Campos, J., Fernández-Abellán, P., Tormo, M., Bethencourt, C., Brunet, S., Hernández-Rivas, J.-M., Moreno, M.-J., Sarrà, J., del Potro, E., Barba, P., Bernal, T., Grande, C., Grau, J., Cervera, J., Feliu, E., et al (2014) Prognostic Significance of

Complex Karyotype and Monosomal Karyotype in Adult Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia Treated With Risk-Adapted Protocols. *Cancer*, **120**, 3958.

Mullighan, C.G. & Downing, J.R. (2009) Genome-wide profiling of genetic alterations in acute lymphoblastic leukemia: recent insights and future directions. *Leukemia*, **23**, 1209.

Mullighan, C.G., Goorha, S., Radtke, I., Miller, C.B., Coustan-Smith, E., Dalton, J.D., Girtman, K., Mathew, S., Ma, J., Pounds, S.B., Su, X., Pui, C.-H., Relling, M.V., Evans, W.E., Shurtleff, S.A. & Downing, J.R. (2007) Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, **446**, 758.

Mullighan, C.G., Miller, C.B., Radtke, I., Phillips, L.A., Dalton, J., Ma, J., White, D., Hughes, T.P., Le Beau, M.M., Pui, C.-H., Relling, M.V., Shurtleff, S.A. & Downing, J.R. (2008a) BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature*, **453**, 110.

Mullighan, C.G., Phillips, L.A., Su, X., Ma, J. & Miller, C.B. (2008b) Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science*, **322**, 1377.

Mullighan, C.G., Su, X., Zhang, J., Radtke, I., Miller, C.B., Ma, J., Liu, W., Cheng, C., Schulman, B.A., Harvey, R.C., Chen, I.-M., Clifford, R.J., Carroll, W.L., Reaman, G., Bowman, W.P., Devidas, M., Gerhard, D.S., Yang, W., Relling, M.V., Shurtleff, S.A., et al (2009) Deletion of IKZF1 and Prognosis in Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, **360**, 470.

Mühlbacher, V., Zenger, M., Schnittger, S., Weissmann, S., Kunze, F., Kohlmann, A., Bellos, F., Kern, W., Haferlach, T. & Haferlach, C. (2014) Acute lymphoblastic leukemia with low hypodiploid/near triploid karyotype is a specific clinical entity and exhibits a very high TP53 mutation frequency of 93%. *Genes, Chromosomes and Cancer*, **53**, 524.

## N

Nakayama, H., Ishimaru, F., Avitahl, N., Sezaki, N. & Fujii, N. (1999) Decreases in Ikaros activity correlate with blast crisis in patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer Research*, **59**, 3931.

Natarajan, V., Bandapalli, O.R., Rajkumar, T., Sagar, T.G. & Karunakaran, N. (2015) NOTCH1 and FBXW7 Mutations Favor Better Outcome in Pediatric South

Indian T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, **37**, e23.

Nishii, K., Katayama, N., Miwa, H., Shikami, M., Usui, E., Masuya, M., Araki, H., Lorenzo, F., Ogawa, T., Kyo, T., Nasu, K., Shiku, H. & Kita, K. (2002) Non-DNA-binding Ikaros isoform gene expressed in adult B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, **16**, 1285.

Nobori, T., Miura, K., Wu, D.J., Lois, A. & Takabayashi, K. (1994) Deletion of the tyrosine kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. **368**, 753.

## O

Okamoto, R., Ogawa, S., Nowak, D., Kawamata, N., Akagi, T., Kato, M., Sanada, M., Weiss, T., Haferlach, C., Dugas, M., Ruckert, C., Haferlach, T. & Koefler, H.P. (2010) Genomic profiling of adult acute lymphoblastic leukemia by single nucleotide polymorphism oligonucleotide microarray and comparison to pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, **95**, 1481.

Olsson, L., Albitar, F., Castor, A., Behrendtz, M., Biloglav, A., Paulsson, K. & Johansson, B. (2015) Cooperative genetic changes in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with deletions or mutations of IKZF1. *Genes, Chromosomes and Cancer*, **54**, 315.

Olsson, L., Castor, A., Behrendtz, M., Biloglav, A., Forestier, E., Paulsson, K. & Johansson, B. (2013) Deletions of IKZF1 and SPRED1 are associated with poor prognosis in a population-based series of pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia diagnosed between 1992 and 2011. *Leukemia*, **28**, 302.

Oriol, A., Bergua, J., Mesa, E.G., Grande, C., Esteve, J., Brunet, S., Escoda, L. & Hoelzer, D. (2008) High-dose chemotherapy and immunotherapy in adult Burkitt lymphoma. *Cancer*, **113**, 117.

## P

Palmi, C., Lana, T., Silvestri, D., Savino, A., Kronnie, G.T., Conter, V., Basso, G., Biondi, A., Valsecchi, M.G. & Cazzaniga, G. (2013) Impact of IKZF1 deletions on IKZF1 expression and outcome in Philadelphia chromosome negative childhood BCP-ALL. Reply to 'Incidence and biological significance of IKZF1/Ikaros gene deletions in pediatric Philadelphia chromosome negative and Philadelphia chromosome positive B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia'. *Haematologica*, **98**, e164.

Papaemmanuil, E., Hosking, F.J., Vijaykrishnan, J., Price, A., Olver, B., Sheridan, E., Kinsey, S.E., Lightfoot, T., Roman, E., Irving, J.A.E., Allan, J.M., Tomlinson, I.P., Taylor, M., Greaves, M. & Houlston, R.S. (2009) Loci on 7p12.2, 10q21.2 and 14q11.2 are associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*, **41**, 1006.

Papaemmanuil, E., Rapado, I., Li, Y., Potter, N.E., Wedge, D.C., Tubio, J., Alexandrov, L.B., Van Loo, P., Cooke, S.L., Marshall, J., Martincorena, I., Hinton, J., Gundem, G., van Delft, F.W., Nik-Zainal, S., Jones, D.R., Ramakrishna, M., Tittley, I., Stebbings, L., Leroy, C., et al (2014) RAG-mediated recombination is the predominant driver of oncogenic rearrangement in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*, **46**, 116.

Paulsson, K., Cazier, J.B., MacDougall, F., Stevens, J., Stasevich, I., Vrcelj, N., Chaplin, T., Lillington, D.M., Lister, T.A. & Young, B.D. (2008) Microdeletions are a general feature of adult and adolescent acute lymphoblastic leukemia: Unexpected similarities with pediatric disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 6708.

Paulsson, K., Forestier, E., Andersen, M.K., Autio, K., Barbany, G., Borgstrom, G., Cavelier, L., Golovleva, I., Heim, S., Heinonen, K., Hovland, R., Johannsson, J.H., Kjeldsen, E., Nordgren, A., Palmqvist, L., Johannsson, B., SCLSG, T.S.C.L.S.G. & NLCSG, A.T.N.L.C.S.G. (2013) High modal number and triple trisomies are highly correlated favorable factors in childhood B-cell precursor high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia treated according to the NOPHO ALL 1992/2000 protocols. *Haematologica*, **98**, 1424.

Paulsson, K., Forestier, E., Lilljebjorn, H., Heldrup, J., Behrendtz, M., Young, B.D. & Johannsson, B. (2010) Genetic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**, 21719.

Pui, C.-H. & Evans, W.E. (2006) Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, **354**, 166.

Pui, C.H., Carroll, A.J., Raimondi, S.C., Schell, M.J. & Head, D.R. (1992) Isochromosomes in childhood acute lymphoblastic leukemia: a collaborative study of 83 cases. *Blood*, **79**, 2384.

Pui, C.H., Carroll, W.L., Meshinchi, S. & Arceci, R.J. (2011) Biology, Risk Stratification, and Therapy of Pediatric Acute Leukemias: An Update. *Journal of Clinical Oncology*, **29**, 551.

Pui, C.H., Crist, W.M. & Look, A.T. (1990) Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **76**, 1449.

Pullarkat, V., Slovak, M.L., Kopecky, K.J., Forman, S.J. & Appelbaum, F.R. (2007) Impact of cytogenetics on the outcome of adult acute lymphoblastic leukemia: results of Southwest Oncology Group 9400 study. *Blood*, **111**, 2563.

### Q

Qazi, S. & Uckun, F.M. (2013) Incidence and biological significance of IKZF1/Ikaros gene deletions in pediatric Philadelphia chromosome negative and Philadelphia chromosome positive B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, **98**, e151.

Qazi, S., Ma, H. & Uckun, F.M. (2014) Absence of genomic Ikaros/IKZF1 deletions in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *International Journal of Molecular Medical Science*, **3**, 72.

### R

Rebollo, A. & Schmitt, C. (2003) Ikaros, Aiolos and Helios: Transcription regulators and lymphoid malignancies. *Immunology and Cell Biology*, **81**, 171.

Ribera, J., Morgades, M., Zamora, L., Montesinos, P., Gómez-Seguí, I., Pratcorona, M., Sarrà, J., Guàrdia, R., Nomdedeu, J., Tormo, M., Martínez-Lopez, J., Hernández-Rivas, J.-M., González-Campos, J., Barba, P., Escoda, L., Genescà, E., Solé, F., Millá, F. & Feliu, E. (2015) Prognostic significance of copy number alterations in adolescent and adult patients with precursor B acute lymphoblastic leukemia enrolled in PETHEMA protocols. *Cancer*, **121**, 3809.

Roberts, K.G. & Mullighan, C.G. (2015) Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: insights and treatment implications. *Nature Reviews Clinical Oncology*, **12**, 344.

Roberts, K.G., Li, Y., Payne-Turner, D., Harvey, R.C., Yang, Y.-L., Pei, D., McCastlain, K., Ding, L., Lu, C., Song, G., Ma, J., Becksfort, J., Rusch, M., Chen, S.-C., Easton, J., Cheng, J., Boggs, K., Santiago-Morales, N., Iacobucci, I., Fulton, R.S., et al (2014) Targetable Kinase-Activating Lesions in Ph-like Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, **371**, 1005.

Roberts, K.G., Morin, R.D., Zhang, J., Hirst, M., Zhao, Y., Su, X., Chen, S.-C., Payne-Turner, D., Churchman, M.L., Harvey, R.C., Chen, X., Kasap, C., Yan, C., Becksfort, J., Finney, R.P., Teachey, D.T., Maude, S.L., Tse, K., Moore, R., Jones, S., et al (2012) Genetic alterations activating kinase and cytokine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*, **22**, 153–66.

Ruiz, A., Jiang, J., Kempfski, H. & Brady, H.J.M. (2004) Overexpression of the Ikaros 6 isoform is restricted to t(4;11) acute lymphoblastic leukaemia in children and infants and has a role in B-cell survival. *British Journal of Haematology*, **125**, 31.

Russell, L.J., Capasso, M., Vater, I., Akasaka, T., Bernard, O.A., Calasanz, M.J., Chandrasekaran, T., Chapiro, E., Gesk, S., Griffiths, M., Guttery, D.S., Haferlach, C., Harder, L., Heidenreich, O., Irving, J., Kearney, L., Nguyen-Khac, F., Machado, L., Minto, L., Majid, A., et al (2009) Deregulated expression of cytokine receptor gene, CRLF2, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **114**, 2688.

## S

Sarhadi, V.K., Lahti, L., Scheinin, I., Tyybäkinoja, A., Savola, S., Usvasalo, A., Rätty, R., Elonen, E., Ellonen, P., Saarinen-Pihkala, U.M. & Knuutila, S. (2013) Targeted resequencing of 9p in acute lymphoblastic leukemia yields concordant results with array CGH and reveals novel genomic alterations. *Genomics*, **102**, 182.

Schwab, C.J., Jones, L.R., Morrison, H., Ryan, S.L., Yigittop, H., Schouten, J.P. & Harrison, C.J. (2010) Evaluation of Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification as a Method for the Detection of Copy Number Abnormalities in B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Genes, Chromosomes and Cancer*, **49**, 1104.

Secker-Walker, L.M., Prentice, H.G., Durrant, J., Richards, S., Hall, E. & Harrison, G. (1997) Cytogenetics adds independent prognostic information in adults with acute lymphoblastic leukaemia on MRC trial UKALL XA. *British Journal of Haematology*, **96**, 601.

Shah, S., Schrader, K.A., Waanders, E., Timms, A.E., Vijai, J., Miething, C., Wechsler, J., Yang, J., Hayes, J., Klein, R.J., Zhang, J., Wei, L., Wu, G., Rusch, M., Nagahawatte, P., Ma, J., Chen, S.-C., Song, G., Cheng, J., Meyers, P., et al (2013) A recurrent germline PAX5 mutation confers susceptibility to pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*, **45**, 1226.

Sherborne, A.L., Hosking, F.J., Prasad, R.B., Kumar, R., Koehler, R., Vijayakrishnan, J., Papaemmanuil, E., Bartram, C.R., Stanulla, M., Schrappe, M., Gast,

A., Dobbins, S.E., Ma, Y., Sheridan, E., Taylor, M., Kinsey, S.E., Lightfoot, T., Roman, E., Irving, J.A.E., Allan, J.M., et al (2010) Variation in CDKN2A at 9p21.3 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk. *Nature Genetics*, **42**, 492.

Shippey, C.A., Lawlor, E. & Secker, L.M. (1989) Isochromosome 9q in acute lymphoblastic leukemia: a new non-random finding. *Leukemia*, **3**, 195.

Shurtleff, S.A., Buijs, A., Behm, F.G. & Rubnitz, J.E. (1995) TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t (12; 21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia*, **9**, 1985.

Staunton, J., Huard, C., Pui, C.-H., Gilliland, D.G. & Look, A.T. (2002) Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*, **1**, 75.

Sun, L., Crotty, M.L., Sensel, M., Sather, H., Navara, C., Nachman, J., Steinherz, P.G., Gaynon, P.S., Seibel, N., Mao, C., Vassilev, A., Reaman, G.H. & Uckun, F.M. (1999a) Expression of dominant-negative Ikaros isoforms in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clinical Cancer Research*, **5**, 2112.

Sun, L., Goodman, P.A., Wood, C.M., Crotty, M.L., Sensel, M., Sather, H., Navara, C., Nachman, J., Steinherz, P.G., Gaynon, P.S., Seibel, N., Vassilev, A., Juran, B.D., Reaman, G.H. & Uckun, F.M. (1999b) Expression of aberrantly spliced oncogenic Ikaros isoforms in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **17**, 3753.

Sun, L., Heerema, N., Crotty, L., Wu, X., Navara, C., Vassilev, A., Sensel, M., Reaman, G.H. & Uckun, F.M. (1999c) Expression of dominant-negative and mutant isoforms of the antileukemic transcription factor Ikaros in infant acute lymphoblastic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**, 680.

Sun, L., Liu, A. & Georgopoulos, K. (1996) Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. *The EMBO Journal*, **15**, 5358.

Swerdlow, S.H., Campo, E. & Harris, N.L. (2008) WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France. IARC Press.

## T

Taylor, G.M. & Birch, J.M. (1996) The hereditary basis of human leukemia. Philadelphia, PA. Sunreed.

Thelander, E.F., Ichimura, K., Corcoran, M., Barbany, G., Nordgren, A., Heyman, M., Berglund, M., Mungall, A., Rosenquist, R., Grandér, D., Larsson, C. & Lagercrantz, S. (2008) Characterization of 6q deletions in mature B cell lymphomas and childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, **49**, 477.

Thomas, D.A., Cortes, J., O'Brien, S. & Pierce, S. (1999) Hyper-CVAD program in Burkitt's-type adult acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, **17**, 2461.

Tokunaga, K., Yamaguchi, S., Iwanaga, E., Nanri, T., Shimomura, T., Suzushima, H., Mitsuya, H. & Asou, N. (2013) High frequency of IKZF1 genetic alterations in adult patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia. *European Journal of Haematology*, **91**, 201.

Tonnelle, C. (2001) Forced expression of the Ikaros 6 isoform in human placental blood CD34+ cells impairs their ability to differentiate toward the B-lymphoid lineage. *Blood*, **98**, 2673.

Treviño, L.R., Yang, W., French, D., Hunger, S.P., Carroll, W.L., Devidas, M., Willman, C., Neale, G., Downing, J., Raimondi, S.C., Pui, C.-H., Evans, W.E. & Relling, M.V. (2009) Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*, **41**, 1001.

## U

Usvasalo, A., Savola, S., Rätty, R. & Vettenranta, K. (2008) CDKN2A deletions in acute lymphoblastic leukemia of adolescents and young adults—An array CGH study. *Leukemia Research*, **32**, 1228.

## V

van der Veer, A., Waanders, E., Pieters, R., Willemse, M.E., Van Reijmersdal, S.V., Russell, L.J., Harrison, C.J., Evans, W.E., van der Velden, V.H.J., Hoogerbrugge, P.M., Van Leeuwen, F., Escherich, G., Horstmann, M.A., Khankahdani, L.M., Rizopoulos, D., De Groot-Kruseman, H.A., Sonneveld, E., Kuiper, R.P. & Boer, Den, M.L. (2013a) Independent prognostic value of BCR-ABL1-like signature and IKZF1 deletion, but not high CRLF2 expression, in children with B-cell precursor ALL. *Blood*, **122**, 2622–9.

van der Veer, A., Zaliouva, M., Mottadelli, F., De Lorenzo, P., Kronnie, Te, G., Harrison, C.J., Cavé, H., Trka, J., Saha, V., Schrappe, M., Pieters, R., Biondi, A.,

Valsecchi, M.G., Stanulla, M., Boer, Den, M.L. & Cazzaniga, G. (2013b) IKZF1 status as a prognostic feature in BCR-ABL1-positive childhood ALL. *Blood*, **123**, 1691–8

Van Vlierberghe, P., Palomero, T. & Khiabanian, H. (2010) PHF6 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature*, **42**, 338.

Virely, C., Moulin, S., Cobaleda, C., Lasgi, C., Alberdi, A., Soulier, J., Sigaux, F., Chan, S., Kastner, P. & Ghysdael, J. (2010) Haploinsufficiency of the IKZF1 (IKAROS) tumor suppressor gene cooperates with BCR-ABL in a transgenic model of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, **24**, 1200.

Vitanza, N.A., Zaky, W., Blum, R., Meyer, J.A., Wang, J., Bhatla, T., Morrison, D.J., Raetz, E.A. & Carroll, W.L. (2014) Ikaros deletions in BCR-ABL-negative childhood acute lymphoblastic leukemia are associated with a distinct gene expression signature but do not result in intrinsic chemoresistance. *Pediatric Blood & Cancer*, **61**, 1779.

Volejnikova, J., Mejstrikova, E., Dörge, P., Meissner, B., Zimmermannova, O., Svojgr, K., Stanulla, M., Cario, G., Schrappe, M., Stary, J., Hrusak, O., Trka, J. & Fronkova, E. (2012) Ikaros ( IKZF1 ) alterations and minimal residual disease at day 15 assessed by flow cytometry predict prognosis of childhood BCR / ABL -negative acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Blood & Cancer*, **60**, 420.

## W

Waanders, E., van der Velden, V. & van der Schoot, C.E. (2010) Integrated use of minimal residual disease classification and IKZF1 alteration status accurately predicts 79% of relapses in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, **25**, 254.

Westman, B.J., Mackay, J.P. & Gell, D. (2002) Ikaros: a key regulator of haematopoiesis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **34**, 1304.

Wetzler, M., Dodge, R.K., Mrozek, K. & Carroll, A.J. (1999) Prospective karyotype analysis in adult acute lymphoblastic leukemia: the cancer and leukemia Group B experience. *Blood*, **93**, 3983.

Winandy, S., Wu, P. & Georgopoulos, K. (1995) A dominant mutation in the Ikaros gene leads to rapid development of leukemia and lymphoma. *Cell*, **83**, 289.

Wood, A., Pui, C.H. & Evans, W.E. (1998) Acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*, **339**, 605.

**X**

Xu, H., Yang, W., Perez-Andreu, V., Devidas, M., Fan, Y., Cheng, C., Pei, D., Scheet, P., Burchard, E.G., Eng, C., Huntsman, S., Torgerson, D.G., Dean, M., Winick, N.J., Martin, P.L., Camitta, B.M., Bowman, W.P., Willman, C.L., Carroll, W.L., Mullighan, C.G., et al (2013) Novel Susceptibility Variants at 10p12.31-12.2 for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in Ethnically Diverse Populations. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, **105**, 733.

