



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Tesis Doctoral

Implicación de las alteraciones en el número de copias en el pronóstico y progresión de la leucemia aguda linfoblástica de línea B del adulto

Jordi Ribera Salas

Tesis realizada bajo la dirección de:

Dra. Lurdes Zamora Plana y Prof. Josep M^a Ribera Santasusana

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina

Facultad de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona 2017

Para Luz y Manel

1. AGRADECIMIENTOS

Tengo la mala costumbre de pensar que tengo más tiempo del que realmente dispongo, o lo que es lo mismo, tiendo a calcular a la baja el tiempo que me va a llevar hacer las cosas. La elaboración de una Tesis Doctoral implica muchas horas de trabajo por lo que no es de extrañar que me dijera a mi mismo “tranquilo deja los agradecimientos para el final y céntrate en escribir”. Y hoy me digo a mi mismo “mal hecho, hay tantas personas a las que quiero agradecer su apoyo durante todo este tiempo que corro el riesgo de olvidarme a alguien”. Así que, de antemano, pido disculpas a aquellas personas que puedan quedar sin mencionar en mis agradecimientos. Aunque no lo parezca, esta sección de la Tesis es de las más difíciles y me sabría muy mal olvidarme de alguien.

En primer lugar, quisiera agradecer a mis directores su esfuerzo durante todo este tiempo, a pesar de la enorme carga de trabajo que supone su actividad asistencial. Ambos, a parte de ser grandes personas, son un claro ejemplo de dedicación a su profesión, espíritu docente y rigor científico, todas ellas cualidades indispensables para el avance de la ciencia. Gracias por las horas que os he robado, por vuestra clarividencia, por vuestros consejos, comentarios constructivos y estimulantes y por haberme hecho sentir tan arropado en todo momento. Sin duda, esta Tesis no hubiera sido posible sin vosotros.

Gracias también a la Dra. Fuensanta Millá y al Dr. Evarist Feliu por haberme ofrecido la oportunidad de trabajar en el laboratorio de hematología. Gracias, Dr. Feliu, por tu esfuerzo en la creación del Insitut Josep Carreras. Gracias a ambos por inculcar los valores que caracterizan a este laboratorio, que son el trabajo bien hecho, pero por encima de todo, el compañerismo y el respeto entre personas, elementos indispensables en cualquier ambiente laboral, al igual que en la vida. Gracias por fomentar el espíritu docente que también caracteriza a este servicio, parece increíble lo que se puede llegar a aprender en tan poco tiempo. La estrecha colaboración entre los diferentes departamentos del laboratorio, entre el laboratorio y la clínica, así como las numerosas sesiones formativas que se llevan a cabo en el servicio, han contribuido decisivamente en este aprendizaje y a que sienta pasión por mi trabajo.

Quiero agradecer también a todo el personal del laboratorio el haberme acogido con naturalidad y hacerme sentir uno más desde el primer momento. Esto no se olvida. Gracias por enseñarme todo lo que sé y por hacer vuestro trabajo lo mejor posible, se nota que sois muy conscientes que detrás de cada tubo o tejido que llega al laboratorio, hay un paciente y una familia que lo están pasando mal. Gracias, Jordi e Inés por explicar la citometría con tanta claridad y por vuestro espíritu educativo, sois un libro abierto y unos buscadores incansables de antígenos. Gracias Elisa,