**Y**

Yagi, T., Hibi, S., Takanashi, M., Kano, G., Tabata, Y., Imamura, T., Inaba, T., Morimoto, A., Todo, S. & Imashuku, S. (2002) High frequency of Ikaros isoform 6 expression in acute myelomonocytic and monocytic leukemias: implications for up-regulation of the antiapoptotic protein Bcl-XL in leukemogenesis. *Blood*, **99**, 1350–5.

Yang, Y.-L., Hung, C.-C., Chen, J.-S., Lin, K.-H., Jou, S.-T., Hsiao, C.-C., Sheen, J.-M., Cheng, C.-N., Wu, K.-H., Lin, S.-R., Yu, S.-L., Chen, H.-Y., Lu, M.-Y., Wang, S.-C., Chang, H.-H., Lin, S.-W., Su, Y.-N. & Lin, D.-T. (2011) IKZF1 deletions predict a poor prognosis in children with B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia: A multicenter analysis in Taiwan. *Cancer Science*, **102**, 1874.

Yeoh, E.-J., Ross, M.E., Shurtleff, S.A., Williams, W.K., Patel, D., Mahfouz, R., Behm, F.G., Raimondi, S.C., Relling, M.V., Patel, A., Cheng, C., Campana, D., Wilkins, D., Zhou, X., Li, J., Liu, H., Pui, C.-H., Evans, W.E., Naeve, C., Wong, L., et al (2002) Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell*, **1**, 133.

**Z**

Zhang, J., Ding, L., Holmfeldt, L., Wu, G., Heatley, S.L., Payne-Turner, D., Easton, J., Chen, X., Wang, J., Rusch, M., Lu, C., Chen, S.-C., Wei, L., Collins-Underwood, J.R., Ma, J., Roberts, K.G., Pounds, S.B., Ulyanov, A., Becksfort, J., Gupta, P., et al (2012) The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, **481**, 157.

Zhu, X., Asa, S.L. & Ezzat, S. (2007) Ikaros Is Regulated through Multiple Histone Modifications and Deoxyribonucleic Acid Methylation in the Pituitary. *Molecular Endocrinology*, **21**, 1205.



## **9.TABLAS SUPLEMENTARIAS**



**Tabla Suplementaria 1.** Asociación de los pacientes con cariotipo valorable y no valorable con las diferentes variables y el pronóstico.

|  | Cariotipo valorable<br>n (%) | Cariotipo no valorable<br>n (%) | P            |
|--|------------------------------|---------------------------------|--------------|
| Cariotipo realizado (n=332)                  | n= 260                       | n= 72                           |              |
| <b>Características demográficas</b>          |                              |                                 |              |
| sexo masculino                               | 142 (55)                     | 46 (64)                         | 0,101        |
| edad (años), media                           | 23                           | 23                              | 0,960        |
| ≤ 1 año                                      | 7 (3)                        | 1 (1)                           | 0,453        |
| > 1 - 9 años                                 | 109 (42)                     | 24 (33)                         | 0,118        |
| 10 - 14 años                                 | 12 (5)                       | 9 (12)                          | <b>0,020</b> |
| 15 - 30 años                                 | 47 (18)                      | 17 (24)                         | 0,187        |
| 31 - 64 años                                 | 70 (27)                      | 15 (21)                         | 0,186        |
| ≥ 65 años                                    | 15 (6)                       | 6 (8)                           | 0,291        |
| <b>Características clínico-biológicas</b>    |                              |                                 |              |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L), media      | 47,7                         | 36,1                            | 0,251        |
| Hemoglobina (g/dL), media                    | 8,8                          | 8,9                             | 0,840        |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L), media       | 88                           | 84                              | 0,745        |
| Blastos en MO (%), media                     | 86                           | 86                              | 0,808        |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                       | 15 (6)                       | 10 (15)                         | <b>0,022</b> |
| LDH elevada                                  | 194 (78)                     | 50 (74)                         | 0,253        |
| Infiltración del SNC                         | 5 (2)                        | 3 (5)                           | 0,269        |
| masa mediastínica                            | 6 (10)                       | 4 (17)                          | 0,273        |
| Adenopatías                                  | 46 (26)                      | 11 (25)                         | 0,523        |
| Hepatomegalia                                | 47 (27)                      | 16 (36)                         | 0,145        |
| Esplenomegalia                               | 53 (30)                      | 17 (39)                         | 0,182        |
| <b>Inmunofenotipo</b>                        |                              |                                 |              |
| Fenotipo B                                   | 230 (90)                     | 55 (78)                         | <b>0,007</b> |
| Pro-B o B nula                               | 31 (12)                      | 3 (4)                           | <b>0,037</b> |
| B común                                      | 151 (58)                     | 40 (56)                         | 0,401        |
| Pre-B  | 45 (17)                      | 12 (17)                         | 0,528        |
| Fenotipo T                                   | 26 (10)                      | 16 (22)                         | <b>0,007</b> |
| Pre-T (supracortical)                        | 5 (2)                        | 5 (7)                           | <b>0,043</b> |
| T cortical (común)                           | 12 (5)                       | 9 (13)                          | <b>0,020</b> |
| T madura                                     | 4 (2)                        | 1 (1)                           | 0,703        |
| <b>Respuesta al tratamiento de inducción</b> |                              |                                 |              |
| Respuesta lenta                              | 49 (21)                      | 18 (28)                         | 0,332        |
| Tasa de RC                                   | 344 (96)                     | 64 (94)                         | 0,391        |
| Resistencia                                  | 11 (4)                       | 4 (6)                           | 0,391        |
| Mortalidad                                   | 13 (5)                       | 4 (6)                           | 0,502        |
| <b>Supervivencia</b>                         |                              |                                 |              |
| SG a los 3 años                              | 66%                          | 66%                             | 0,921        |
| SLR a los 3 años                             | 71%                          | 65%                             | 0,678        |
| CIR a los 3 años                             | 25%                          | 35%                             | 0,253        |

**Tabla Suplementaria 2.** Asociación de los pacientes con cariotipo normal con las diferentes variables y el pronóstico.

|  | Cariotipo normal<br>n (%) | Cariotipo con<br>anomalías<br>n (%) | P            |
|--|---------------------------|-------------------------------------|--------------|
| Cariotipo valorable (n=260)                  | n= 44 (100%)              | n=216 (100%)                        |              |
| <b>Características demográficas</b>          |                           |                                     |              |
| Sexo masculino                               | 27 (61)                   | 115 (53)                            | 0,206        |
| Edad (años), media                           | 27                        | 22                                  | 0,130        |
| ≤ 1 año                                      | 1 (2)                     | 6 (3)                               | 0,663        |
| > 1 - 9 años                                 | 11 (25)                   | 98 (45)                             | <b>0,009</b> |
| 10 - 14 años                                 | 2 (5)                     | 10 (4)                              | 0,669        |
| 15 - 30 años                                 | 12 (27)                   | 35 (16)                             | 0,068        |
| 31 - 64 años                                 | 17 (39)                   | 53 (25)                             | <b>0,044</b> |
| ≥ 65 años                                    | 1 (2)                     | 14 (7)                              | 0,243        |
| <b>Características clínico-biológicas</b>    |                           |                                     |              |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L), media      | 35,2                      | 50,3                                | 0,365        |
| Hemoglobina (g/dL), media                    | 9,8                       | 8,6                                 | <b>0,010</b> |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L), media       | 133                       | 78                                  | <b>0,003</b> |
| Blastos en MO (%), media                     | 82                        | 87                                  | 0,107        |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                       | 3 (7)                     | 12 (6)                              | 0,494        |
| LDH elevada                                  | 32 (74)                   | 162 (79)                            | 0,315        |
| Infiltración del SNC                         | 3 (8)                     | 2 (1)                               | 0,052        |
| Masa mediastínica                            | 2 (12)                    | 4 (9)                               | 0,540        |
| Adenopatías                                  | 11 (34)                   | 35 (24)                             | 0,170        |
| Hepatomegalia                                | 8 (25)                    | 39 (27)                             | 0,492        |
| Esplenomegalia                               | 7(22)                     | 46 (32)                             | 0,182        |
| <b>Inmunofenotipo</b>                        |                           |                                     |              |
| Fenotipo B                                   | 32(74)                    | 198 (93)                            | <b>0,001</b> |
| Pro-B o B nula                               | 6 (14)                    | 25 (12)                             | 0,432        |
| B común                                      | 20 (46)                   | 131 (61)                            | <b>0,046</b> |
| Pre-B  | 4 (9)                     | 41 (19)                             | 0,081        |
| Fenotipo T                                   | 11 (26)                   | 15 (7)                              | <b>0,001</b> |
| Pre-T (supracortical)                        | 2 (5)                     | 3 (1)                               | 0,200        |
| T cortical (común)                           | 5 (11)                    | 7 (3)                               | <b>0,035</b> |
| <b>Respuesta al tratamiento de inducción</b> |                           |                                     |              |
| Respuesta lenta                              | 10 (27)                   | 37 (20)                             | 0,215        |
| Tasa de RC                                   | 40 (98)                   | 196 (96)                            | 0,481        |
| Resistencia                                  | 1 (2)                     | 9 (5)                               | 0,481        |
| Mortalidad                                   | 3 (7)                     | 9 (4)                               | 0,335        |
| <b>Supervivencia</b>                         |                           |                                     |              |
| SG a los 3 años                              | 61%                       | 67%                                 | 0,428        |
| SLR a los 3 años                             | 63%                       | 70%                                 | 0,541        |
| CIR a los 3 años                             | 30%                       | 27%                                 | 0,710        |

**Tabla Suplementaria 3.** Asociación de los pacientes con la t(9;22) con las diferentes variables y el pronóstico.

|  | t(9;22)/<br>BCR-ABL | Resto de<br>casos | P                 | Cariotipo<br>normal | P                 |
|--|---------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
| Cariotipo valorable (n=260)                  | n=36                | n=224             |                   | n=44                |                   |
| <b>Características demográficas</b>          |                     |                   |                   |                     |                   |
| Sexo masculino                               | 18 (50)             | 124 (55)          | 0,337             | 27 (61)             | 0,428             |
| Edad (años), media                           | 46                  | 19                | <b>&lt; 0,001</b> | 27                  | <b>&lt; 0,001</b> |
| ≤ 1 año                                      | 0 (0)               | 7 (3)             | 0,348             | 1 (2)               | 0,550             |
| > 1 - 9 años                                 | 2 (6)               | 107 (48)          | <b>&lt; 0,001</b> | 11 (25)             | <b>0,041</b>      |
| 10 - 14 años                                 | 2 (6)               | 10 (5)            | 0,515             | 2 (5)               | 0,613             |
| 15 - 30 años                                 | 3 (8)               | 44 (20)           | 0,073             | 12 (27)             | 0,061             |
| 31 - 64 años                                 | 23 (64)             | 47 (21)           | <b>&lt; 0,001</b> | 17 (39)             | <b>0,043</b>      |
| ≥ 65 años                                    | 6 (17)              | 9 (4)             | <b>&lt; 0,001</b> | 1 (2)               | 0,030             |
| <b>Características clínico-biológicas</b>    |                     |                   |                   |                     |                   |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L), media      | 53,9                | 46,7              | 0,677             | 35,2                | 0,404             |
| Hemoglobina (g/dL), media                    | 9,8                 | 8,6               | <b>0,018</b>      | 9,8                 | 0,972             |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L), media       | 90                  | 88                | 0,874             | 133                 | 0,051             |
| Blastos en MO (%), media                     | 81                  | 87                | 0,115             | 82                  | 0,820             |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                       | 4 (11)              | 11 (5)            | 0,141             | 3 (7)               | 0,385             |
| LDH elevada                                  | 26 (75)             | 168 (79)          | 0,340             | 32 (74)             | 0,989             |
| Infiltración del SNC                         | 0 (0)               | 5 (3)             | 0,412             | 3 (8)               | 0,159             |
| Masa mediastínica                            | 0 (0)               | 6 (3)             | 0,221             | 2 (5)               | 0,313             |
| Adenopatías                                  | 4 (13)              | 42 (29)           | <b>0,038</b>      | 11 (34)             | <b>0,037</b>      |
| Hepatomegalia                                | 3 (10)              | 44(31)            | <b>0,011</b>      | 8 (25)              | 0,101             |
| Esplenomegalia                               | 5 (16)              | 48 (33)           | <b>0,035</b>      | 7(22)               | 0,375             |
| <b>Inmunofenotipo</b>                        |                     |                   |                   |                     |                   |
| Fenotipo B                                   | 35 (100)            | 195 (88)          | <b>0,018</b>      | 32(74)              | <b>0,001</b>      |
| Pro-B o B nula                               | 3 (8)               | 28 (13)           | 0,347             | 6 (14)              | 0,352             |
| B común                                      | 26 (72)             | 125 (56)          | <b>0,045</b>      | 20 (46)             | <b>0,029</b>      |
| Pre-B  | 5(14)               | 40 (18)           | 0,378             | 4 (9)               | 0,372             |
| Fenotipo T                                   | 0 (0)               | 26 (12)           | <b>0,018</b>      | 11 (26)             | <b>0,001</b>      |
| Pre-T (supracortical)                        | 0 (0)               | 5 (2)             | 0,472             | 2 (5)               | 0,299             |
| T cortical (común)                           | 0 (0)               | 12 (5)            | 0,160             | 5 (11)              | <b>0,045</b>      |
| <b>Respuesta al tratamiento de inducción</b> |                     |                   |                   |                     |                   |
| Respuesta lenta                              | 6 (21)              | 41 (21)           | 0,544             | 37 (20)             | 0,820             |
| Tasa de RC                                   | 33 (94)             | 203 (96)          | 0,429             | 196 (96)            | 0,440             |
| Resistencia                                  | 2 (6)               | 8 (4)             | 0,429             | 9 (5)               | 0,440             |
| Mortalidad                                   | 1 (3)               | 11 (5)            | 0,481             | 9 (4)               | 0,387             |
| <b>Supervivencia</b>                         |                     |                   |                   |                     |                   |
| SG a los 3 años                              | 42%                 | 70%               | <b>0,009</b>      | 67%                 | 0,233             |
| SLR a los 3 años                             | 46%                 | 71%               | <b>0,017</b>      | 63%                 | 0,320             |
| CIR a los 3 años                             | 41%                 | 26%               | 0,096             | 30%                 | 0,257             |

**Tabla Suplementaria 4.** Asociación de los pacientes con reordenamientos de *MLL* con las diferentes variables y el pronóstico.

|  | t(11q23)/MLL<br>n (%) | Resto de casos<br>n (%) | P                 | CN<br>n (%) | P                 |
|--|-----------------------|-------------------------|-------------------|-------------|-------------------|
| Cariotipo valorable (n=260)                  | n=19                  | n= 241                  |                   | n=44        |                   |
| <b>Características demográficas</b>          |                       |                         |                   |             |                   |
| Sexo masculino                               | 8 (42)                | 134 (56)                | 0,184             | 27 (61)     | 0,256             |
| Edad (años), media                           | 25                    | 23                      | 0,698             | 27          | 0,719             |
| ≤ 1 año                                      | 4 (21)                | 3(1)                    | <b>0,001</b>      | 1 (2)       | <b>0,026</b>      |
| > 1 - 9 años                                 | 4 (21)                | 105 (44)                | <b>0,044</b>      | 11 (25)     | 0,503             |
| 10 - 14 años                                 | 1 (5)                 | 11 (5)                  | 0,606             | 2 (5)       | 0,666             |
| 15 - 30 años                                 | 3 (16)                | 44 (18)                 | 0,539             | 12 (27)     | 0,260             |
| 31 - 64 años                                 | 6 (32)                | 64 (27)                 | 0,405             | 17 (39)     | 0,406             |
| ≥ 65 años                                    | 1 (5)                 | 14 (6)                  | 0,699             | 1 (2)       | 0,516             |
| <b>Características clínico-biológicas</b>    |                       |                         |                   |             |                   |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L), media      | 208,5                 | 34,9                    | <b>&lt; 0,001</b> | 35,2        | <b>&lt; 0,001</b> |
| Hemoglobina (g/dL), media                    | 7,7                   | 8,9                     | 0,101             | 9,8         | <b>0,010</b>      |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L), media       | 55                    | 90                      | <b>0,016</b>      | 133         | <b>&lt; 0,001</b> |
| Blastos en MO (%), media                     | 91                    | 86                      | 0,086             | 82          | 0,025             |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                       | 1 (6)                 | 14 (6)                  | 0,640             | 3 (7)       | 0,705             |
| LDH elevada                                  | 14 (87)               | 180 (78)                | 0,281             | 32 (74)     | 0,240             |
| Infiltración del SNC                         | 0 (0)                 | 5 (3)                   | 0,777             | 3 (8)       | 0,504             |
| Masa mediastínica                            | 0 (0)                 | 6 (11)                  | 0,654             | 2 (12)      | 0,648             |
| Adenopatías                                  | 3 (19)                | 43 (27)                 | 0,356             | 11 (34)     | 0,218             |
| Hepatomegalia                                | 8 (47)                | 39 (25)                 | <b>0,050</b>      | 8 (25)      | 0,212             |
| Esplenomegalia                               | 10 (60)               | 43 (27)                 | <b>0,009</b>      | 7(22)       | <b>0,012</b>      |
| <b>Inmunofenotipo</b>                        |                       |                         |                   |             |                   |
| Fenotipo B                                   | 18 (100)              | 212 (89)                | 0,136             | 32(74)      | <b>0,014</b>      |
| Pro-B o B nula                               | 14 (74)               | 17 (7)                  | <b>&lt; 0,001</b> | 6 (14)      | <b>&lt; 0,001</b> |
| B común                                      | 1 (5)                 | 150 (62)                | <b>&lt; 0,001</b> | 20 (46)     | <b>0,001</b>      |
| Pre-B  | 3 (16)                | 42 (17)                 | 0,576             | 4 (9)       | 0,353             |
| Fenotipo T                                   | 0 (0)                 | 26 (11)                 | 0,136             | 11 (26)     | <b>0,014</b>      |
| Pre-T (supracortical)                        | 0 (0)                 | 5 (2)                   | 0,682             | 2 (5)       | 0,484             |
| T cortical (común)                           | 0 (0)                 | 12 (5)                  | 0,394             | 5 (11)      | 0,155             |
| <b>Respuesta al tratamiento de inducción</b> |                       |                         |                   |             |                   |
| Respuesta lenta                              | 2 (13)                | 45 (21)                 | 0,317             | 37 (20)     | 0,215             |
| Tasa de RC                                   | 17 (94)               | 219 (96)                | 0,539             | 196 (96)    | 0,521             |
| Resistencia                                  | 1 (6)                 | 9 (4)                   | 0,539             | 9 (5)       | 0,521             |
| Mortalidad                                   | 0(0)                  | 12 (5)                  | 0,412             | 9 (4)       | 0,350             |
| <b>Supervivencia</b>                         |                       |                         |                   |             |                   |
| SG a los 3 años                              | 61%                   | 66%                     | 0,560             | 67%         | 0,961             |
| SLR a los 3 años                             | 56%                   | 70%                     | 0,084             | 63%         | 0,405             |
| CIR a los 3 años                             | 39%                   | 27%                     | 0,120             | 30%         | 0,345             |

**Tabla Suplementaria 5.** Asociación de los pacientes con la t(12;21) con las diferentes variables y el pronóstico.

|  | t(12;21)<br>(%) | n     | Resto de casos<br>n (%) | P                 | CN<br>n (%) | P                 |
|--|-----------------|-------|-------------------------|-------------------|-------------|-------------------|
| Cariotipo valorable (n=260)                  |                 | n= 34 | n= 226                  |                   | n=44        |                   |
| <b>Características demográficas</b>          |                 |       |                         |                   |             |                   |
| Sexo masculino                               | 21 (62)         |       | 121 (54)                | 0,239             | 27 (61)     | 0,579             |
| Edad (años), media                           | 4               |       | 26                      | <b>&lt; 0,001</b> | 27          | <b>&lt; 0,001</b> |
| ≤ 1 año                                      | 0 (0)           |       | 7 (3)                   | 0,370             | 1 (2)       | 0,564             |
| > 1 - 9 años                                 | 31 (91)         |       | 78 (35)                 | <b>&lt; 0,001</b> | 11 (25)     | <b>&lt; 0,001</b> |
| 10 - 14 años                                 | 3 (9)           |       | 9 (4)                   | 0,197             | 2 (5)       | 0,378             |
| 15 - 30 años                                 | 0 (0)           |       | 47 (21)                 | <b>0,001</b>      | 12 (27)     | <b>0,003</b>      |
| 31 - 64 años                                 | 0 (0)           |       | 70 (31)                 | <b>&lt; 0,001</b> | 17 (39)     | <b>&lt; 0,001</b> |
| ≥ 65 años                                    | 0 (0)           |       | 15 (7)                  | 0,115             | 1 (2)       | 0,564             |
| <b>Características clínico-biológicas</b>    |                 |       |                         |                   |             |                   |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L), media      | 28,3            |       | 50,7                    | <b>0,047</b>      | 35,2        | 0,701             |
| Hemoglobina (g/dL), media                    | 7,3             |       | 9                       | <b>&lt; 0,001</b> | 9,8         | <b>&lt; 0,001</b> |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L), media       | 55              |       | 93                      | <b>0,002</b>      | 133         | <b>&lt; 0,001</b> |
| Blastos en MO (%), media                     | 95              |       | 85                      | <b>&lt; 0,001</b> | 82          | <b>&lt; 0,001</b> |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                       | 0 (0)           |       | 15 (7)                  | 0,112             | 3 (7)       | 0,176             |
| LDH elevada                                  | 27 (87)         |       | 167 (77)                | 0,147             | 32 (74)     | 0,296             |
| Infiltración del SNC                         | 1 (4)           |       | 4 (2)                   | 0,482             | 3 (8)       | 0,500             |
| Masa mediastínica                            | 0 (0)           |       | 6 (10)                  | n.c.              | 2 (12)      | n.c.              |
| Adenopatías                                  | 2 (20)          |       | 44 (27)                 | 0,489             | 11 (34)     | 0,330             |
| Hepatomegalia                                | 3 (30)          |       | 44 (27)                 | 0,533             | 8 (25)      | 0,524             |
| Esplenomegalia                               | 4 (40)          |       | 49 (30)                 | 0,351             | 7(22)       | 0,229             |
| <b>Inmunofenotipo</b>                        |                 |       |                         |                   |             |                   |
| Fenotipo B                                   | 34 (100)        |       | 196 (88)                | <b>0,020</b>      | 32(74)      | <b>0,001</b>      |
| Pro-B o B nula                               | 0 (0)           |       | 31 (14)                 | <b>0,010</b>      | 6 (14)      | <b>0,027</b>      |
| B común                                      | 27 (79)         |       | 124 (55)                | <b>0,005</b>      | 20 (46)     | <b>0,002</b>      |
| Pre-B  | 7 (21)          |       | 38 (17)                 | 0,369             | 4 (9)       | 0,132             |
| Fenotipo T                                   | 0 (0)           |       | 26 (12)                 | <b>0,020</b>      | 11 (26)     | <b>0,001</b>      |
| Pre-T (supracortical)                        | 0 (0)           |       | 5 (2)                   | 0,493             | 2 (5)       | 0,315             |
| T cortical (común)                           | 0 (0)           |       | 12 (5)                  | 0,179             | 5 (11)      | 0,051             |
| <b>Respuesta al tratamiento de inducción</b> |                 |       |                         |                   |             |                   |
| Respuesta lenta                              | 6 (18)          |       | 41 (21)                 | 0,804             | 37 (20)     | 0,255             |
| Tasa de RC                                   | 34 (100)        |       | 202 (95)                | 0,219             | 196 (96)    | 0,547             |
| Resistencia                                  | 0 (0)           |       | 10 (5)                  | 0,219             | 9 (5)       | 0,547             |
| Mortalidad                                   | 0 (0)           |       | 12 (5)                  | 0,176             | 9 (4)       | 0,174             |
| <b>Supervivencia</b>                         |                 |       |                         |                   |             |                   |
| SG a los 3 años                              | 100%            |       | 60%                     | <b>&lt; 0,001</b> | 67%         | <b>&lt; 0,001</b> |
| SLR a los 3 años                             | 93%             |       | 66%                     | <b>0,005</b>      | 63%         | <b>0,004</b>      |
| IRC a los 3 años                             | 7%              |       | 30%                     | <b>0,013</b>      | 30%         | <b>0,023</b>      |

**Tabla Suplementaria 6.** Asociación de los pacientes con hiperdiploidía alta con las diferentes variables y el pronóstico.

|  | Hiperdiploidía alta<br>n (%) | Resto de casos<br>n (%) | P                 | CN<br>n (%) | P                 |
|--|------------------------------|-------------------------|-------------------|-------------|-------------------|
| Cariotipo valorable (n=260)                  | n= 50                        | n= 210                  |                   | n=44        |                   |
| <b>Características demográficas</b>          |                              |                         |                   |             |                   |
| Sexo masculino                               | 31 (62)                      | 11 (53)                 | 0,313             | 27 (61)     | 0,559             |
| Edad (años), media                           | 12                           | 25                      | <b>&lt; 0,001</b> | 27          | <b>&lt; 0,001</b> |
| ≤ 1 año                                      | 1 (2)                        | 6 (3)                   | 0,597             | 1 (2)       | 0,720             |
| > 1 - 9 años                                 | 38 (76)                      | 71 (34)                 | <b>&lt; 0,001</b> | 11 (25)     | <b>&lt; 0,001</b> |
| 10 - 14 años                                 | 1 (2)                        | 11 (5)                  | 0,291             | 2 (5)       | 0,452             |
| 15 - 30 años                                 | 4 (8)                        | 43 (20)                 | 0,063             | 12 (27)     | 0,027             |
| 31 - 64 años                                 | 3 (6)                        | 67 (32)                 | <b>&lt; 0,001</b> | 17 (39)     | <b>&lt; 0,001</b> |
| ≥ 65 años                                    | 3 (6)                        | 12 (6)                  | 0,578             | 1 (2)       | 0,358             |
| <b>Características clínico-biológicas</b>    |                              |                         |                   |             |                   |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L), media      | 13,2                         | 55,9                    | <b>&lt; 0,001</b> | 35,2        | 0,167             |
| Hemoglobina (g/dL), media                    | 7,9                          | 9                       | <b>0,010</b>      | 9,8         | <b>&lt; 0,001</b> |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L), media       | 60                           | 95                      | <b>0,005</b>      | 133         | <b>&lt; 0,001</b> |
| Blastos en MO (%), media                     | 91                           | 85                      | <b>0,034</b>      | 82          | <b>0,016</b>      |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                       | 0 (0)                        | 15 (8)                  | <b>0,032</b>      | 3 (7)       | 0,095             |
| LDH elevada                                  | 34 (71)                      | 160 (80)                | 0,235             | 32 (74)     | 0,442             |
| Infiltración del SNC                         | 0 (0)                        | 5 (3)                   | 0,788             | 3 (8)       | 0,189             |
| Masa mediastínica                            | 0 (0)                        | 6 (11)                  | 0,522             | 2 (12)      | 0,538             |
| Adenopatías                                  | 8 (29)                       | 38 (26)                 | 0,932             | 11 (34)     | 0,838             |
| Hepatomegalia                                | 14 (50)                      | 33 (22)                 | <b>0,005</b>      | 8 (25)      | 0,041             |
| Esplenomegalia                               | 13 (46)                      | 40 (27)                 | <b>0,036</b>      | 7(22)       | 0,041             |
| <b>Inmunofenotipo</b>                        |                              |                         |                   |             |                   |
| Fenotipo B                                   | 50 (100)                     | 180 (87)                | <b>0,017</b>      | 32(74)      | <b>&lt; 0,001</b> |
| Pro-B o B nula                               | 3 (6)                        | 28 (13)                 | 0,232             | 6 (14)      | 0,183             |
| B común                                      | 39 (78)                      | 112 (53)                | <b>0,003</b>      | 20 (46)     | <b>0,002</b>      |
| Pre-B  | 8 (16)                       | 37 (18)                 | 0,949             | 4 (9)       | 0,246             |
| Fenotipo T                                   | 0 (0)                        | 23 (13)                 | <b>0,017</b>      | 11 (26)     | <b>&lt; 0,001</b> |
| Pre-T (supracortical)                        | 0 (0)                        | 5 (2)                   | 0,341             | 2 (5)       | 0,216             |
| T cortical (común)                           | 0 (0)                        | 12 (6)                  | 0,072             | 5 (11)      | <b>0,020</b>      |
| <b>Respuesta al tratamiento de inducción</b> |                              |                         |                   |             |                   |
| Respuesta lenta                              | 7 (16)                       | 40 (22)                 | 0,455             | 37 (20)     | 0,158             |
| Tasa de RC                                   | 46 (98)                      | 190 (95)                | 0,399             | 196 (96)    | 0,718             |
| Resistencia                                  | 1 (2)                        | 9 (5)                   | 0,399             | 9 (5)       | 0,718             |
| Mortalidad                                   | 3 (6)                        | 9 (4)                   | 0,421             | 9 (4)       | 0,598             |
| <b>Supervivencia</b>                         |                              |                         |                   |             |                   |
| SG a los 3 años                              | 80%                          | 63%                     | <b>0,034</b>      | 67%         | 0,057             |
| SLR a los 3 años                             | 87%                          | 66%                     | <b>0,017</b>      | 63%         | <b>0,024</b>      |
| CIR a los 3 años                             | 12%                          | 30%                     | <b>0,019</b>      | 30%         | 0,054             |

**Tabla Suplementaria 7.** Asociación de los pacientes con del(9p) con las diferentes variables y el pronóstico.

|  | del(9p)<br>n (%) | Resto<br>n (%) | P     | CN<br>n (%) | P            |
|--|------------------|----------------|-------|-------------|--------------|
| Cariotipo valorable (n=260)                  | n= 5             | n= 255         |       | n= 44       |              |
| <b>Características demográficas</b>          |                  |                |       |             |              |
| Sexo masculino                               | 1 (20)           | 141 (55)       | 0,133 | 27 (61)     | 0,099        |
| Edad (años), media                           | 10               | 23             | 0,182 | 27          | 0,065        |
| ≤ 1 año                                      | 0 (0)            | 7 (3)          | 0,872 | 1 (2)       | 0,898        |
| > 1 - 9 años                                 | 4 (80)           | 105 (41)       | 0,100 | 11 (25)     | <b>0,026</b> |
| 10 - 14 años                                 | 0 (0)            | 12 (5)         | 0,788 | 2 (5)       | 0,804        |
| 15 - 30 años                                 | 0 (0)            | 47 (18)        | 0,366 | 12 (27)     | 0,229        |
| 31 - 64 años                                 | 1 (29)           | 69 (27)        | 0,592 | 17 (39)     | 0,386        |
| ≥ 65 años                                    | 0 (0)            | 15 (6)         | 0,741 | 1 (2)       | 0,898        |
| <b>Características clínico-biológicas</b>    |                  |                |       |             |              |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L), media      | 74,6             | 47,2           | 0,512 | 35,2        | 0,404        |
| Hemoglobina (g/dL), media                    | 8                | 8,8            | 0,480 | 9,8         | 0,158        |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L), media       | 55               | 89             | 0,414 | 133         | 0,136        |
| Blastos en MO (%), media                     | 80               | 86             | 0,406 | 82          | 0,853        |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                       | 0 (0)            | 15 (6)         | 0,732 | 3 (7)       | 0,714        |
| LDH elevada                                  | 5 (100)          | 189 (78)       | 0,290 | 32 (74)     | 0,255        |
| Infiltración del SNC                         | 0 (0)            | 5 (3)          | 0,883 | 3 (8)       | 0,696        |
| Masa mediastínica                            | 0 (0)            | 6 (10)         | 0,902 | 2 (12)      | 0,899        |
| Adenopatías                                  | 1 (50)           | 45 (26)        | 0,456 | 11 (34)     | 0,588        |
| Hepatomegalia                                | 0 (0)            | 47 (27)        | 0,534 | 8 (25)      | 0,579        |
| Esplenomegalia                               | 1 (50)           | 52 (30)        | 0,513 | 7(22)       | 0,421        |
| <b>Inmunofenotipo</b>                        |                  |                |       |             |              |
| Fenotipo B                                   | 5 (100)          | 225 (90)       | 0,583 | 32(74)      | 0,255        |
| Pro-B o B nula                               | 0 (0)            | 31 (12)        | 0,527 | 6 (14)      | 0,505        |
| B común                                      | 3 (60)           | 148 (58)       | 0,650 | 20 (46)     | 0,440        |
| Pre-B  | 2 (40)           | 43 (17)        | 0,208 | 4 (9)       | 0,107        |
| Fenotipo T                                   | 0 (0)            | 26 (10)        | 0,583 | 11 (26)     | 0,255        |
| Pre-T (supracortical)                        | 0 (0)            | 5 (2)          | 0,907 | 2 (5)       | 0,804        |
| T cortical (común)                           | 0 (0)            | 12 (5)         | 0,788 | 5 (11)      | 0,570        |
| <b>Respuesta al tratamiento de inducción</b> |                  |                |       |             |              |
| Respuesta lenta                              | 0 (0)            | 47 (21)        | 0,31  | 37 (20)     | 0,237        |
| Tasa de RC                                   | 5 (100)          | 231(96)        | 0,811 | 196 (96)    | 0,891        |
| Resistencia                                  | 0 (0)            | 10 (4)         | 0,811 | 9 (5)       | 0,891        |
| Mortalidad                                   | 0 (0)            | 12 (5)         | 0,787 | 9 (4)       | 0,719        |
| <b>Supervivencia</b>                         |                  |                |       |             |              |
| SG a los 3 años                              | 80%              | 66%            | 0,372 | 67%         | 0,319        |
| SLR a los 3 años                             | 80%              | 69%            | 0,465 | 63%         | 0,465        |
| CIR a los 3 años                             | 20%              | 27%            | 0,574 | 30%         | 0,541        |

**Tabla Suplementaria 8.** Asociación de los pacientes con reordenamientos de 14q32 con las diferentes variables y el pronóstico.

|  | t(14)(q32)<br>n (%) | Resto de casos<br>n (%) | P     | CN<br>n (%) | P            |
|--|---------------------|-------------------------|-------|-------------|--------------|
| Cariotipo valorable (n=260)                  | n= 5                | n= 256                  |       | n= 44       |              |
| <b>Características demográficas</b>          |                     |                         |       |             |              |
| Sexo masculino                               | 2 (40)              | 140 (55)                | 0,413 | 27 (61)     | 0,325        |
| Edad (años), media                           | 25                  | 23                      | 0,841 | 27          | 0,807        |
| ≤ 1 año                                      | 0 (0)               | 7 (3)                   | 0,872 | 1 (2)       | 0,898        |
| > 1 - 9 años                                 | 1 (29)              | 108 (42)                | 0,302 | 11 (25)     | 0,644        |
| 10 - 14 años                                 | 0 (0)               | 12 (5)                  | 0,788 | 2 (5)       | 0,804        |
| 15 - 30 años                                 | 2 (40)              | 45 (18)                 | 0,223 | 12 (27)     | 0,445        |
| 31 - 64 años                                 | 2 (40)              | 68 (27)                 | 0,408 | 17 (39)     | 0,652        |
| ≥ 65 años                                    | 0 (0)               | 15 (6)                  | 0,741 | 1 (2)       | 0,898        |
| <b>Características clínico-biológicas</b>    |                     |                         |       |             |              |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L), media      | 29,3                | 48,1                    | 0,654 | 35,2        | 0,900        |
| Hemoglobina (g/dL), media                    | 9,3                 | 8,8                     | 0,687 | 9,8         | 0,683        |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L), media       | 82                  | 88                      | 0,891 | 133         | 0,076        |
| Blastos en MO (%), media                     | 90                  | 86                      | 0,591 | 82          | 0,339        |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                       | 1 (20)              | 14 (6)                  | 0,268 | 3 (7)       | 0,366        |
| LDH elevada                                  | 5 (100)             | 189 (78)                | 0,290 | 32 (74)     | 0,255        |
| Infiltración del SNC                         | 0 (0)               | 5 (3)                   | 0,928 | 3 (8)       | 0,801        |
| Masa mediastínica                            | 0 (0)               | 6 (10)                  | 0,811 | 2 (12)      | 0,795        |
| Adenopatías                                  | 1 (20)              | 45 (26)                 | 0,609 | 11 (34)     | 0,470        |
| Hepatomegalia                                | 1 (20)              | 47 (27)                 | 0,593 | 8 (25)      | 0,648        |
| Esplenomegalia                               | 1 (20)              | 52 (30)                 | 0,525 | 7(22)       | 0,708        |
| <b>Inmunofenotipo</b>                        |                     |                         |       |             |              |
| Fenotipo B                                   | 5 (100)             | 225 (90)                | 0,583 | 32(74)      | 0,255        |
| Pro-B o B nula                               | 0 (0)               | 31 (12)                 | 0,527 | 6 (14)      | 0,505        |
| B común                                      | 5 (100)             | 146 (57)                | 0,064 | 20 (46)     | <b>0,028</b> |
| Pre-B  | 0 (0)               | 45 (18)                 | 0,384 | 4 (9)       | 0,641        |
| Fenotipo T                                   | 0 (0)               | 26 (10)                 | 0,583 | 11 (26)     | 0,255        |
| Pre-T (supracortical)                        | 0 (0)               | 5 (2)                   | 0,907 | 2 (5)       | 0,804        |
| T cortical (común)                           | 0 (0)               | 12 (5)                  | 0,788 | 5 (11)      | 0,570        |
| <b>Respuesta al tratamiento de inducción</b> |                     |                         |       |             |              |
| Respuesta lenta                              | 2 (50)              | 45 (20)                 | 0,190 | 37 (20)     | 0,332        |
| Tasa de RC                                   | 4 (80)              | 232 (96)                | 0,232 | 196 (96)    | 0,208        |
| Resistencia                                  | 1 (20)              | 9 (4)                   | 0,232 | 9 (5)       | 0,208        |
| Mortalidad                                   | 0 (0)               | 12 (5)                  | 0,787 | 9 (4)       | 0,719        |
| <b>Supervivencia</b>                         |                     |                         |       |             |              |
| SG a los 3 años                              | 50%                 | 66%                     | 0,77  | 67%         | 0,981        |
| SLR a los 3 años                             | 50%                 | 70%                     | 0,079 | 63%         | 0,232        |
| CIR a los 3 años                             | 40%                 | 27%                     | 0,229 | 30%         | 0,380        |

**Tabla Suplementaria 9.** Asociación de las diferentes variables y el pronóstico con los pacientes con cariotipo complejo.