Tomás y Alicia por el esfuerzo que realizáis en vuestro trabajo, todavía me cuesta diferenciar muchos tipos celulares, pero estoy convencido de que, gracias a vosotros, esto cambiará. Gracias a todo el equipo de citogenética (Isabel, Neus, Adela, Marisol, Javier, Nani y Carmen), identificar cromosomas y alteraciones cromosómicas parece más difícil que ver el Canal+ codificado, es admirable vuestra rapidez y aparente facilidad con la que hacéis vuestro trabajo. Gracias por estar ahí siempre que os he necesitado y gracias, Isabel, por todo tu apoyo. Gracias a todo el personal técnico del laboratorio (Marian, Sara, Ester, Manoli, Isa, Mena, Lucía, Minerva, Lúdia) así como el personal técnico eventual, y a Rosa y Anna por vuestra dedicación y vuestra actitud, por estar siempre en primera línea de batalla, y por facilitar tanto el trabajo a los demás. ¡Marian, no cambies nunca! Gracias Nuria, Montse y Mari por vuestra labor administrativa y por el cariño que desprendéis, no olvidéis que vosotras también sois una pieza vital en el engranaje del laboratorio. Me dejo lo mejor del laboratorio para el final. Gracias Lurdes, Marta, Silvia y Diana por vuestra paciencia, por enseñarme a manejar las pipetas, por enseñarme técnicas en las que hay que tener fe mientras las haces, ya que todos los reactivos son transparentes y no sabes si te has equivocado hasta el final de todo, cuando analizas los resultados, y te das cuenta, por ejemplo, que te has olvidado de añadir la polimerasa en la PCR. Todo lo que sé a nivel molecular os lo debo a vosotras. Gracias por hacerme sentir tan a gusto trabajando con vosotras, por las risas que nos hemos echado y nos echamos juntos y por vuestras camisetas que luzco con orgullo. ¡Os echo mucho de menos! Me reconforta saber que Pepe e Itzi trabajan ahora con vosotras, son dos personas sobradamente preparadas e inmensas a nivel humano. ¡Formáis un gran equipo!

Pese a que no tengo todo el trato que me gustaría con ellos, gracias al personal de enfermería y cuerpo de celadores, sois, probablemente, las personas que estáis más en contacto con los pacientes y familiares y constituís un pilar importantísimo en sus vidas a nivel emocional. Pero los reyes del factor emocional son los hematólogos, tanto adjuntos como residentes. Os digo de corazón a todos (Montse, Susana, Blanca, Christelle, Juanma, Miriam, Inés, Albert, Javier, Tomás, Elisa, Anna, Gladys, Marc, Laura y todos los médicos residentes que conozco y he conocido) que vuestra implicación profesional y sobretodo personal en el trato con el paciente, me parece admirable y nunca dejaré de sorprenderme. Viéndoos trabajar, uno se da cuenta de que hay que estar hecho de una pasta especial para ser médico y más cuando se es hemato-oncólogo. ¡Toda mi admiración por vuestro trabajo! Gracias por todo lo que aprendo de vosotros y gracias por vuestra humildad y dedicación. Gracias también por acordaros de nosotros en la recolección de muestras para investigación, sin ellas nuestro trabajo no sería posible, mil gracias.

Gracias Maria José, Mireia y Olgui por vuestra autoexigencia en vuestro trabajo, la cual es indispensable para las funciones que desempeñáis. Gracias Olgui, y sobretodo Mire, por el tiempo que os he robado con mi cabezonería, por repetir cálculos y por escuchar mis teorías para no dormir. Gracias también por enseñarme que la “n” es tu amiga y que no debemos juzgarla a la ligera, la culpa es nuestra por no tenerla siempre en cuenta cuando diseñamos los experimentos. Gracias por explicarme hasta la saciedad lo que significa el análisis de riesgos competitivos, hay conceptos que me cuesta asimilar. Gracias a ambas por vuestro esfuerzo para que se produzcan artículos de calidad en el servicio. Gracias, Mariajo, por haber formado a tanta gente en un aspecto tan clave para el progreso de la medicina como son los ensayos clínicos y la calidad. Gracias también por ser tan auténtica y por los buenos momentos que pasamos fuera del trabajo. Gracias, Carmen e Inma, por el trabajo de coordinación y atención, tanto de pacientes como familiares, que habéis hecho y hacéis, me parece un trabajo muy valioso.