|  | Cariotipo complejo<br>n (%) | Resto de casos<br>n (%) | P            | CN<br>n (%) | P            |
|--|-----------------------------|-------------------------|--------------|-------------|--------------|
| Cariotipo valorable (n=260)                  | n= 6                        | n= 254                  |              | n= 44       |              |
| <b>Características demográficas</b>          |                             |                         |              |             |              |
| Sexo masculino                               | 3 (50)                      | 139 (55)                | 0,567        | 27 (61)     | 0,456        |
| Edad (años), media                           | 34                          | 23                      | 0,226        | 27          | 0,473        |
| ≤ 1 año                                      | 0 (0)                       | 7 (3)                   | 0,848        | 1 (2)       | 0,880        |
| > 1 - 9 años                                 | 0 (0)                       | 109 (43)                | <b>0,037</b> | 11 (25)     | 0,205        |
| 10 - 14 años                                 | 0 (0)                       | 12 (5)                  | 0,751        | 2 (5)       | 0,772        |
| 15 - 30 años                                 | 4 (67)                      | 43 (17)                 | <b>0,011</b> | 12 (27)     | 0,074        |
| 31 - 64 años                                 | 1 (16)                      | 69 (27)                 | 0,487        | 17 (39)     | 0,285        |
| ≥ 65 años                                    | 1 (17)                      | 14 (6)                  | 0,302        | 1 (2)       | 0,228        |
| <b>Características clínico-biológicas</b>    |                             |                         |              |             |              |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L), media      | 62                          | 47,4                    | 0,702        | 35,2        | 0,544        |
| Hemoglobina (g/dL), media                    | 8,9                         | 8,8                     | 0,951        | 9,8         | 0,443        |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L), media       | 65                          | 88                      | 0,079        | 133         | <b>0,001</b> |
| Blastos en MO (%), media                     | 79                          | 86                      | 0,294        | 82          | 0,743        |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                       | 1 (17)                      | 14 (6)                  | 0,313        | 3 (7)       | 0,418        |
| LDH elevada                                  | 5 (83)                      | 189 (78)                | 0,611        | 32 (74)     | 0,540        |
| Infiltración del SNC                         | 0 (0)                       | 5 (3)                   | 0,883        | 3 (8)       | 0,696        |
| masa mediastínica                            | 0 (0)                       | 6 (10)                  | 0,729        | 2 (12)      | 0,716        |
| Adenopatías                                  | 2 (33)                      | 44 (26)                 | 0,495        | 11 (34)     | 0,672        |
| Hepatomegalia                                | 2 (33)                      | 45 (27)                 | 0,512        | 8 (25)      | 0,508        |
| Esplenomegalia                               | 1 (17)                      | 52 (31)                 | 0,415        | 7(22)       | 0,628        |
| <b>Inmunofenotipo</b>                        |                             |                         |              |             |              |
| Fenotipo B                                   | 4 (67)                      | 226 (90)                | 0,115        | 32(74)      | 0,510        |
| Pro-B o B nula                               | 0 (0)                       | 31 (12)                 | 0,463        | 6 (14)      | 0,444        |
| B común                                      | 3 (50)                      | 148 (58)                | 0,496        | 20 (46)     | 0,585        |
| Pre-B  | 1 (16)                      | 44 (17)                 | 0,722        | 4 (9)       | 0,487        |
| Fenotipo T                                   | 2 (33)                      | 24 (10)                 | 0,115        | 11 (26)     | 0,510        |
| Pre-T (supracortical)                        | 0 (0)                       | 5 (2)                   | 0,889        | 2 (5)       | 0,772        |
| T cortical (común)                           | 1 (17)                      | 11 (4)                  | 0,249        | 5 (11)      | 0,556        |
| <b>Respuesta al tratamiento de inducción</b> |                             |                         |              |             |              |
| Respuesta lenta                              | 1 (20)                      | 46 (21)                 | 0,724        | 37 (20)     | 0,607        |
| Tasa de RC                                   | 5 (100)                     | 231 (96)                | 0,811        | 196 (96)    | 0,891        |
| Resistencia                                  | 0 (0)                       | 10 (4)                  | 0,811        | 9 (5)       | 0,891        |
| Mortalidad                                   | 0 (0)                       | 12 (5)                  | 0,787        | 9 (4)       | 0,719        |
| <b>Supervivencia</b>                         |                             |                         |              |             |              |
| SG a los 3 años                              | 20%                         | 67%                     | <b>0,003</b> | 67%         | <b>0,031</b> |
| SLR a los 3 años                             | 67%                         | 70%                     | 0,698        | 63%         | 0,732        |
| CIR a los 3 años                             | n.a.                        | 27%                     | 0,868        | 30%         | 0,884        |

**Tabla Suplementaria 10.** Asociación de los pacientes con otras anomalías numéricas y las diferentes variables y el pronóstico.

|  | Otras alt. Numéricas<br>n (%) | Resto de casos<br>n (%) | P            | CN<br>n (%) | P            |
|--|-------------------------------|-------------------------|--------------|-------------|--------------|
| Cariotipo valorable (n=260)                  | n=22 (%)                      | n=238 (%)               |              | n=44 (%)    |              |
| <b>Características demográficas</b>          |                               |                         |              |             |              |
| Sexo masculino                               | 9 (41)                        | 133 (56)                | 0,130        | 27 (61)     | 0,190        |
| Edad (años), media                           | 29                            | 22                      | 0,188        | 27          | 0,771        |
| ≤ 1 año                                      | 0 (0)                         | 7 (3)                   | 0,534        | 1 (2)       | 0,667        |
| > 1 - 9 años                                 | 6 (27)                        | 103 (43)                | 0,108        | 11 (25)     | 0,533        |
| 10 - 14 años                                 | 3 (14)                        | 9 (4)                   | 0,070        | 2 (5)       | 0,202        |
| 15 - 30 años                                 | 17 (77)                       | 196 (82)                | 0,363        | 12 (27)     | 0,921        |
| 31 - 64 años                                 | 6 (27)                        | 64 (27)                 | 0,571        | 17 (39)     | 0,523        |
| ≥ 65 años                                    | 2 (9)                         | 13 (6)                  | 0,368        | 1 (2)       | 0,256        |
| <b>Características clínico-biológicas</b>    |                               |                         |              |             |              |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L), media      | 19,3                          | 50,2                    | <b>0,003</b> | 35,2        | 0,493        |
| Hemoglobina (g/dL), media                    | 10,3                          | 8,7                     | <b>0,010</b> | 9,8         | 0,463        |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L), media       | 133                           | 84                      | <b>0,022</b> | 133         | 0,978        |
| Blastos en MO (%), media                     | 79                            | 87                      | 0,054        | 82          | 0,626        |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                       | 2 (10)                        | 13 (6)                  | 0,342        | 3 (7)       | 0,512        |
| LDH elevada                                  | 15 (71)                       | 179 (79)                | 0,293        | 32 (74)     | 0,512        |
| Infiltración del SNC                         | 0 (0)                         | 5 (3)                   | 0,579        | 3 (8)       | 0,275        |
| Masa mediastínica                            | 2 (29)                        | 4 (7)                   | 0,136        | 2 (12)      | 0,328        |
| Adenopatías                                  | 3 (21)                        | 43 (26)                 | 0,478        | 11 (34)     | 0,304        |
| Hepatomegalia                                | 1 (7)                         | 46 (29)                 | 0,069        | 8 (25)      | 0,437        |
| Esplenomegalia                               | 2 (14)                        | 51 (32)                 | 0,148        | 7(22)       | 0,159        |
| <b>Inmunofenotipo</b>                        |                               |                         |              |             |              |
| Fenotipo B                                   | 21 (96)                       | 209 (89)                | 0,318        | 32(74)      | <b>0,035</b> |
| Pro-B o B nula                               | 3 (14)                        | 28 (12)                 | 0,503        | 6 (14)      | 0,657        |
| B común                                      | 10 (46)                       | 99 (42)                 | 0,446        | 20 (46)     | 0,663        |
| Pre-B  | 16 (73)                       | 199 (84)                | 0,158        | 4 (9)       | 0,060        |
| Fenotipo T                                   | 1 (5)                         | 25 (11)                 | 0,318        | 11 (26)     | <b>0,035</b> |
| Pre-T (supracortical)                        | 1 (5)                         | 4 (2)                   | 0,360        | 2 (5)       | 0,744        |
| T cortical (común)                           | 0 (0)                         | 12 (5)                  | 0,338        | 5 (11)      | 0,122        |
| <b>Respuesta al tratamiento de inducción</b> |                               |                         |              |             |              |
| Respuesta lenta                              | 2 (11)                        | 45 (22)                 | 0,237        | 37 (20)     | 0,161        |
| Tasa de RC                                   | 17 (94)                       | 219 (96)                | 0,539        | 196 (96)    | 0,521        |
| Resistencia                                  | 1 (6)                         | 9 (4)                   | 0,539        | 9 (5)       | 0,521        |
| Mortalidad                                   | 4 (18)                        | 8 (3)                   | <b>0,013</b> | 9 (4)       | 0,161        |
| <b>Supervivencia</b>                         |                               |                         |              |             |              |
| SG a los 3 años                              | 53%                           | 67%                     | 0,094        | 67%         | 0,434        |
| SLR a los 3 años                             | 50%                           | 70%                     | 0,324        | 63%         | 0,795        |
| CIR a los 3 años                             | 36%                           | 27%                     | 0,743        | 30%         | 0,972        |

**Tabla Suplementaria 11.** Asociación de los pacientes con otras anomalías estructurales y las diferentes variables y el pronóstico.

|  | Otras alt. estructurales<br>n (%) | Resto de casos<br>n (%) | P                | CN<br>n (%) | P     |
|--|-----------------------------------|-------------------------|------------------|-------------|-------|
| Cariotipo valorable (n=260)                  | n=39                              | n= 221                  |                  | n=44        |       |
| <b>Características demográficas</b>          |                                   |                         |                  |             |       |
| Sexo masculino                               | 22 (56)                           | 120 (54)                | 0,474            | 27 (61)     | 0,407 |
| Edad (años), media                           | 22                                | 23                      | 0,622            | 27          | 0,171 |
| ≤ 1 año                                      | 1 (3)                             | 6 (3)                   | 0,717            | 1 (2)       | 0,722 |
| > 1 - 9 años                                 | 12 (31)                           | 97 (44)                 | 0,086            | 11 (25)     | 0,366 |
| 10 - 14 años                                 | 0 (0)                             | 12 (5)                  | 0,136            | 2 (5)       | 0,278 |
| 15 - 30 años                                 | 14 (36)                           | 33 (15)                 | <b>0,004</b>     | 12 (27)     | 0,543 |
| 31 - 64 años                                 | 11 (28)                           | 59 (27)                 | 0,491            | 17 (39)     | 0,441 |
| ≥ 65 años                                    | 1 (3)                             | 14 (6)                  | 0,310            | 1 (2)       | 0,722 |
| <b>Características clínico-biológicas</b>    |                                   |                         |                  |             |       |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L), media      | 51,1                              | 47,1                    | 0,803            | 35,2        | 0,196 |
| Hemoglobina (g/dL), media                    | 9                                 | 8,8                     | 0,642            | 9,8         | 0,389 |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L), media       | 100                               | 86                      | 0,391            | 133         | 0,174 |
| Blastos en MO (%), media                     | 87                                | 86                      | 0,841            | 82          | 0,220 |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                       | 3 (8)                             | 12 (6)                  | 0,388            | 3 (7)       | 0,588 |
| LDH elevada                                  | 31 (82)                           | 63 (78)                 | 0,380            | 32 (74)     | 0,308 |
| Infiltración del SNC                         | 1 (3)                             | 4 (2)                   | 0,600            | 3 (8)       | 0,371 |
| Masa mediastínica                            | 2 (25)                            | 4 (8)                   | 0,173            | 2 (12)      | 0,382 |
| Adenopatías                                  | 11(36)                            | 35 (24)                 | 0,141            | 11 (34)     | 0,568 |
| Hepatomegalia                                | 7 (23)                            | 40 (28)                 | 0,409            | 8 (25)      | 0,330 |
| Esplenomegalia                               | 9 (30)                            | 44 (30)                 | 0,588            | 7(22)       | 0,558 |
| <b>Inmunofenotipo</b>                        |                                   |                         |                  |             |       |
| Fenotipo B                                   | 26 (68)                           | 204 (94)                | <b>&lt;0,001</b> | 32(74)      | 0,362 |
| Pro-B o B nula                               | 2 (5)                             | 29 (13)                 | 0,120            | 6 (14)      | 0,175 |
| B común                                      | 15 (39)                           | 136 (62)                | <b>0,012</b>     | 20 (46)     | 0,674 |
| Pre-B  | 9 (23)                            | 36 (16)                 | 0,207            | 4 (9)       | 0,074 |
| Fenotipo T                                   | 12 (32)                           | 14 (6)                  | <b>&lt;0,001</b> | 11 (26)     | 0,362 |
| Pre-T (supracortical)                        | 2 (5)                             | 3 (1)                   | 0,163            | 2 (5)       | 0,645 |
| T cortical (común)                           | 6 (15)                            | 6 (3)                   | <b>0,004</b>     | 5 (11)      | 0,830 |
| <b>Respuesta al tratamiento de inducción</b> |                                   |                         |                  |             |       |
| Respuesta lenta                              | 11 (31)                           | 36 (19)                 | 0,140            | 37 (20)     | 0,880 |
| Tasa de RC                                   | 35 (92)                           | 201 (97)                | 0,188            | 196 (96)    | 0,279 |
| Resistencia                                  | 3 (8)                             | 7 (3)                   | 0,188            | 9 (5)       | 0,279 |
| Mortalidad                                   | 1 (3)                             | 11 (5)                  | 0,434            | 9 (4)       | 0,355 |
| <b>Supervivencia</b>                         |                                   |                         |                  |             |       |
| SG a los 3 años                              | 57%                               | 68%                     | 0,129            | 67%         | 0,626 |
| SLR a los 3 años                             | 61%                               | 72%                     | 0,259            | 63%         | 0,695 |
| CIR a los 3 años                             | 31%                               | 30%                     | 0,445            | 30%         | 0,750 |

**Tabla Suplementaria 12.** Asociación de los pacientes con cariotipo monosómico y las diferentes variables y el pronóstico.

|  | <b>Cariotipo Monosómico</b><br>n (%) | <b>Resto de casos</b><br>n (%) | <b>P</b> | <b>CN</b><br>n (%) | <b>P</b> |
|--|--------------------------------------|--------------------------------|----------|--------------------|----------|
| Cariotipo valorable (n=260)                  | n=11                                 | n= 249                         |          | n=44               |          |
| <b>Características demográficas</b>          |                                      |                                |          |                    |          |
| Sexo masculino                               | 8 (73)                               | 134 (54)                       | 0,179    | 27 (61)            | 0,371    |
| Edad (años), media                           | 23                                   | 23                             | 0,956    | 27                 | 0,558    |
| ≤ 1 año                                      | 0 (0)                                | 7 (3)                          | 0,736    | 1 (2)              | 0,800    |
| > 1 - 9 años                                 | 4 (36)                               | 105 (42)                       | 0,479    | 11 (25)            | 0,342    |
| 10 - 14 años                                 | 0 (0)                                | 12 (5)                         | 0,588    | 2 (5)              | 0,637    |
| 15 - 30 años                                 | 3 (17)                               | 44 (18)                        | 0,318    | 12 (27)            | 0,658    |
| 31 - 64 años                                 | 4 (36)                               | 66 (26)                        | 0,339    | 17 (39)            | 0,588    |
| ≥ 65 años                                    | 0 (0)                                | 15 (6)                         | 0,513    | 1 (2)              | 0,800    |
| <b>Características clínico-biológicas</b>    |                                      |                                |          |                    |          |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L), media      | 51,8                                 | 47,5                           | 0,880    | 35,2               | 0,609    |
| Hemoglobina (g/dL), media                    | 8,3                                  | 8,8                            | 0,551    | 9,8                | 0,120    |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L), media       | 96                                   | 88                             | 0,758    | 133                | 0,329    |
| Blastos en MO (%), media                     | 87                                   | 86                             | 0,903    | 82                 | 0,464    |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                       | 0 (0)                                | 15 (6)                         | 0,499    | 3 (7)              | 0,498    |
| LDH elevada                                  | 8 (73)                               | 186 (79)                       | 0,443    | 32 (74)            | 0,592    |
| Infiltración del SNC                         | 0 (0)                                | 5 (3)                          | 0,777    | 3 (8)              | 0,504    |
| Masa mediastínica                            | 1 (33)                               | 5 (9)                          | 0,271    | 2 (12)             | 0,404    |
| Adenopatías                                  | 2 (25)                               | 44 (26)                        | 0,651    | 11 (34)            | 0,479    |
| Hepatomegalia                                | 2 (25)                               | 45 (27)                        | 0,633    | 8 (25)             | 0,688    |
| Esplenomegalia                               | 2 (25)                               | 51 (30)                        | 0,548    | 7(22)              | 0,590    |
| <b>Inmunofenotipo</b>                        |                                      |                                |          |                    |          |
| Fenotipo B                                   | 8 (73)                               | 222 (91)                       | 0,089    | 32(74)             | 0,592    |
| Pro-B o B nula                               | 0 (0)                                | 31 (12)                        | 0,240    | 6 (14)             | 0,244    |
| B común                                      | 5 (46)                               | 146 (59)                       | 0,287    | 20 (46)            | 0,634    |
| Pre-B  | 3 (27)                               | 42 (17)                        | 0,292    | 4 (9)              | 0,134    |
| Fenotipo T                                   | 3 (27)                               | 23 (9)                         | 0,089    | 11 (26)            | 0,592    |
| Pre-T (supracortical)                        | 1 (9)                                | 4 (2)                          | 0,196    | 2 (5)              | 0,495    |
| T cortical (común)                           | 2 (18)                               | 10 (4)                         | 0,085    | 5 (11)             | 0,429    |
| <b>Respuesta al tratamiento de inducción</b> |                                      |                                |          |                    |          |
| Respuesta lenta                              | 0 (0)                                | 47 (22)                        | 0,093    | 37 (20)            | 0,067    |
| Tasa de RC                                   | 10 (100)                             | 226 (96)                       | 0,665    | 196 (96)           | 0,804    |
| Resistencia                                  | 0 (0)                                | 10 (4)                         | 0,655    | 9 (5)              | 0,804    |
| Mortalidad                                   | 1 (9)                                | 11 (5)                         | 0,414    | 9 (4)              | 0,602    |
| <b>Supervivencia</b>                         |                                      |                                |          |                    |          |
| SG a los 3 años                              | 61%                                  | 66%                            | 0,823    | 67%                | 0,940    |
| SLR a los 3 años                             | 75%                                  | 70%                            | 0,717    | 63%                | 0,993    |
| CIR a los 3 años                             | 18%                                  | 27%                            | 0,975    | 30%                | 0,861    |

**Tabla Suplementaria 13.** Asociación de los pacientes con y sin deleciones de *CDKN2A* y las diferentes variables y el pronóstico.

|   | <i>CDKN2A</i><br>delecionado | <i>CDKN2A</i><br>no delecionado | <i>P</i>     |
|---|------------------------------|---------------------------------|--------------|
|   | n= 89 (30%)                  | n= 205 (70%)                    |              |
| <b>Características demográficas</b>       |                              |                                 |              |
| Sexo masculino                            | 49 (55)                      | 123 (60)                        | 0,508        |
| Edad (años), media                        | 25                           | 23                              | 0,674        |
| ≤ 1 año                                   | 0 (0)                        | 7 (3)                           | 0,078        |
| > 1 - 9 años                              | 37 (42)                      | 75 (37)                         | 0,498        |
| 10 - 14 años                              | 4 (4)                        | 9 (4)                           | 0,591        |
| 15 - 30 años                              | 16 (18)                      | 44 (21)                         | 0,600        |
| 31 - 64 años                              | 25 (28)                      | 58 (28)                         | 0,972        |
| ≥ 65 años                                 | 7 (8)                        | 12 (6)                          | 0,699        |
| <b>Características clínico-biológicas</b> |                              |                                 |              |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L), media   | 61,4                         | 40,4                            | 0,061        |
| Hemoglobina (g/dL), media                 | 9,2                          | 8,5                             | 0,081        |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L), media    | 92                           | 83                              | 0,449        |
| Blastos en MO (%), media                  | 86                           | 87                              | 0,848        |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                    | 11 (13)                      | 12 (6)                          | 0,095        |
| Ácido úrico elevado                       | 20 (28)                      | 25 (15)                         | <b>0,036</b> |
| LDH elevada                               | 75 (87)                      | 140 (74)                        | <b>0,019</b> |
| Infiltración del SNC                      | 1 (1)                        | 7 (4)                           | 0,253        |
| Masa mediastínica                         | 6 (29)                       | 3 (6)                           | <b>0,016</b> |
| Adenopatías                               | 16 (25)                      | 35 (25)                         | 0,909        |
| Hepatomegalia                             | 19 (30)                      | 39 (27)                         | 0,820        |
| Esplenomegalia                            | 23 (36)                      | 43 (30)                         | 0,453        |
| <b>Inmunofenotipo</b>                     |                              |                                 |              |
| Fenotipo B                                | 66 (75)                      | 184 (91)                        | <b>0,001</b> |
| Pro-B o B nula                            | 8 (9)                        | 24 (12)                         | 0,628        |
| B común                                   | 42 (47)                      | 125 (61)                        | <b>0,039</b> |
| Pre-B                                     | 16 (18)                      | 32 (16)                         | 0,739        |
| Fenotipo T                                | 23 (25)                      | 21 (9)                          | <b>0,001</b> |
| Pre-T (supracortical)                     | 3 (3)                        | 6 (3)                           | 0,546        |
| T cortical (común)                        | 13 (15)                      | 7 (3)                           | <b>0,001</b> |
| T madura                                  | 3 (3)                        | 2 (1)                           | 0,165        |
| <b>Citogenética</b>                       |                              |                                 |              |
| No valorable                              | 20 (22)                      | 37 (18)                         | 0,471        |
| Cariotipo Normal                          | 13 (15)                      | 26 (13)                         | 0,795        |
| t(9;22)                                   | 6 (7)                        | 27 (13)                         | 0,161        |
| t(11q23)                                  | 4 (4)                        | 14 (7)                          | 0,615        |
| t(12;21)                                  | 5 (6)                        | 26 (13)                         | 0,108        |
| Hiperdiploidía alta                       | 10 (11)                      | 29 (14)                         | 0,625        |
| Otras alt. numéricas                      | 4 (4)                        | 12 (6)                          | 0,437        |
| Otras alt. estructurales                  | 14 (21)                      | 23 (14)                         | 0,291        |

|  | <b>CDKN2A<br/>deleciónado</b> | <b>CDKN2A<br/>no deleciónado</b> | <b>P</b>     |
|--|-------------------------------|----------------------------------|--------------|
| Cariotipo Complejo                           | 4 (4)                         | 2 (1)                            | 0,071        |
| <b>Respuesta al tratamiento de inducción</b> |                               |                                  |              |
| Respuesta lenta                              | 15 (19)                       | 44 (25)                          | 0,427        |
| Tasa de RC                                   | 77 (95)                       | 186 (95)                         | 0,610        |
| Resistencia                                  | 4 (5)                         | 10 (5)                           | 0,610        |
| Mortalidad                                   | 8 (9)                         | 7 (3)                            | <b>0,050</b> |
| <b>Supervivencia</b>                         |                               |                                  |              |
| SG a los 3 años                              | 54%                           | 68%                              | 0,062        |
| SLR a los 3 años                             | 69%                           | 68%                              | 0,993        |
| CIR a los 3 años                             | 25%                           | 28%                              | 0,812        |

**Tabla Suplementaria 14.** Asociación de los pacientes con deleciones homocigotas y heterocigotas de *CDKN2A* y las diferentes variables y el pronóstico.

|   | <b>Deleción de<br/>CDKN2A<br/>homocigota</b> | <b>Deleción de<br/>CDKN2A<br/>heterocigota</b> | <b>P</b>     |
|---|--|--|--------------|
|   | n= 43 (48%)                                  | n= 46 (52%)                                    |              |
| <b>Características demográficas</b>       |  |  |              |
| Sexo masculino                            | 25 (58)                                      | 24 (52)  | 0,725        |
| Edad (años), media                        | 22   | 27   | 0,341        |
| ≤ 1 año                                   | 0 (0)  | 0 (0)  | -            |
| > 1 - 9 años                              | 17 (39)                                      | 20 (43)  | 0,871        |
| 10 - 14 años                              | 3 (7)  | 1 (2)  | 0,283        |
| 15 - 30 años                              | 10 (23)                                      | 6 (13)   | 0,328        |
| 31 - 64 años                              | 11 (26)                                      | 14 (30)  | 0,785        |
| ≥ 65 años                                 | 2 (5)  | 5 (11)   | 0,246        |
| <b>Características clínico-biológicas</b> |  |  |              |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L), media   | 75,2   | 48,7   | 0,216        |
| Hemoglobina (g/dL), media                 | 9,2  | 9,2  | 0,949        |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L), media    | 78   | 104  | 0,161        |
| Blastos en MO (%), media                  | 89   | 84   | 0,209        |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                    | 7 (17)                                       | 4 (9)  | 0,414        |
| Ácido úrico elevado                       | 14 (40)                                      | 6 (16)   | <b>0,047</b> |
| LDH elevada                               | 38 (95)                                      | 37 (81)  | <b>0,042</b> |
| Infiltración del SNC                      | 1 (3)  | 0 (0)  | 0,478        |
| Masa mediastínica                         | 5 (42)                                       | 1 (11)   | 0,148        |
| Adenopatías                               | 10 (32)                                      | 6 (19)   | 0,346        |
| Hepatomegalia                             | 11 (35)                                      | 8 (25)   | 0,527        |
| Esplenomegalia                            | 12 (39)                                      | 11 (34)  | 0,462        |
| <b>Inmunofenotipo</b>                     |  |  |              |
| Fenotipo B                                | 28 (65)                                      | 38 (84)  | <b>0,032</b> |

|  | Delección de<br><i>CDKN2A</i><br>homocigota | Delección de<br><i>CDKN2A</i><br>heterocigota | <i>P</i>     |
|--|---|---|--------------|
| Pro-B o B nula                               | 2 (5)                                       | 6 (13)  | 0,156        |
| B común                                      | 17 (39)                                     | 25 (54)                                       | 0,118        |
| Pre-B  | 9 (21)                                      | 7 (15)  | 0,671        |
| Fenotipo T                                   | 15 (35)                                     | 7 (16)  | <b>0,032</b> |
| Pre-T (supracortical)                        | 2 (5)                                       | 1 (2)   | 0,474        |
| T cortical (común)                           | 9 (21)                                      | 4 (9)   | 0,183        |
| T madura                                     | 2 (5)                                       | 1 (2)   | 0,474        |
| <b>Citogenética</b>                          |   |   |              |
| No valorable                                 | 11 (26)                                     | 9 (20)  | 0,671        |
| Cariotipo Normal                             | 4 (9)                                       | 9 (20)  | 0,285        |
| t(9;22)                                      | 2 (5)                                       | 4 (9)   | 0,371        |
| t(11q23)                                     | 0 (0)                                       | 4 (9)   | 0,067        |
| t(12;21)                                     | 1 (2)                                       | 4 (9)   | 0,202        |
| Hiperdiploidía alta                          | 2 (5)                                       | 8 (17)  | 0,056        |
| Otras alt. numéricas                         | 2 (5)                                       | 2 (4)   | 0,666        |
| Otras alt. estructurales                     | 12 (39)                                     | 2 (6)   | <b>0,001</b> |
| Cariotipo Complejo                           | 4 (9)                                       | 0 (0)   | 0,051        |
| <b>Respuesta al tratamiento de inducción</b> |   |   |              |
| Respuesta lenta                              | 9 (24)                                      | 6 (15)  | 0,528        |
| Tasa de RC                                   | 39 (95)                                     | 38 (95)                                       | 0,683        |
| Resistencia                                  | 2 (5)                                       | 2 (5)   | 0,683        |
| Mortalidad                                   | 2 (5)                                       | 6 (13)  | 0,156        |
| <b>Supervivencia</b>                         |   |   |              |
| SG a los 3 años                              | 47%   | 61%   | 0,314        |
| SLR a los 3 años                             | 64%   | 75%   | 0,152        |
| CIR a los 3 años                             | 28%   | 26%   | 0,229        |

**Tabla Suplementaria 15.** Asociación de los pacientes con y sin delecciones de *CDKN2B* y las diferentes variables y el pronóstico.

|   | <i>CDKN2B</i><br>delecionado<br>n= 80 (27%) | <i>CDKN2B</i><br>no delecionado<br>n= 214 (73%) | <i>P</i>     |
|---|---|---|--------------|
| <b>Características demográficas</b>       |   |   |              |
| Sexo masculino                            | 46 (58)                                     | 125 (59)  | 0,960        |
| Edad (años), media                        | 22  | 25  | 0,367        |
| ≤ 1 año                                   | 0 (0)                                       | 7 (3)   | 0,104        |
| > 1 - 9 años                              | 37 (46)                                     | 75 (35)   | 0,110        |
| 10 - 14 años                              | 4 (5)                                       | 9 (4)   | 0,494        |
| 15 - 30 años                              | 14 (17)                                     | 45 (21)   | 0,599        |
| 31 - 64 años                              | 19 (24)                                     | 64 (30)   | 0,357        |
| ≥ 65 años                                 | 6 (7)                                       | 13 (6)  | 0,868        |
| <b>Características clínico-biológicas</b> |   |   |              |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L), media   | 65,1  | 38,4  | <b>0,039</b> |

|  | <b>CDKN2B<br/>delecionado</b> | <b>CDKN2B<br/>no delecionado</b> | <b>P</b>     |
|--|-------------------------------|----------------------------------|--------------|
| Hemoglobina (g/dL), media                    | 9,1                           | 8,7                              | 0,278        |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L), media       | 92                            | 83                               | 0,456        |
| Blastos en MO (%), media                     | 88                            | 86                               | 0,211        |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                       | 9 (12)                        | 14 (7)                           | 0,291        |
| Ácido úrico elevado                          | 17 (27)                       | 28 (16)                          | 0,055        |
| LDH elevada                                  | 69 (87)                       | 146 (75)                         | <b>0,030</b> |
| Infiltración del SNC                         | 1 (2)                         | 7 (4)                            | 0,326        |
| Masa mediastínica                            | 5 (33)                        | 4 (7)                            | <b>0,017</b> |
| Adenopatías                                  | 13 (24)                       | 37 (25)                          | 0,36         |
| Hepatomegalia                                | 17(31)                        | 40 (27)                          | 0,691        |
| Esplenomegalia                               | 20 (36)                       | 45 (30)                          | 0,241        |
| <b>Inmunofenotipo</b>                        |                               |                                  |              |
| Fenotipo B                                   | 61 (76)                       | 188 (90)                         | <b>0,005</b> |
| Pro-B o B nula                               | 7 (9)                         | 25 (12)                          | 0,603        |
| B común                                      | 38 (48)                       | 128 (60)                         | <b>0,071</b> |
| Pre-B  | 16 (20)                       | 32 (15)                          | 0,396        |
| Fenotipo T                                   | 19 (24)                       | 21 (10)                          | <b>0,005</b> |
| Pre-T (supracortical)                        | 2 (2)                         | 7 (3)                            | 0,535        |
| T cortical (común)                           | 12 (15)                       | 8 (4)                            | <b>0,002</b> |
| T madura                                     | 2 (2)                         | 3 (1)                            | 0,416        |
| <b>Citogenética</b>                          |                               |                                  |              |
| No valorable                                 | 17 (21)                       | 40 (19)                          | 0,373        |
| Cariotipo Normal                             | 11 (14)                       | 28 (13)                          | 0,892        |
| t(9;22)                                      | 5 (6)                         | 27 (13)                          | 0,174        |
| t(11q23)                                     | 3 (4)                         | 15 (7)                           | 0,225        |
| t(12;21)                                     | 5 (6)                         | 26 (12)                          | 0,206        |
| Hiperdiploidía alta                          | 10 (12)                       | 29 (14)                          | 0,486        |
| Otras alt. numéricas                         | 4 (5)                         | 12 (6)                           | 0,546        |
| Otras alt. estructurales                     | 14 (23)                       | 23 (14)                          | 0,165        |
| Cariotipo Complejo                           | 4 (5)                         | 2 (1)                            | <b>0,049</b> |
| <b>Respuesta al tratamiento de inducción</b> |                               |                                  |              |
| Respuesta lenta                              | 11 (16)                       | 47 (26)                          | 0,123        |
| Tasa de RC                                   | 72 (97)                       | 190 (94)                         | 0,225        |
| Resistencia                                  | 2 (3)                         | 12 (6)                           | 0,225        |
| Mortalidad                                   | 6 (7)                         | 9 (4)                            | 0,203        |
| <b>Supervivencia</b>                         |                               |                                  |              |
| SG a los 3 años                              | 55%                           | 66%                              | 0,155        |
| SLR a los 3 años                             | 68%                           | 68%                              | 0,775        |
| CIR a los 3 años                             | 25%                           | 28%                              | 0,950        |

**Tabla Suplementaria 16.** Asociación de los pacientes con deleciones homocigotas y heterocigotas de *CDKN2A* y las diferentes variables y el pronóstico.

|  | Delección de <i>CDKN2B</i><br>homocigota | Delección de <i>CDKN2B</i><br>heterocigota | P            |
|--|--|--|--------------|
|  | n= 41 (51%)                              | n= 39 (49%)                                |              |
| <b>Características demográficas</b>          |  |  |              |
| Sexo masculino                               | 25 (61)                                  | 21 (54)                                    | 0,676        |
| Edad (años), media                           | 18                                       | 18   | 0,915        |
| ≤ 1 año                                      | 0 (0)                                    | 0 (0)                                      | -            |
| > 1 - 9 años                                 | 19 (46)                                  | 18 (46)                                    | 0,987        |
| 10 - 14 años                                 | 3 (7)                                    | 1 (3)                                      | 0,327        |
| 15 - 30 años                                 | 6 (15)                                   | 8 (20)                                     | 0,691        |
| 31 - 64 años                                 | 12 (29)                                  | 7 (18)                                     | 0,354        |
| ≥ 65 años                                    | 1 (2)                                    | 5 (13)                                     | 0,089        |
| <b>Características clínico-biológicas</b>    |  |  |              |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L), media      | 66,1                                     | 73,2                                       | 0,785        |
| Hemoglobina (g/dL), media                    | 9,5                                      | 8,8  | 0,365        |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L), media       | 94                                       | 99   | 0,807        |
| Blastos en MO (%), media                     | 86                                       | 92   | 0,102        |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                       | 6 (16)                                   | 3 (8)                                      | 0,240        |
| Ácido úrico elevado                          | 11 (33)                                  | 6 (19)                                     | 0,326        |
| LDH elevada                                  | 37 (93)                                  | 32 (82)                                    | 0,145        |
| Infiltración del SNC                         | 1 (3)                                    | 0 (0)                                      | 0,525        |
| Masa mediastínica                            | 5 (56)                                   | 0 (0)                                      | 0,042        |
| Adenopatías                                  | 7 (25)                                   | 6 (22)                                     | 0,808        |
| Hepatomegalia                                | 10 (36)                                  | 7 (26)                                     | 0,622        |
| Esplenomegalia                               | 12 (43)                                  | 8 (30)                                     | 0,46         |
| <b>Inmunofenotipo</b>                        |  |  |              |
| Fenotipo B                                   | 28 (68)                                  | 33 (85)                                    | 0,146        |
| Pro-B o B nula                               | 2 (5)                                    | 5 (13)                                     | 0,196        |
| B común                                      | 17 (41)                                  | 21 (54)                                    | 0,376        |
| Pre-B  | 9 (22)                                   | 7 (18)                                     | 0,867        |
| Fenotipo T                                   | 13 (32)                                  | 6 (15)                                     | 0,146        |
| Pre-T (supracortical)                        | 2 (5)                                    | 0 (0)                                      | 0,259        |
| T cortical (común)                           | 7 (17)                                   | 5 (13)                                     | 0,826        |
| T madura                                     | 2 (5)                                    | 0 (0)                                      | 0,259        |
| <b>Citogenética</b>                          |  |  |              |
| No valorable                                 | 9 (22)                                   | 8 (21)                                     | 0,875        |
| Cariotipo Normal                             | 5 (12)                                   | 6 (15)                                     | 0,464        |
| t(9;22)                                      | 2 (5)                                    | 3 (8)                                      | 0,476        |
| t(11q23)                                     | 0 (0)                                    | 3 (8)                                      | 0,111        |
| t(12;21)                                     | 2 (5)                                    | 3 (8)                                      | 0,476        |
| Hiperdiploidía alta                          | 3 (7)                                    | 7 (18)                                     | 0,136        |
| Otras alt. numéricas                         | 1 (2)                                    | 3 (8)                                      | 0,289        |
| Otras alt. estructurales                     | 11 (35)                                  | 3 (10)                                     | <b>0,033</b> |
| Cariotipo Complejo                           | 3 (7)                                    | 1 (3)                                      | 0,327        |
| <b>Respuesta al tratamiento de inducción</b> |  |  |              |
| Respuesta lenta                              | 9 (24)                                   | 2 (6)                                      | 0,077        |
| Tasa de RC                                   | 39 (98)                                  | 33 (97)                                    | 0,711        |
| Resistencia                                  | 1 (2)                                    | 1 (3)                                      | 0,711        |
| Mortalidad                                   | 1 (2)                                    | 5 (13)                                     | 0,089        |

|                      | Delección de <i>CDKN2B</i><br>homocigota | Delección de <i>CDKN2B</i><br>heterocigota | <i>P</i> |
|----------------------|--|--|----------|
| <b>Supervivencia</b> |  |  |          |
| SG a los 3 años      | 53%                                      | 58%  | 0,837    |
| SLR a los 3 años     | 70%                                      | 66%  | 0,889    |
| CIR a los 3 años     | 25%                                      | 26%  | 0,769    |

**Tabla Suplementaria 17.** Asociación de los pacientes con y sin deleciones de *PAX5* y las diferentes variables y el pronóstico.

|   | <i>PAX5</i><br>delecionado<br>n= 55 (19) | <i>PAX5</i><br>no delecionado<br>n= 239 (81) | <i>P</i>     |
|---|--|--|--------------|
| <b>Características demográficas</b>       |  |  |              |
| Sexo masculino                            | 30 (55)                                  | 142 (59)                                     | 0,611        |
| Edad (años), media                        | 24                                       | 24   | 0,949        |
| ≤ 1 año                                   | 1 (2)                                    | 6 (2)  | 0,612        |
| > 1 - 9 años                              | 24 (44)                                  | 88 (37)                                      | 0,216        |
| 10 - 14 años                              | 0 (0)                                    | 13 (5)                                       | 0,064        |
| 15 - 30 años                              | 10 (18)                                  | 50 (21)                                      | 0,788        |
| 31 - 64 años                              | 16 (29)                                  | 67 (28)                                      | 0,875        |
| ≥ 65 años                                 | 4 (7)                                    | 15 (6)                                       | 0,490        |
| <b>Características clínico-biológicas</b> |  |  |              |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L), media   | 40,8                                     | 48,0   | 0,586        |
| Hemoglobina (g/dL), media                 | 8,2                                      | 8,9  | 0,111        |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L), media    | 63                                       | 91   | <b>0,008</b> |
| Blastos en MO (%), media                  | 90                                       | 86   | 0,047        |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                    | 6 (12)                                   | 17 (7)                                       | 0,216        |
| Ácido úrico elevado                       | 7 (17)                                   | 38 (19)                                      | 0,837        |
| LDH elevada                               | 42 (82)                                  | 173 (77)                                     | 0,258        |
| Infiltración del SNC                      | 1 (2)                                    | 7 (3)  | 0,529        |
| Masa mediastínica                         | 1 (8)                                    | 8 (14)                                       | 0,526        |
| Adenopatías                               | 9 (24)                                   | 42 (25)                                      | 0,931        |
| Hepatomegalia                             | 10 (27)                                  | 48 (29)                                      | 0,513        |
| Esplenomegalia                            | 14 (38)                                  | 52 (31)                                      | 0,522        |
| <b>Inmunofenotipo</b>                     |  |  |              |
| Fenotipo B                                | 50 (91)                                  | 200 (85)                                     | 0,365        |
| Pro-B o B nula                            | 4 (7)                                    | 27 (12)                                      | 0,244        |
| B común                                   | 31 (56)                                  | 136 (57)                                     | 0,529        |
| Pre-B                                     | 15 (27)                                  | 33 (14)                                      | <b>0,026</b> |
| Fenotipo T                                | 5 (9)                                    | 35 (15)                                      | 0,365        |
| Pre-T (supracortical)                     | 0 (0)                                    | 9 (4)  | 0,151        |
| T cortical (común)                        | 3 (5)                                    | 17 (7)                                       | 0,465        |
| T madura                                  | 2 (4)                                    | 3 (1)  | 0,236        |

|  | <b>PAX5<br/>delecionado</b> | <b>PAX5<br/>no delecionado</b> | <b>P</b>     |
|--|-----------------------------|--------------------------------|--------------|
| <b>Citogenética</b>                          |                             |                                |              |
| No valorable                                 | 10 (18)                     | 47 (20)                        | 0,951        |
| Cariotipo Normal                             | 4 (7)                       | 35 (15)                        | 0,218        |
| t(9;22)                                      | 5 (9)                       | 28 (12)                        | 0,750        |
| t(11q23)                                     | 0 (0)                       | 18 (7)                         | <b>0,021</b> |
| t(12;21)                                     | 9 (16)                      | 22 (9)                         | 0,188        |
| Hiperdiploidía alta                          | 4 (7)                       | 35 (15)                        | 0,218        |
| Otras alt. numéricas                         | 4 (7)                       | 12 (5)                         | 0,349        |
| Otras alt. estructurales                     | 11 (25)                     | 26 (14)                        | 0,122        |
| Cariotipo Complejo                           | 2 (4)                       | 4 (2)                          | 0,313        |
| <b>Respuesta al tratamiento de inducción</b> |                             |                                |              |
| Respuesta lenta                              | 9 (19)                      | 50 (24)                        | 0,265        |
| Tasa de RC                                   | 44 (88)                     | 219 (97)                       | <b>0,024</b> |
| Resistencia                                  | 6 (12)                      | 8 (3)                          | <b>0,024</b> |
| Mortalidad                                   | 4 (7)                       | 11 (5)                         | 0,293        |
| <b>Supervivencia</b>                         |                             |                                |              |
| SG a los 3 años                              | 65%                         | 63%                            | 0,629        |
| SLR a los 3 años                             | 76%                         | 67%                            | 0,130        |
| CIR a los 3 años                             | 20%                         | 29%                            | 0,123        |