Mi experiencia en el hospital es tan enriquecedora que solo tengo palabras de agradecimiento para todos, vosotros contribuís, sin ninguna duda, a la buena reputación que tiene el Servicio de Hematología de Can Ruti, tanto a nivel profesional como personal. También quisiera dar la gracias a todo el personal por contribuir, de manera imprescindible, a que el hospital funcione como un reloj y que podamos estar orgullosos de decir que trabajamos en Can Ruti.

Posteriormente, he tenido la suerte de formar parte del Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreras (IJC). Recuerdo mi “marcha del hospital” un poco traumática, pues me sentía muy a gusto trabajando en el laboratorio de Hematología. Por suerte, mis compañeros y amigos del IJC me han hecho muy fácil esta transición. Pese a ser un tipo de trabajo diferente, se respiran las mismas ganas de aprender, mejorar y colaborar que en el hospital. Es la primera vez que soy “de los mayores” (por edad) en un puesto de trabajo, pero trabajar con ellos me hace sentir más joven que nunca, su entusiasmo y buen humor se palpan y contagian en el día a día. Os pido perdón por mi apatía y poco espíritu colaborativo durante la redacción de esta Tesis, y os doy las gracias por todas las muestras de ánimo y apoyo que me habéis dado durante todo este tiempo. Gracias, Kiku, por procurar para todos lo mejor y por tu espíritu amable y conciliador. Gracias también por tu confianza y tus palabras de ánimo en todo momento. Mar i Neus, os aprecio un montón y os estoy muy agradecido, entre otras cosas, por vuestra labor con los análisis genómicos de *copy numbers*, imposible hacerlo sin vosotras, gracias por todo, no cambiéis nunca. Laura, muchas gracias por ser tan generosa compartiendo tus conocimientos, tu inteligencia y capacidad resolutiva son realmente admirables. Gracias por hacer el máster y doctorado juntos y compartir esta experiencia, por las risas que nos echábamos en la caravana volviendo de

Bellaterra y por ayudarme con varios asuntos burocráticos, ya sabes a que me refiero. ¡Muchas gracias! Gracias a ti también Vera, por tu sinceridad y actitud proactiva en la vida, admiro tu tenacidad y tu generosidad. Gracias por todo, te deseo lo mejor. Gracias por acogernos en tu casa incluso cuando nos presentamos un domingo en horas intempestivas. Pame, has sido una de las últimas en llegar, pero te has integrado en el grupo a las mil maravillas. Tu carácter amigable y altruista ha contribuido decididamente a que todos te apreciemos tanto. Muchas gracias, Francisco, por echarme un cable con los *karyoviews*, por tu espíritu alegre y por los buenos ratos que pasamos al mediodía, eres una gran persona pese a que últimamente me ganes siempre con la raqueta. Nuri, mi compi de escritorio, lo siento si el polvo y los papeles que tengo por la mesa te incomodan a veces. Muchas gracias por tus palabras de ánimo cuando me ves decaído. Joao eres una persona tremendamente inteligente e intuitiva. Gracias por tus conversaciones sinceras y estimulantes, así como por todos tus consejos, te aprecio muchísimo. Muchas gracias, Josep, por el ambiente positivo que generas y por arrancarme risas incluso en los peores momentos. Rocío y Paula, muchas gracias por vuestro esfuerzo que tanto apreciamos todos y por nunca tener un no por respuesta, sois unas profesionales como la copa de un pino y, al mismo tiempo, grandes personas. Gracias de verdad. Muchas gracias Eulàlia por todo el trabajo que haces por el grupo de LAL y por tu comprensión en los días en los que no he estado muy acertado. Gracias, Jordi, por tu espíritu investigador insaciable y tu mente tan activa que estimula mi imaginación. Gracias también por haber formado un grupo de personas muy humanas y con mucho potencial (Laura, Jorge, Àngel) que estoy seguro no te defraudarán. Me gustaría dar las gracias a todos los estudiantes que han realizado prácticas en el Instituto, en especial a Laura, Elena, Guillem, Rober y Aleksey. La verdad es que siempre es una experiencia enriquecedora ver el entusiasmo que tenéis, sobretodo cuando hacéis preguntas que no me había planteado nunca. Muchas gracias y continuad insistiendo, la competencia es dura, pero tenéis aptitudes para llegar muy lejos. Gracias también a mis compañeros de los otros grupos del IJC de Can Ruti y de los otros campus del IJC, del IMPPC y del IGTP, con los que es muy fácil conversar y aprender de ellos, gracias por estimular mi creatividad con vuestras investigaciones. Gracias, Yaiza y Mar, por vuestra paciencia y generosidad con los consejos para las PCR de metilación. Ruth, muchas gracias por tus palabras siempre positivas, por tu clarividencia y animarme cada vez que nos vemos, ojalá tuviera tu mente. Gracias, Roberto, por tu trabajo con la *Gene Ontology* y por actualizar mi agenda de eventos musicales periódicamente. También quisiera dar las gracias a todo el personal que nos da soporte administrativo (Juan, Jessi, Montse, Toni, Eva, Yaiza) e informático, vuestro trabajo nos facilita muchísimo el nuestro. Gracias Adri y Jose por hacerme ver que los *pendrives* son