**Tabla Suplementaria 18.** Asociación de los pacientes con y sin deleciones de *ETV6* y las diferentes variables y el pronóstico.

|   | <b>ETV6<br/>delecionado</b> | <b>ETV6<br/>no delecionado</b> | <b>P</b>     |
|---|-----------------------------|--------------------------------|--------------|
|   | n= 29 (10)                  | n= 265 (90)                    |              |
| <b>Características demográficas</b>       |                             |                                |              |
| Sexo masculino                            | 15 (52)                     | 156 (59)                       | 0,579        |
| Edad (años), media                        | 18                          | 25                             | 0,093        |
| ≤ 1 año                                   | 0(0)                        | 7(3)                           | 0,478        |
| > 1 - 9 años                              | 18 (62)                     | 94 (36)                        | <b>0,005</b> |
| 10 - 14 años                              | 2 (7)                       | 11 (4)                         | 0,375        |
| 15 - 30 años                              | 3 (10)                      | 56 (21)                        | 0,254        |
| 31 - 64 años                              | 3 (10)                      | 80 (30)                        | <b>0,041</b> |
| ≥ 65 años                                 | 3 (10)                      | 16 (6)                         | 0,287        |
| <b>Características clínico-biológicas</b> |                             |                                |              |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L), media   | 28,4                        | 48,9                           | 0,087        |
| Hemoglobina (g/dL), media                 | 8,1                         | 8,8                            | 0,159        |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L), media    | 52                          | 89                             | <b>0,001</b> |
| Blastos en MO (%), media                  | 86                          | 86                             | 0,092        |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                    | 0 (0)                       | 23 (9)                         | 0,077        |
| Ácido úrico elevado                       | 3 (12)                      | 42 (20)                        | 0,256        |
| LDH elevada                               | 24 (86)                     | 191 (77)                       | 0,223        |

Tablas Suplementarias

|  | <i>ETV6</i><br>delecionado | <i>ETV6</i><br>no delecionado | <i>P</i>         |
|--|----------------------------|-------------------------------|------------------|
| Infiltración del SNC                         | 0 (0)                      | 8 (4)                         | 0,392            |
| Masa mediastínica                            | 0 (0)                      | 9 (13)                        | 0,574            |
| Adenopatías                                  | 2 (14)                     | 48 (25)                       | 0,287            |
| Hepatomegalia                                | 5 (36)                     | 53 (28)                       | 0,362            |
| Esplenomegalia                               | 5 (36)                     | 61 (32)                       | 0,489            |
| <b>Inmunofenotipo</b>                        |                            |                               |                  |
| Fenotipo B                                   | 28 (97)                    | 222 (85)                      | 0,072            |
| Pro-B o B nula                               | 0 (0)                      | 32 (12)                       | <b>0,029</b>     |
| B común                                      | 24 (83)                    | 143 (54)                      | <b>0,006</b>     |
| Pre-B  | 4 (14)                     | 44 (17)                       | 0,467            |
| Fenotipo T                                   | 1 (3)                      | 38 (15)                       | 0,072            |
| Pre-T (supracortical)                        | 1 (3)                      | 8 (3)                         | 0,614            |
| T cortical (común)                           | 0 (0)                      | 20 (7)                        | 0,115            |
| T madura                                     | 0 (0)                      | 5 (2)                         | 0,592            |
| <b>Citogenética</b>                          |                            |                               |                  |
| No valorable                                 | 4 (14)                     | 53 (20)                       | 0,573            |
| Cariotipo Normal                             | 1 (3)                      | 38 (14)                       | 0,174            |
| t(9;22)                                      | 2 (7)                      | 31 (12)                       | 0,338            |
| t(11q23)                                     | 0 (0)                      | 18 (7)                        | 0,144            |
| t(12;21)                                     | 14 (48)                    | 17 (6)                        | <b>&lt;0,001</b> |
| Hiperdiploidía alta                          | 6 (21)                     | 33 (12)                       | 0,170            |
| Otras alt. numéricas                         | 0 (0)                      | 16 (6)                        | 0,180            |
| Otras alt. estructurales                     | 0 (0)                      | 36 (18)                       | 0,010            |
| Cariotipo Complejo                           | 1 (3)                      | 5 (9)                         | 0,468            |
| <b>Respuesta al tratamiento de inducción</b> |                            |                               |                  |
| Respuesta lenta                              | 3 (11)                     | 55 (24)                       | 0,222            |
| Tasa de RC                                   | 27 (96)                    | 235 (95)                      | 0,574            |
| Resistencia                                  | 1 (4)                      | 13 (5)                        | 0,574            |
| Mortalidad                                   | 1 (4)                      | 14 (5)                        | 0,547            |
| <b>Supervivencia</b>                         |                            |                               |                  |
| SG a los 3 años                              | 71%                        | 63%                           | 0,615            |
| SLR a los 3 años                             | 72%                        | 68%                           | 0,918            |
| CIR a los 3 años                             | 29%                        | 27%                           | 0,408            |

**Tabla Suplementaria 19.** Asociación de los pacientes con y sin deleciones de *RB1* y las diferentes variables y el pronóstico.

|   | <b>RB1<br/>delecionado</b> | <b>RB1<br/>no delecionado</b> | <b>P</b>     |
|---|----------------------------|-------------------------------|--------------|
|   | n= 31 (11%)                | n= 263 (89%)                  |              |
| <b>Características demográficas</b>       |                            |                               |              |
| Sexo masculino                            | 19 (61)                    | 153 (58)                      | 0,448        |
| Edad (años), media                        | 27                         | 24                            | 0,478        |
| ≤ 1 año                                   | 0 (0)                      | 7 (3)                         | 0,455        |
| > 1 - 9 años                              | 13 (42)                    | 99 (38)                       | 0,787        |
| 10 - 14 años                              | 1 (3)                      | 5 (12)                        | 0,593        |
| 15 - 30 años                              | 4 (13)                     | 56 (21)                       | 0,389        |
| 31 - 64 años                              | 10 (32)                    | 7 (28)                        | 0,752        |
| ≥ 65 años                                 | 3 (10)                     | 16 (6)                        | 0,701        |
| <b>Características clínico-biológicas</b> |                            |                               |              |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L), media   | 23,1                       | 49,5                          | 0,004        |
| Hemoglobina (g/dL), media                 | 8,8                        | 8,7                           | 0,865        |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L), media    | 75                         | 87                            | 0,458        |
| Blastos en MO (%), media                  | 84                         | 87                            | 0,493        |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                    | 3 (10)                     | 20 (8)                        | 0,769        |
| Ácido úrico elevado                       | 4 (14)                     | 41 (20)                       | 0,675        |
| LDH elevada                               | 25 (81)                    | 190 (78)                      | 0,872        |
| Infiltración del SNC                      | 1 (5)                      | 7 (3)                         | 0,694        |
| Masa mediastínica                         | 2 (33)                     | 7 (11)                        | 0,343        |
| Adenopatías                               | 6 (27)                     | 45 (25)                       | 0,989        |
| Hepatomegalia                             | 6 (27)                     | 52 (28)                       | 0,910        |
| Esplenomegalia                            | 5 (23)                     | 61 (33)                       | 0,454        |
| <b>Inmunofenotipo</b>                     |                            |                               |              |
| Fenotipo B                                | 26 (84)                    | 224 (87)                      | 0,902        |
| Pro-B o B nula                            | 2 (6)                      | 30 (11)                       | 0,315        |
| B común                                   | 18 (58)                    | 149 (57)                      | 0,881        |
| Pre-B                                     | 6 (19)                     | 42 (16)                       | 0,822        |
| Fenotipo T                                | 5 (16)                     | 35 (13)                       | 0,430        |
| Pre-T (supracortical)                     | 0 (0)                      | 9 (3)                         | 0,361        |
| T cortical (común)                        | 5 (16)                     | 15 (6)                        | <b>0,046</b> |
| T madura                                  | 0 (0)                      | 5 (2)                         | 0,571        |
| <b>Citogenética</b>                       |                            |                               |              |
| No valorable                              | 8 (26)                     | 49 (19)                       | 0,474        |
| Cariotipo Normal                          | 3 (10)                     | 36 (14)                       | 0,386        |
| t(9;22)                                   | 2 (6)                      | 31 (12)                       | 0,293        |
| t(11q23)                                  | 1 (3)                      | 17 (6)                        | 0,413        |
| t(12;21)                                  | 1 (3)                      | 30 (12)                       | 0,132        |
| Hiperdiploidía alta                       | 6 (19)                     | 33 (12)                       | 0,212        |
| Otras alt. numéricas                      | 2 (6)                      | 14 (5)                        | 0,520        |
| Otras alt. estructurales                  | 4 (18)                     | 33 (16)                       | 0,490        |

|  | <b>RB1<br/>delecionado</b> | <b>RB1<br/>no delecionado</b> | <b>P</b>     |
|--|----------------------------|-------------------------------|--------------|
| Cariotipo Complejo                           | 3 (10)                     | 3 (1)                         | <b>0,017</b> |
| <b>Respuesta al tratamiento de inducción</b> |                            |                               |              |
| Respuesta lenta                              | 5 (18)                     | 54 (24)                       | 0,362        |
| Tasa de RC                                   | 29 (97)                    | 234 (95)                      | 0,539        |
| Resistencia                                  | 1 (3)                      | 13 (5)                        | 0,539        |
| Mortalidad                                   | 0 (0)                      | 15 (6)                        | 0,189        |
| <b>Supervivencia</b>                         |                            |                               |              |
| SG a los 3 años                              | 61%                        | 64%                           | 0,733        |
| SLR a los 3 años                             | 76%                        | 68%                           | 0,851        |
| CIR a los 3 años                             | 23%                        | 28%                           | 0,913        |

**Tabla Suplementaria 20.** Asociación de los pacientes con deleciones homocigotas y heterocigotas de *RB1* y las diferentes variables y el pronóstico.

|   | <b>Delección de RB1<br/>homocigota</b> | <b>Delección de RB1<br/>heterocigota</b> | <b>P</b>     |
|---|--|--|--------------|
|   | n= 9 (29%)                             | n= 22 (71%)                              |              |
| <b>Características demográficas</b>       |  |  |              |
| Sexo masculino                            | 7 (78)                                 | 21 (55)                                  | 0,215        |
| Edad (años), media                        | 43                                     | 20                                       | <b>0,017</b> |
| ≤ 1 año                                   | 0 (0)                                  | 0 (0)                                    | -            |
| > 1 - 9 años                              | 1 (11)                                 | 12 (55)                                  | 0,031        |
| 10 - 14 años                              | 0 (0)                                  | 1 (4)                                    | 0,710        |
| 15 - 30 años                              | 2 (22)                                 | 2 (9)                                    | 0,327        |
| 31 - 64 años                              | 4 (44)                                 | 6 (27)                                   | 0,302        |
| ≥ 65 años                                 | 2 (22)                                 | 1 (24)                                   | 0,195        |
| <b>Características clínico-biológicas</b> |  |  |              |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L), media   | 38,7                                   | 16,8                                     | 0,332        |
| Hemoglobina (g/dL), media                 | 8,8                                    | 8,9                                      | 0,908        |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L), media    | 64                                     | 79                                       | 0,541        |
| Blastos en MO (%), media                  | 84                                     | 85                                       | 0,924        |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                    | 2 (22)                                 | 1 (24)                                   | 0,195        |
| Ácido úrico elevado                       | 2 (29)                                 | 2 (9)                                    | 0,253        |
| LDH elevada                               | 6 (67)                                 | 19 (86)                                  | 0,219        |
| Infiltración del SNC                      | 0 (0)                                  | 1 (8)                                    | 0,650        |
| Masa mediastínica                         | 2 (40)                                 | 0 (0)                                    | 0,667        |
| Adenopatías                               | 2 (25)                                 | 4 (29)                                   | 0,631        |
| Hepatomegalia                             | 2 (25)                                 | 4 (29)                                   | 0,631        |
| Esplenomegalia                            | 0 (0)                                  | 5 (36)                                   | 0,076        |
| <b>Inmunofenotipo</b>                     |  |  |              |
| Fenotipo B                                | 6 (67)                                 | 20 (91)                                  | 0,131        |
| Pro-B o B nula                            | 0 (0)                                  | 2 (9)                                    | 0,497        |

|  | Delección de <i>RB1</i><br>homocigota | Delección de <i>RB1</i><br>heterocigota | <i>P</i>     |
|--|---------------------------------------|---|--------------|
| B común                                      | 5 (56)                                | 13 (59)                                 | 0,583        |
| Pre-B  | 1 (11)                                | 5 (23)                                  | 0,423        |
| Fenotipo T                                   | 3 (33)                                | 2 (9)                                   | 0,131        |
| Pre-T (supracortical)                        | 0 (0)                                 | 0 (0)                                   | -            |
| T cortical (común)                           | 2 (9)                                 | 3 (33)                                  | 0,131        |
| T madura                                     | 0 (0)                                 | 0 (0)                                   | -            |
| <b>Citogenética</b>                          |                                       |   |              |
| No valorable                                 | 2 (22)                                | 6 (27)                                  | 0,576        |
| Cariotipo Normal                             | 1 (11)                                | 2 (9)                                   | 0,657        |
| t(9;22)                                      | 1 (11)                                | 1 (4)                                   | 0,503        |
| t(11q23)                                     | 0 (0)                                 | 1 (4)                                   | 0,71         |
| t(12;21)                                     | 0 (0)                                 | 1 (4)                                   | 0,71         |
| Hiperdiploidía alta                          | 1 (11)                                | 5 (23)                                  | 0,423        |
| Otras alt. numéricas                         | 0 (0)                                 | 2 (9)                                   | 0,497        |
| Otras alt. estructurales                     | 1 (11)                                | 3 (14)                                  | 0,673        |
| Cariotipo Complejo                           | 3 (33)                                | 0 (0)                                   | <b>0,019</b> |
| <b>Respuesta al tratamiento de inducción</b> |                                       |   |              |
| Respuesta lenta                              | 3 (43)                                | 2 (10)                                  | 0,091        |
| Tasa de RC                                   | 7 (88)                                | 22 (100)                                | 0,267        |
| Resistencia                                  | 1 (12)                                | 0(0)                                    | 0,267        |
| Mortalidad                                   | 0 (0)                                 | 0 (0)                                   | -            |
| <b>Supervivencia</b>                         |                                       |   |              |
| SG a los 3 años                              | 39%                                   | 67%                                     | 0,099        |
| SLR a los 3 años                             | 86%                                   | 74%                                     | 0,699        |
| CIR a los 3 años                             | 13%                                   | 25%                                     | 0,522        |

**Tabla Suplementaria 21.** Asociación de los pacientes con y sin delecciones de *BTG1* y las diferentes variables y el pronóstico.

|   | <i>BTG1</i><br>delecionado<br>n= 24 (8%) | <i>BTG1</i><br>no delecionado<br>n= 270 (92%) | <i>P</i> |
|---|--|---|----------|
| <b>Características demográficas</b>       |  |   |          |
| Sexo masculino                            | 12 (50)                                  | 160 (59)                                      | 0,505    |
| Edad (años), media                        | 23,7                                     | 24,3  | 0,897    |
| ≤ 1 año                                   | 0 (0)                                    | 7 (3)   | 0,547    |
| > 1 - 9 años                              | 10 (42)                                  | 102 (38)                                      | 0,876    |
| 10 - 14 años                              | 2 (8)                                    | 11 (4)  | 0,287    |
| 15 - 30 años                              | 3 (12)                                   | 57 (21)                                       | 0,237    |
| 31 - 64 años                              | 8 (33)                                   | 75 (28)                                       | 0,357    |
| ≥ 65 años                                 | 1 (4)                                    | 18 (7)  | 0,528    |
| <b>Características clínico-biológicas</b> |  |   |          |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L), media   | 30,6                                     | 48,1  | 0,360    |

Tablas Suplementarias

|  | <b>BTG1<br/>delecionado</b> | <b>BTG1<br/>no delecionado</b> | <b>P</b>     |
|--|-----------------------------|--------------------------------|--------------|
| Hemoglobina (g/dL), media                    | 8,3                         | 8,8                            | 0,355        |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L), media       | 64                          | 88                             | 0,054        |
| Blastos en MO (%), media                     | 93                          | 86                             | <b>0,003</b> |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                       | 1 (4)                       | 22 (9)                         | 0,409        |
| Ácido úrico elevado                          | 5 (25)                      | 40 (18)                        | 0,323        |
| LDH elevada                                  | 18 (78)                     | 197 (78)                       | 0,965        |
| Infiltración del SNC                         | 0 (0)                       | 8 (4)                          | 0,625        |
| Masa mediastínica                            | 0 (0)                       | 9 (13)                         | 0,574        |
| Adenopatías                                  | 1 (6)                       | 50 (27)                        | <b>0,034</b> |
| Hepatomegalia                                | 4 (22)                      | 54 (29)                        | 0,745        |
| Esplenomegalia                               | 4 (22)                      | 62 (33)                        | 0,503        |
| <b>Inmunofenotipo</b>                        |                             |                                |              |
| Fenotipo B                                   | 24 (100)                    | 226 (85)                       | <b>0,024</b> |
| Pro-B o B nula                               | 3 (12)                      | 29 (11)                        | 0,499        |
| B común                                      | 17 (71)                     | 150 (56)                       | 0,108        |
| Pre-B  | 4 (17)                      | 44 (16)                        | 0,574        |
| <b>Citogenética</b>                          |                             |                                |              |
| No valorable                                 | 6 (25)                      | 51 (29)                        | 0,311        |
| Cariotipo Normal                             | 0 (0)                       | 39 (14)                        | <b>0,028</b> |
| t(9;22)                                      | 2 (8)                       | 31 (11)                        | 0,478        |
| t(11q23)                                     | 1 (4)                       | 17 (6)                         | 0,557        |
| t(12;21)                                     | 5 (21)                      | 26 (9)                         | 0,091        |
| Hiperdiploidía alta                          | 4 (17)                      | 35 (13)                        | 0,397        |
| Otras alt. numéricas                         | 0 (0)                       | 16 (6)                         | 0,247        |
| Otras alt. estructurales                     | 3 (13)                      | 34 (13)                        | 0,644        |
| Cariotipo Complejo                           | 0 (0)                       | 6 (2)                          | 0,597        |
| <b>Respuesta al tratamiento de inducción</b> |                             |                                |              |
| Respuesta lenta                              | 10 (42)                     | 49 (21)                        | <b>0,048</b> |
| Tasa de RC                                   | 21 (88)                     | 242 (96)                       | 0,110        |
| Resistencia                                  | 3 (12)                      | 11 (4)                         | 0,110        |
| Mortalidad                                   | 0 (0)                       | 15 (6)                         | 0,267        |
| <b>Supervivencia</b>                         |                             |                                |              |
| SG a los 3 años                              | 57%                         | 64%                            | 0,979        |
| SLR a los 3 años                             | 71%                         | 68%                            | 0,923        |
| CIR a los 3 años                             | 27%                         | 27%                            | 0,829        |

**Tabla Suplementaria 22.** Asociación de los pacientes con y sin deleciones de *EBF1* y las diferentes variables y el pronóstico.

|  | <i>EBF1</i><br>delecionado | <i>EBF1</i><br>no delecionado | <i>P</i>     |
|--|----------------------------|-------------------------------|--------------|
|  | n= 10 (3)                  | n= 284 (97%)                  |              |
| <b>Características demográficas</b>          |                            |                               |              |
| Sexo masculino                               | 8 (80)                     | 164 (58)                      | 0,140        |
| Edad (años), media                           | 34                         | 24                            | 0,163        |
| ≤ 1 año                                      | 0 (0)                      | 7 (3)                         | 0,783        |
| > 1 - 9 años                                 | 1 (10)                     | 111 (39)                      | 0,056        |
| 10 - 14 años                                 | 0 (0)                      | 13 (5)                        | 0,632        |
| 15 - 30 años                                 | 4 (40)                     | 56 (20)                       | 0,124        |
| 31 - 64 años                                 | 4 (40)                     | 79 (28)                       | 0,302        |
| ≥ 65 años                                    | 1 (10)                     | 18 (6)                        | 0,493        |
| <b>Características clínico-biológicas</b>    |                            |                               |              |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L), media      | 56,4                       | 46,4                          | 0,737        |
| Hemoglobina (g/dL), media                    | 10,0                       | 8,7                           | 0,163        |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L), media       | 99                         | 85                            | 0,651        |
| Blastos en MO (%), media                     | 89                         | 86                            | 0,704        |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                       | 2 (22)                     | 21 (8)                        | 0,166        |
| Ácido úrico elevado                          | 2 (29)                     | 43 (19)                       | 0,396        |
| LDH elevada                                  | 7 (78)                     | 208 (78)                      | 0,629        |
| Infiltración del SNC                         | 0 (0)                      | 8 (4)                         | 0,698        |
| Masa mediastínica                            | 1 (33)                     | 8 (12)                        | 0,338        |
| Adenopatías                                  | 4 (44)                     | 47 (24)                       | 0,159        |
| Hepatomegalia                                | 3 (33)                     | 55 (28)                       | 0,493        |
| Esplenomegalia                               | 2 (22)                     | 64 (32)                       | 0,406        |
| <b>Inmunofenotipo</b>                        |                            |                               |              |
| Fenotipo B                                   | 8 (80)                     | 242 (86)                      | 0,412        |
| Pro-B o B nula                               | 1 (10)                     | 31 (11)                       | 0,702        |
| B común                                      | 7 (70)                     | 160 (56)                      | 0,302        |
| Pre-B  | 0 (0)                      | 48 (17)                       | 0,163        |
| <b>Citogenética</b>                          |                            |                               |              |
| No valorable                                 | 3 (30)                     | 54 (19)                       | 0,302        |
| Cariotipo Normal                             | 1 (10)                     | 38 (13)                       | 0,608        |
| t(9;22)                                      | 0 (0)                      | 33 (12)                       | 0,298        |
| t(11q23)                                     | 0 (0)                      | 18 (6)                        | 0,526        |
| t(12;21)                                     | 0 (0)                      | 31 (11)                       | 0,322        |
| Hiperdiploidía alta                          | 1 (10)                     | 38 (13)                       | 0,608        |
| Otras alt. numéricas                         | 1 (10)                     | 15 (5)                        | 0,434        |
| Otras alt. estructurales                     | 4 (40)                     | 33 (12)                       | <b>0,026</b> |
| Cariotipo Complejo                           | 0 (0)                      | 6 (2)                         | 0,611        |
| <b>Respuesta al tratamiento de inducción</b> |                            |                               |              |
| Respuesta lenta                              | 4 (50)                     | 55 (22)                       | 0,088        |
| Tasa de RC                                   | 8 (89)                     | 255 (95)                      | 0,377        |

|                      | <b>EBF1<br/>delecionado</b> | <b>EBF1<br/>no delecionado</b> | <b>P</b> |
|----------------------|-----------------------------|--------------------------------|----------|
| Resistencia          | 1 (11)                      | 13 (5)                         | 0,377    |
| Mortalidad           | 1 (10)                      | 14 (5)                         | 0,415    |
| <b>Supervivencia</b> |                             |                                |          |
| SG a los 3 años      | 57%                         | 64%                            | 0,282    |
| SLR a los 3 años     | 66%                         | 69%                            | 0,353    |
| CIR a los 3 años     | 25%                         | 27%                            | 0,605    |

**Tabla Suplementaria 23.** Asociación de los pacientes con y sin deleciones de la región PAR1 y las diferentes variables y el pronóstico.

|   | <b>Región PAR1<br/>delecionada</b> | <b>Región PAR1<br/>no delecionada</b> | <b>P</b>     |
|---|------------------------------------|---------------------------------------|--------------|
|   | n = 17 (6%)                        | n = 277 (94%)                         |              |
| <b>Características demográficas</b>       |                                    |                                       |              |
| Sexo masculino                            | 9 (53)                             | 161 (59)                              | 0,416        |
| Edad (años), media                        | 25                                 | 24                                    | 0,929        |
| ≤ 1 año                                   | 1 (6)                              | 6 (2)                                 | 0,346        |
| > 1 - 9 años                              | 4 (23)                             | 108 (39)                              | 0,149        |
| 10 - 14 años                              | 1 (6)                              | 12 (4)                                | 0,549        |
| 15 - 30 años                              | 5 (29)                             | 54 (20)                               | 0,244        |
| 31 - 64 años                              | 5 (29)                             | 77 (28)                               | 0,546        |
| ≥ 65 años                                 | 1 (6)                              | 18 (7)                                | 0,695        |
| <b>Características clínico-biológicas</b> |                                    |                                       |              |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L), media   | 43,7                               | 45,9                                  | 0,919        |
| Hemoglobina (g/dL), media                 | 9,1                                | 8,7                                   | 0,618        |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L), media    | 75                                 | 86                                    | 0,620        |
| Blastos en MO (%), media                  | 90                                 | 86                                    | <b>0,013</b> |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                    | 1 (7)                              | 21 (8)                                | 0,659        |
| Ácido úrico elevado                       | 5 (38)                             | 40 (18)                               | 0,078        |
| LDH elevada                               | 13 (87)                            | 201 (78)                              | 0,324        |
| Infiltración del SNC                      | 0 (0)                              | 8 (4)                                 | 0,555        |
| Masa mediastínica                         | 0 (0)                              | 9 (13)                                | 0,662        |
| Adenopatías                               | 2 (15)                             | 47 (25)                               | 0,352        |
| Hepatomegalia                             | 3 (23)                             | 54 (28)                               | 0,479        |
| Esplenomegalia                            | 2 (15)                             | 63 (33)                               | 0,156        |
| <b>Inmunofenotipo</b>                     |                                    |                                       |              |
| Fenotipo B                                | 14 (88)                            | 234 (86)                              | 0,612        |
| Pro-B o B nula                            | 1 (6)                              | 31 (11)                               | 0,423        |
| B común                                   | 10 (59)                            | 155 (56)                              | 0,843        |
| Pre-B                                     | 3 (18)                             | 45 (16)                               | 0,551        |
| Fenotipo T                                | 2 (12)                             | 38 (14)                               | 0,612        |
| Pre-T (supracortical)                     | 0 (0)                              | 9 (3)                                 | 0,578        |

|  | Región PAR1<br>delecionada | Región PAR1<br>no delecionada | P            |
|--|----------------------------|-------------------------------|--------------|
| T cortical (común)                           | 1 (6)                      | 19 (7)                        | 0,672        |
| T madura                                     | 1 (6)                      | 4 (1)                         | 0,261        |
| <b>Citogenética</b>                          |                            |                               |              |
| No valorable                                 | 1 (6)                      | 56 (20)                       | 0,120        |
| Cariotipo Normal                             | 3 (18)                     | 36 (13)                       | 0,402        |
| t(9;22)                                      | 1 (6)                      | 31 (12)                       | 0,423        |
| t(11q23)                                     | 0 (0)                      | 18 (6)                        | 0,328        |
| t(12;21)                                     | 2 (12)                     | 29 (10)                       | 0,559        |
| Hiperdiploidía alta                          | 0 (0)                      | 39 (14)                       | 0,081        |
| Otras alt. numéricas                         | 1 (6)                      | 15 (5)                        | 0,627        |
| Otras alt. estructurales                     | 5 (29)                     | 31 (11)                       | <b>0,044</b> |
| Cariotipo Complejo                           | 2 (12)                     | 4 (1)                         | <b>0,042</b> |
| <b>Respuesta al tratamiento de inducción</b> |                            |                               |              |
| Respuesta lenta                              | 3 (23)                     | 55 (23)                       | 0,649        |
| Tasa de RC                                   | 17 (100)                   | 244 (95)                      | 0,400        |
| Resistencia                                  | 0 (0)                      | 14 (5)                        | 0,400        |
| Mortalidad                                   | 0 (0)                      | 15 (5)                        | 0,395        |
| <b>Supervivencia</b>                         |                            |                               |              |
| SG a los 3 años                              | 48%                        | 64%                           | 0,153        |
| SLR a los 3 años                             | 62%                        | 69%                           | 0,728        |
| CIR a los 3 años                             | 26%                        | 27%                           | 0,967        |

**Tabla Suplementaria 24.** Análisis pronóstico de todas las variables estudiadas en este trabajo en los pacientes pediátricos.

| Pacientes pediátricos                    | Respuesta a la quimioterapia de inducción |              |             |              |            |              | Supervivencia   |              |                  |              |                  |              |
|--|---|--------------|-------------|--------------|------------|--------------|-----------------|--------------|------------------|--------------|------------------|--------------|
|  | Respuesta lenta*                          |              | Resistencia |              | Mortalidad |              | SG a los 3 años |              | SLR a los 3 años |              | CIR a los 3 años |              |
| Variables                                | n (%)                                     | P            | n (%)       | P            | n (%)      | P            | %               | P            | %                | P            | %                | P            |
| Toda la serie (n= 167)                   | 25 (17)                                   |              | 2 (1)       |              | 3 (2)      |              | 86              |              | 80               |              | 20               |              |
| <b>Variables demográficas y clínicas</b> |   |              |             |              |            |              |                 |              |                  |              |                  |              |
| Sexo masculino                           | 23  | 0,157        | 1 (1)       | 0,652        | 2 (2)      | 0,638        | 88              | 0,540        | 76               | <b>0,036</b> | 24               | <b>0,024</b> |
| Edad (años)                              |   |              |             |              |            |              |                 |              |                  |              |                  |              |
| ≤ 1                                      | 3 (43)                                    | 0,121        | 1 (12)      | 0,095        | 0 (0)      | 0,862        | 63              | <b>0,004</b> | 64               | 0,361        | 29               | 0,684        |
| > 1 y < 10                               | 20 (15)                                   | <b>0,015</b> | 0 (0)       | <b>0,028</b> | 2 (2)      | 0,438        | 90              | <b>0,001</b> | 82               | 0,136        | 18               | 0,244        |
| ≥ 10 y < 14                              | 7 (35)                                    | 0,051        | 1 (5)       | 0,230        | 1 (5)      | 0,334        | 66              | 0,054        | 72               | 0,253        | 27               | 0,299        |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L)         |   |              |             |              |            |              |                 |              |                  |              |                  |              |
| > 10                                     | 16 (19)                                   | 0,888        | 2 (2)       | 0,286        | 0 (0)      | 0,104        | 84              | 0,999        | 83               | 0,922        | 17               | 0,942        |
| > 30                                     | 12 (29)                                   | 0,073        | 1 (2)       | 0,466        | 0 (0)      | 0,397        | 76              | <b>0,034</b> | 73               | 0,100        | 25               | 0,180        |
| > 100                                    | 5 (29)                                    | 0,186        | 1 (5)       | 0,219        | 0 (0)      | 0,694        | 68              | <b>0,001</b> | 53               | <b>0,001</b> | 40               | <b>0,010</b> |
| Hemoglobina (g/dL)                       |   |              |             |              |            |              |                 |              |                  |              |                  |              |
| < 8                                      | 11 (13)                                   | 0,079        | 1 (1)       | 0,733        | 2 (2)      | 0,532        | 79              | 0,100        | 76               | 0,618        | 17               | 0,762        |
| < 10                                     | 20 (16)                                   | 0,338        | 2 (2)       | 0,561        | 3 (2)      | 0,427        | 84              | 0,644        | 78               | 0,608        | 18               | 0,657        |
| < 12                                     | 26 (18)                                   | 0,296        | 2 (1)       | 0,825        | 3 (2)      | 0,753        | 77              | 0,279        | 76               | 0,424        | 19               | 0,477        |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L)          |   |              |             |              |            |              |                 |              |                  |              |                  |              |
| < 50                                     | 17 (21)                                   | 0,648        | 1 (1)       | 0,736        | 2 (2)      | 0,527        | 90              | 0,311        | 83               | 0,323        | 17               | 0,390        |
| < 75                                     | 23 (21)                                   | 0,147        | 2 (2)       | 0,446        | 2 (2)      | 0,704        | 87              | 0,673        | 81               | 0,545        | 19               | 0,580        |
| < 100                                    | 24 (21)                                   | 0,198        | 2 (2)       | 0,523        | 2 (2)      | 0,625        | 87              | 0,449        | 81               | 0,883        | 19               | 0,941        |
| Blastos en MO (%)                        |   |              |             |              |            |              |                 |              |                  |              |                  |              |
| > 50                                     | 25 (17)                                   | 0,688        | 1 (1)       | 0,986        | 2 (1)      | 0,059        | 86              | 0,243        | 81               | 0,521        | 19               | 0,425        |
| > 75                                     | 24 (18)                                   | 0,359        | 1 (1)       | 0,926        | 1 (1)      | <b>0,020</b> | 86              | 0,465        | 81               | 0,648        | 19               | 0,260        |
| > 90                                     | 15 (15)                                   | 0,589        | 1 (1)       | 0,669        | 1 (1)      | 0,264        | 87              | 0,138        | 83               | 0,378        | 17               | 0,427        |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                   | 1 (33)                                    | 0,468        | 0 (0)       | 0,975        | 1 (33)     | 0,054        | 67              | 0,337        | n.a.             | 0,493        | 0                | 0,480        |
| LDH elevada                              | 24 (20)                                   | 0,923        | 2 (2)       | 0,643        | 1 (1)      | 0,363        | 86              | 0,557        | 79               | 0,848        | 21               | 0,850        |
| Ácido úrico elevado                      | 6 (27)                                    | 0,198        | 1 (5)       | 0,276        | 1 (4)      | 0,284        | 69              | <b>0,003</b> | 62               | <b>0,012</b> | 37               | <b>0,018</b> |

| Pacientes pediátricos                       | Respuesta a la quimioterapia de inducción |       |        |       |             |       |       |        |            |        |       |        |               |   |       |   |
|---|---|-------|--------|-------|-------------|-------|-------|--------|------------|--------|-------|--------|---------------|---|-------|---|
|   | Respuesta lenta*                          |       |        |       | Resistencia |       |       |        | Mortalidad |        |       |        | Supervivencia |   |       |   |
|   | n (%)                                     | P     | n (%)  | P     | n (%)       | P     | n (%) | P      | n (%)      | P      | n (%) | P      | n (%)         | P | n (%) | P |
| <b>Variables</b>                            |   |       |        |       |             |       |       |        |            |        |       |        |               |   |       |   |
| Infiltración del SNC                        | 2 (67)                                    | 0,098 | 0 (0)  | 0,973 | 0 (0)       | 0,947 | n.a.  | 0,560  | n.a.       | 0,510  | 0     | 0,511  |               |   |       |   |
| Adenopatías                                 | 3 (33)                                    | 0,315 | 0 (0)  | 0,842 | 0 (0)       | 0,716 | 100   | 0,551  | 80         | 0,785  | 20    | 0,764  |               |   |       |   |
| Hepatomegalia                               | 5 (17)                                    | 0,442 | 1 (3)  | 0,579 | 0 (0)       | 0,190 | 87    | 0,434  | 88         | 0,317  | 10    | 0,447  |               |   |       |   |
| Esplenomegalia                              | 8 (25)                                    | 0,403 | 1 (3)  | 0,614 | 0 (0)       | 0,161 | 85    | 0,746  | 89         | 0,244  | 11    | 0,515  |               |   |       |   |
| <b>Inmunofenotipo</b>                       |   |       |        |       |             |       |       |        |            |        |       |        |               |   |       |   |
| Fenotipo B                                  | 24 (17)                                   | 0,215 | 1 (1)  | 0,907 | 3 (2)       | 0,750 | 88    | 0,198  | 81         | 0,012  | 18    | 0,026  |               |   |       |   |
| Pro-B o B nula                              | 2 (20)                                    | 0,589 | 0 (0)  | 0,879 | 0 (0)       | 0,814 | 71    | 0,184  | 68         | 0,298  | 30    | 0,384  |               |   |       |   |
| B común                                     | 17 (17)                                   | 0,315 | 1 (1)  | 0,622 | 3 (3)       | 0,239 | 92    | 0,046  | 87         | 0,012  | 13    | 0,018  |               |   |       |   |
| Pre-B                                       | 5 (14)                                    | 0,317 | 0 (0)  | 0,618 | 0 (0)       | 0,491 | 84    | 0,672  | 70         | 0,431  | 30    | 0,382  |               |   |       |   |
| Fenotipo T                                  | 4 (29)                                    | 0,215 | 0 (0)  | 0,907 | 0 (0)       | 0,750 | 71    | 0,198  | 64         | 0,012  | 34    | 0,026  |               |   |       |   |
| Pre-T (supracortical)                       | 2 (40)                                    | 0,233 | 0 (0)  | 0,940 | 0 (0)       | 0,912 | 60    | 0,109  | n.a.       | <0,001 | n.a.  | <0,001 |               |   |       |   |
| T cortical (común)                          | 2 (33)                                    | 0,311 | 0 (0)  | 0,916 | 0 (0)       | 0,879 | 86    | 0,966  | 83         | 0,527  | 14    | 0,647  |               |   |       |   |
| <b>Citogenética</b>                         |   |       |        |       |             |       |       |        |            |        |       |        |               |   |       |   |
| Cariotipo Normal                            | 3 (23)                                    | 0,450 | 0 (0)  | 0,836 | 0 (0)       | 0,768 | 90    | 0,803  | 75         | 0,440  | 25    | 0,421  |               |   |       |   |
| t(9;22)                                     | 1 (25)                                    | 0,565 | 0 (0)  | 0,952 | 0 (0)       | 0,929 | 50    | <0,001 | n.a.       | 0,009  | n.a.  | 0,043  |               |   |       |   |
| t(11q23)                                    | 2 (25)                                    | 0,459 | 1 (11) | 0,107 | 0 (0)       | 0,846 | 67    | 0,042  | 58         | 0,041  | 38    | 0,097  |               |   |       |   |
| t(12;21)                                    | 8 (23)                                    | 0,275 | 0 (0)  | 0,627 | 0 (0)       | 0,503 | 100   | 0,012  | 93         | 0,085  | 7     | 0,089  |               |   |       |   |
| Hiperdiploidía alta                         | 6 (16)                                    | 0,782 | 0 (0)  | 0,580 | 1 (2)       | 0,563 | 89    | 0,374  | 87         | 0,137  | 9     | 0,127  |               |   |       |   |
| Otras alt. numéricas                        | 0 (0)                                     | 0,158 | 0 (0)  | 0,905 | 1 (11)      | 0,154 | 78    | 0,165  | 53         | 0,236  | 48    | 0,241  |               |   |       |   |
| Otras alt. estructurales                    | 2 (15)                                    | 0,550 | 0 (0)  | 0,847 | 0 (0)       | 0,783 | 85    | 0,671  | 74         | 0,299  | 25    | 0,369  |               |   |       |   |
| <b>Grupos de riesgo citogenético (SHOP)</b> |   |       |        |       |             |       |       |        |            |        |       |        |               |   |       |   |
| Riesgo Estándar                             | 17 (20)                                   |       | 0 (0)  |       | 1 (1)       |       | 94    |        | 89         |        | 11    |        |               |   |       |   |
| Riesgo Intermedio                           | 10 (16)                                   | 0,744 | 1 (2)  | 0,073 | 2 (3)       | 0,583 | 83    | <0,001 | 73         | <0,001 | 26    | 0,003  |               |   |       |   |
| Alto Riesgo                                 | 3 (23)                                    |       | 1 (7)  |       | 0 (0)       |       | 57    |        | 39         |        | 54    |        |               |   |       |   |

| Pacientes pediátricos           | Respuesta a la quimioterapia de inducción |       |       |       |             |       |       |       |            |       |       |       |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
|---------------------------------|---|-------|-------|-------|-------------|-------|-------|-------|------------|-------|-------|-------|-----------------|---|-------|---|------------------|---|-------|---|------------------|---|--|--|
|                                 | Respuesta lenta*                          |       |       |       | Resistencia |       |       |       | Mortalidad |       |       |       | SG a los 3 años |   |       |   | SLR a los 3 años |   |       |   | CIR a los 3 años |   |  |  |
|                                 | n (%)                                     | P     | n (%) | P     | n (%)       | P     | n (%) | P     | n (%)      | P     | n (%) | P     | n (%)           | P | n (%) | P | n (%)            | P | n (%) | P | n (%)            | P |  |  |
| <b>Anomalías en IKZF1</b>       |   |       |       |       |             |       |       |       |            |       |       |       |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Delección de IKZF1              | 3 (27)                                    | 0,327 | 0 (0) | 0,915 | 0 (0)       | 0,840 | 86    | 0,741 | 75         | 0,433 | 25    | 0,422 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| IKZF1 monoalélica               | 2 (20)                                    | 0,583 | 0 (0) | 0,992 | 0 (0)       | 0,985 | 86    | 0,672 | 74         | 0,369 | 26    | 0,368 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| IKZF1 bialélica                 | 1 (100)                                   | 0,184 | 0 (0) | 0,922 | 0 (0)       | 0,853 | 100   | 0,753 | 100        | 0,73  | n.a.  | 0,739 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Expresión anómala               | 1 (14)                                    | 0,611 | 0 (0) | 0,913 | 0 (0)       | 0,874 | 83    | 0,078 | 43         | 0,099 | 57    | 0,084 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| IKZF1 alterado                  | 3 (20)                                    | 0,525 | 0 (0) | 0,887 | 0 (0)       | 0,789 | 83    | 0,096 | 57         | 0,046 | 43    | 0,033 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Alteración monoalélica          | 2 (14)                                    | 0,527 | 0 (0) | 0,895 | 0 (0)       | 0,803 | 83    | 0,077 | 57         | 0,035 | 43    | 0,026 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Alteración bialélica            | 1 (100)                                   | 0,178 | 0 (0) | 0,992 | 0 (0)       | 0,985 | 100   | 0,746 | 100        | 0,725 | n.a.  | 0,739 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| <b>Delecciones intragénicas</b> |   |       |       |       |             |       |       |       |            |       |       |       |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Delección CDKN2A                | 4 (10)                                    | 0,103 | 0 (0) | 0,682 | 0 (0)       | 0,470 | 89    | 0,515 | 86         | 0,928 | 13    | 0,893 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| CDKN2A monoalélica              | 1 (6)                                     | 0,111 | 0 (0) | 0,853 | 0 (0)       | 0,730 | 88    | 0,560 | 87         | 0,665 | 11    | 0,445 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| CDKN2A bialélica                | 3 (17)                                    | 0,569 | 0 (0) | 0,845 | 0 (0)       | 0,717 | 88    | 0,971 | 84         | 0,534 | 16    | 0,539 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Delección CDKN2B                | 4 (10)                                    | 0,103 | 0 (0) | 0,682 | 0 (0)       | 0,470 | 89    | 0,515 | 86         | 0,928 | 13    | 0,893 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| CDKN2B monoalélica              | 1 (6)                                     | 0,111 | 0 (0) | 0,853 | 0 (0)       | 0,730 | 88    | 0,560 | 87         | 0,665 | 12    | 0,614 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| CDKN2B bialélica                | 3 (15)                                    | 0,474 | 0 (0) | 0,829 | 0 (0)       | 0,691 | 89    | 0,797 | 86         | 0,768 | 16    | 0,763 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Delección PAX5                  | 1 (4)                                     | 0,034 | 0 (0) | 0,806 | 0 (0)       | 0,654 | 96    | 0,089 | 91         | 0,218 | 9     | 0,226 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Delección ETV6                  | 2 (10)                                    | 0,236 | 0 (0) | 0,845 | 0 (0)       | 0,717 | 100   | 0,163 | 93         | 0,454 | 7     | 0,450 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Delección BTG1                  | 3 (25)                                    | 0,385 | 0 (0) | 0,907 | 0 (0)       | 0,825 | 100   | 0,147 | 87         | 0,772 | 13    | 0,778 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Delección EBF1                  | 0 (0)                                     | 0,816 | 0 (0) | 0,992 | 0 (0)       | 0,985 | 100   | 0,689 | 100        | 0,625 | 0     | 0,603 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Delección RB1                   | 2 (14)                                    | 0,503 | 0 (0) | 0,891 | 0 (0)       | 0,797 | 84    | 0,815 | 84         | 0,490 | 16    | 0,489 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| RB1 monoalélica                 | 1 (8)                                     | 0,264 | 0 (0) | 0,899 | 0 (0)       | 0,811 | 82    | 0,922 | 83         | 0,365 | 17    | 0,370 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| RB1 bialélica                   | 1 (100)                                   | 0,184 | 0 (0) | 0,992 | 0 (0)       | 0,895 | 100   | 0,653 | 100        | 0,593 | 0     | 0,579 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Delección PAR1                  | 1 (17)                                    | 0,695 | 0 (0) | 0,953 | 0 (0)       | 0,910 | 83    | 0,190 | 67         | 0,960 | 28    | 0,924 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |

\*Respuesta lenta: >5% blastos en MO el día 14 de quimioterapia de inducción

Tabla Suplementaria 25. Análisis pronóstico de todas las variables estudiadas en este trabajo en los pacientes adultos.

| Pacientes adultos                        | Respuesta a la quimioterapia de inducción |             |            |                 | Supervivencia    |                   |    |                   |      |              |
|--|---|-------------|------------|-----------------|------------------|-------------------|----|-------------------|------|--------------|
|  | Respuesta lenta*                          | Resistencia | Mortalidad | SG a los 3 años | SLR a los 3 años | CIR a los 3 años  | P  | %                 | P    |              |
| Variables                                | n (%)                                     | P           | n (%)      | P               | %                | P                 | %  | P                 | P    |              |
| Toda la serie (n= 172)                   | 45 (33)                                   |             | 13 (8)     |                 | 14 (8)           |                   | 44 |                   | 55   | 40           |
| <b>Variables demográficas y clínicas</b> |   |             |            |                 |                  |                   |    |                   |      |              |
| Sexo masculino                           | 26 (35)                                   | 0,752       | 6 (7)      | 0,774           | 8 (9)            | 0,880             | 46 | 0,526             | 59   | 0,054        |
| Edad (años)                              |   |             |            |                 |                  |                   |    |                   |      |              |
| ≥ 14 y < 30                              | 19 (36)                                   | 0,684       | 2 (3)      | 0,113           | 3 (4)            | 0,283             | 61 | 0,066             | 61   | 0,314        |
| ≥ 30 y < 65                              | 23 (31)                                   | 0,678       | 9 (11)     | 0,357           | 3 (3)            | <b>0,046</b>      | 38 | <b>&lt; 0,001</b> | 54   | 0,843        |
| ≥ 65                                     | 3 (3)                                     | 0,617       | 2 (18)     | 0,225           | 8 (42)           | <b>&lt; 0,001</b> | 7  | <b>&lt; 0,001</b> | n.a. | <b>0,042</b> |
| Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L)         |   |             |            |                 |                  |                   |    |                   |      |              |
| > 25                                     | 16 (36)                                   | 0,611       | 3 (5)      | 0,338           | 5 (8)            | 0,511             | 35 | 0,502             | 44   | 0,334        |
| > 50                                     | 14 (45)                                   | 0,129       | 2 (6)      | 0,519           | 3 (8)            | 0,547             | 33 | 0,310             | 36   | 0,078        |
| > 100                                    | 6 (35)                                    | 0,782       | 1 (5)      | 0,559           | 0 (0)            | 0,202             | 42 | 0,892             | 45   | 0,274        |
| Hemoglobina (g/dL)                       |   |             |            |                 |                  |                   |    |                   |      |              |
| < 8                                      | 10 (24)                                   | 0,171       | 3 (7)      | 0,610           | 7 (14)           | 0,062             | 52 | 0,990             | 71   | 0,302        |
| < 10                                     | 23 (28)                                   | 0,167       | 7 (8)      | 0,552           | 10 (10)          | 0,197             | 47 | 0,720             | 58   | 0,273        |
| < 12                                     | 33 (31)                                   | 0,869       | 10 (8)     | 0,332           | 11 (8)           | 0,535             | 44 | 0,615             | 57   | 0,249        |
| Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L)          |   |             |            |                 |                  |                   |    |                   |      |              |
| < 50                                     | 17 (27)                                   | 0,437       | 6 (9)      | 0,818           | 7 (9)            | 0,835             | 35 | <b>0,044</b>      | 55   | 0,691        |
| < 75                                     | 24 (31)                                   | 0,905       | 7 (8)      | 0,476           | 10 (10)          | 0,299             | 36 | <b>0,005</b>      | 55   | 0,358        |
| < 100                                    | 28 (30)                                   | 0,724       | 7 (7)      | 0,471           | 11 10            | 0,190             | 37 | <b>0,005</b>      | 48   | 0,026        |
| Blastos en MO (%)                        |   |             |            |                 |                  |                   |    |                   |      |              |
| > 50                                     | 39 (33)                                   | 0,999       | 9 (7)      | 0,279           | 11 (8)           | 0,688             | 43 | 0,733             | 54   | 0,559        |
| > 75                                     | 33 (37)                                   | 0,171       | 9 (8)      | 0,516           | 10 (8)           | 0,466             | 43 | 0,188             | 53   | 0,369        |
| > 90                                     | 22 (39)                                   | 0,286       | 4 (6)      | 0,385           | 3 (4)            | 0,145             | 48 | 0,749             | 54   | 0,435        |
| Creatinina ≥ 1,2 mg/dL                   | 6 (30)                                    | 0,911       | 1 (5)      | 0,594           | 2 (9)            | 0,517             | 46 | 0,848             | 70   | 0,467        |
| LDH elevada                              | 32 (32)                                   | 0,425       | 7 (6)      | 0,149           | 8 (7)            | 0,555             | 39 | 0,538             | 50   | 0,336        |
| Ácido úrico elevado                      | 9 (39)                                    | 0,547       | 2 (8)      | 0,507           | 3 (11)           | 0,409             | 21 | <b>0,030</b>      | 45   | 0,315        |

| Pacientes adultos                          | Respuesta a la quimioterapia de inducción |       |        |       |             |       |       |       |            |       |       |       |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
|--|---|-------|--------|-------|-------------|-------|-------|-------|------------|-------|-------|-------|-----------------|---|-------|---|------------------|---|-------|---|------------------|---|--|--|
|  | Respuesta lenta*                          |       |        |       | Resistencia |       |       |       | Mortalidad |       |       |       | SG a los 3 años |   |       |   | SLR a los 3 años |   |       |   | CIR a los 3 años |   |  |  |
|  | n (%)                                     | P     | n (%)  | P     | n (%)       | P     | n (%) | P     | n (%)      | P     | n (%) | P     | n (%)           | P | n (%) | P | n (%)            | P | n (%) | P | n (%)            | P |  |  |
| <b>Variables</b>                           |   |       |        |       |             |       |       |       |            |       |       |       |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Masa mediastínica                          | 4 (50)                                    | 0,258 | 1 (10) | 0,357 | 0 (0)       | 0,382 | 30    | 0,480 | 22         | 0,014 | 78    | 0,004 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Infiltración del SNC                       | 1 (33)                                    | 0,700 | 0 (0)  | 0,752 | 1 (20)      | 0,328 | 60    | 0,637 | 75         | 0,377 | 25    | 0,567 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Adenopatías                                | 17 (42)                                   | 0,173 | 5 (11) | 0,215 | 1 (2)       | 0,117 | 52    | 0,352 | 49         | 0,934 | 47    | 0,682 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Hepatomegalia                              | 10 (37)                                   | 0,769 | 4 (13) | 0,145 | 1 (3)       | 0,347 | 42    | 0,801 | 40         | 0,169 | 56    | 0,106 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Esplenomegalia                             | 12 (37)                                   | 0,666 | 4 (11) | 0,220 | 2 (5)       | 0,535 | 48    | 0,700 | 47         | 0,962 | 48    | 0,843 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| <b>Inmunofenotipo</b>                      |   |       |        |       |             |       |       |       |            |       |       |       |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Fenotipo B                                 | 30 (27)                                   | 0,011 | 9 (7)  | 0,133 | 11 (8)      | 0,656 | 46    | 0,548 | 56         | 0,660 | 39    | 0,717 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Pro-B o B nula                             | 2 (12)                                    | 0,038 | 1 (5)  | 0,518 | 4 (17)      | 0,097 | 46    | 0,976 | 68         | 0,290 | 29    | 0,317 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| B común                                    | 22 (30)                                   | 0,590 | 5 (6)  | 0,334 | 7 (7)       | 0,933 | 49    | 0,651 | 55         | 0,893 | 39    | 0,865 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Pre-B                                      | 4 (20)                                    | 0,286 | 2 (9)  | 0,567 | 0 (0)       | 0,136 | 33    | 0,951 | 51         | 0,983 | 42    | 0,992 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Fenotipo T                                 | 13 (57)                                   | 0,011 | 4 (16) | 0,133 | 2 (7)       | 0,656 | 38    | 0,548 | 49         | 0,660 | 43    | 0,717 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Pre-T (supracortical)                      | 4 (100)                                   | 0,011 | 2 (50) | 0,034 | 1 (20)      | 0,349 | n.a.  | 0,297 | n.a.       | 0,601 | n.a.  | 0,525 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| T cortical (común)                         | 3 (27)                                    | 0,483 | 1 (7)  | 0,677 | 0 (0)       | 0,290 | 40    | 0,761 | 46         | 0,670 | 48    | 0,641 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| <b>Citogenética</b>                        |   |       |        |       |             |       |       |       |            |       |       |       |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Cariotipo Normal                           | 8 (33)                                    | 0,955 | 1 (4)  | 0,310 | 3 (10)      | 0,455 | 46    | 0,985 | 55         | 0,715 | 38    | 0,616 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| t(9;22)                                    | 5 (21)                                    | 0,254 | 2 (6)  | 0,511 | 1 (3)       | 0,223 | 41    | 0,640 | 59         | 0,991 | 38    | 0,949 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| t(4;11)                                    | 0 (0)                                     | 0,132 | 0 (0)  | 0,592 | 0 (0)       | 0,596 | 33    | 0,583 | 50         | 0,403 | 50    | 0,562 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| otras t(11q23)                             | 0 (0)                                     | 0,300 | 0 (0)  | 0,772 | 0 (0)       | 0,774 | n.a.  | 0,130 | n.a.       | 0,868 | n.a.  | 0,985 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Hiperdiploidia alta                        | 3 (43)                                    | 0,418 | 1 (12) | 0,505 | 2 (20)      | 0,190 | 37    | 0,357 | n.a.       | 0,864 | n.a.  | 0,990 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Otras alt. numéricas                       | 2 (22)                                    | 0,383 | 1 (10) | 0,587 | 3 (23)      | 0,076 | n.a.  | 0,328 | n.a.       | 0,792 | n.a.  | 0,816 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Otras alt. estructurales                   | 11 (50)                                   | 0,105 | 3 (12) | 0,338 | 1 (4)       | 0,341 | 39    | 0,621 | 49         | 0,949 | 37    | 0,558 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Cariotipo Complejo                         | 1 (20)                                    | 0,468 | 0 (0)  | 0,647 | 0 (0)       | 0,651 | n.a.  | 0,089 | n.a.       | 0,752 | n.a.  | 0,553 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| <b>Grupos de riesgo citogenético (MRC)</b> |   |       |        |       |             |       |       |       |            |       |       |       |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Riesgo Estándar                            | 3 (37)                                    |       | 1 (11) |       | 2 (18)      |       | 46    |       | 75         |       | 25    |       |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Riesgo Intermedio                          | 35 (38)                                   | 0,108 | 9 (9)  | 0,856 | 11 (10)     | 0,129 | 46    | 0,766 | 55         | 0,693 | 40    | 0,821 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Alto Riesgo                                | 7 (19)                                    |       | 3 (6)  |       | 1 (2)       |       | 37    |       | 55         |       | 40    |       |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |

| Pacientes adultos               | Respuesta a la quimioterapia de inducción |       |        |       |             |       |       |       |            |         |       |         | Supervivencia   |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
|---------------------------------|---|-------|--------|-------|-------------|-------|-------|-------|------------|---------|-------|---------|-----------------|---|-------|---|------------------|---|-------|---|------------------|---|--|--|
|                                 | Respuesta lenta*                          |       |        |       | Resistencia |       |       |       | Mortalidad |         |       |         | SG a los 3 años |   |       |   | SLR a los 3 años |   |       |   | CIR a los 3 años |   |  |  |
|                                 | n (%)                                     | P     | n (%)  | P     | n (%)       | P     | n (%) | P     | n (%)      | P       | n (%) | P       | n (%)           | P | n (%) | P | n (%)            | P | n (%) | P | n (%)            | P |  |  |
| <b>Anomalías en IKZF1</b>       |   |       |        |       |             |       |       |       |            |         |       |         |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Delección de IKZF1              | 17 (39)                                   | 0,498 | 6 (11) | 0,287 | 5 (9)       | 0,481 | 31    | 0,230 | 34         | 0,062   | 45    | 0,150   |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| IKZF1 monoalélica               | 15 (37)                                   | 0,771 | 5 (11) | 0,382 | 5 (10)      | 0,401 | 35    | 0,361 | 35         | 0,140   | 44    | 0,300   |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| IKZF1 bialélica                 | 2 (50)                                    | 0,412 | 1 (14) | 0,484 | 0 (0)       | 0,546 | 36    | 0,976 | 50         | 0,752   | n.a.  | 0,591   |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Expresión anómala               | 11 (46)                                   | 0,193 | 4 (14) | 0,213 | 3 (9)       | 0,584 | 37    | 0,657 | 53         | 0,703   | 31    | 0,408   |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| IKZF1 alterado                  | 18 (38)                                   | 0,507 | 7 (12) | 0,391 | 5 (8)       | 0,610 | 32    | 0,247 | 41         | 0,186   | 41    | 0,452   |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Alteración monoalélica          | 15 (37)                                   | 0,383 | 5 (10) | 0,412 | 5 (9)       | 0,428 | 35    | 0,513 | 35         | 0,140   | 41    | 0,513   |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Alteración bialélica            | 3 (50)                                    | 0,322 | 2 (20) | 0,212 | 0 (0)       | 0,422 | 25    | 0,263 | 43         | 0,396   | n.a.  | 0,602   |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| <b>Delecciones intragénicas</b> |   |       |        |       |             |       |       |       |            |         |       |         |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Delección CDKN2A                | 14 (36)                                   | 0,871 | 4 (10) | 0,493 | 8 (17)      | 0,014 | 25    | 0,005 | 46         | 0,644   | 43    | 0,813   |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| CDKN2A monoalélica              | 6 (32)                                    | 0,554 | 2 (10) | 0,528 | 6 (24)      | 0,007 | 36    | 0,382 | 58         | 0,546   | 37    | 0,693   |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| CDKN2A bialélica                | 8 (40)                                    | 0,687 | 2 (9)  | 0,584 | 2 (8)       | 0,586 | 14    | 0,005 | 35         | 0,176   | 47    | 0,516   |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Delección CDKN2B                | 10 (31)                                   | 0,971 | 2 (6)  | 0,401 | 6 (15)      | 0,066 | 20    | 0,001 | 37         | 0,184   | 47    | 0,488   |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| CDKN2B monoalélica              | 2 (13)                                    | 0,070 | 1 (7)  | 0,604 | 5 (25)      | 0,013 | 28    | 0,072 | 34         | 0,366   | 54    | 0,357   |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| CDKN2B bialélica                | 8 (47)                                    | 0,298 | 1 (6)  | 0,503 | 1 (5)       | 0,522 | 16    | 0,015 | 40         | 0,385   | 41    | 0,983   |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Delección PAX5                  | 9 (37)                                    | 0,834 | 6 (24) | 0,010 | 4 (14)      | 0,190 | 37    | 0,605 | 53         | 0,460   | 37    | 0,469   |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Delección ETV6                  | 3 (50)                                    | 0,312 | 1 (12) | 0,535 | 1 (11)      | 0,546 | 11    | 0,008 | 0          | < 0,001 | n.a.  | < 0,001 |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Delección BTG1                  | 7 (58)                                    | 0,060 | 3 (25) | 0,075 | 0 (0)       | 0,348 | 19    | 0,312 | 43         | 0,573   | 44    | 0,786   |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Delección EBF1                  | 4 (57)                                    | 0,171 | 1 (12) | 0,532 | 1 (11)      | 0,543 | 52    | 0,780 | 57         | 0,724   | 37    | 0,646   |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Delección RB1                   | 3 (23)                                    | 0,304 | 1 (6)  | 0,573 | 0 (0)       | 0,240 | 33    | 0,950 | 66         | 0,396   | 31    | 0,547   |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| RB1 monoalélica                 | 1 (14)                                    | 0,251 | 0 (0)  | 0,424 | 0 (0)       | 0,457 | 33    | 0,601 | 57         | 0,708   | 39    | 0,882   |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| RB1 bialélica                   | 2 (33)                                    | 0,678 | 1 (14) | 0,484 | 0 (0)       | 0,536 | 26    | 0,567 | 83         | 0,394   | 17    | 0,436   |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |
| Delección PAR1                  | 3 (43)                                    | 0,429 | 0 (0)  | 0,342 | 0 (0)       | 0,376 | 22    | 0,475 | 67         | 0,354   | 21    | 0,726   |                 |   |       |   |                  |   |       |   |                  |   |  |  |

\*Respuesta lenta: &gt;10% blastos en MO el día 14 de quimioterapia de inducción