traicioneros y que no hay que depositar tanta fe en ellos. Gracias también por vuestro humor, siempre presente incluso a primera hora de la mañana.

Quisiera agradecer especialmente la labor que llevan a cabo los profesionales de la Fundació Josep Carreras. Vuestro trabajo, además de salvar vidas, sensibiliza la sociedad para promover la investigación y fomenta un espíritu tremendamente positivo. Gracias por vuestra labor divulgativa de cara a la sociedad. Gracias por hacer todo lo posible para que tengamos todas las herramientas necesarias para llevar a cabo una investigación de calidad. Vosotros sois el mejor exponente del lema de la Fundación. Sois imparables, y al mismo tiempo, grandísimas personas.

Otra pieza fundamental en nuestro trabajo es el espíritu colaborativo. En este sentido, quisiera dar las gracias a todos los profesionales de los hospitales que han colaborado y colaboran en nuestros proyectos ya que, sin duda, la colaboración es el pilar del progreso científico. Gracias por compartir, además de buenos momentos, muestras y conocimientos esenciales para la elaboración de esta Tesis, sin vuestra ayuda estos trabajos no se hubiesen podido llevar a cabo. Gracias a la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia y a PETHEMA por la labor que desempeñan en la formación profesional con sus congresos, becas y reuniones científicas.

Finalmente, quisiera agradecer el apoyo recibido por parte de mis amigos, sobretodo mis amigos de infancia, de universidad y de Badalona. Gracias por ser como sois y por liberar mi mente en los momentos más angustiosos con vuestra actitud positiva y constructiva. ¡Os debo muchísimo y espero seguir viviendo aventuras con vosotros siempre!

Los amigos se escogen (y yo he escogido muy bien) pero la familia no. Por suerte, y aunque suene a tópico, tengo la mejor familia que pudiera imaginar. Gracias a mis abuelos Josep Maria, Francina, Josep y Lourdes; a mis tíos Marcel, Àngela, Enric, Elena, Isi y Gregori; a mis primos Xavi, Cesc, Guille, Pepi, Nuria, Anna, Martí y Mariona; a mi familia adoptiva Lita, Paco y Susi, por confiar en mí y hacerme sentir tan querido y valorado. Gracias, Albert, por tus muestras de afecto y comprensión siempre que las he necesitado, por tus visitas sorpresa, por nuestras excursiones, por tantas cosas que hemos compartido en la vida y en definitiva por ser como eres. ¡Eres el mejor! Gracias, mama, por tu apoyo incondicional en todo momento, gracias por aguantar mis nervios y preocupaciones, gracias por los valores que me has inculcado (todos ellos imprescindibles para andar por la vida) y gracias por tu generosidad y espíritu combativo, ¡por favor no cambies nunca, te lo debo todo! Papa, me encanta trabajar contigo y me siento un privilegiado por poder hacerlo. Eres mi modelo a seguir tanto profesional como personalmente. Admiro como la gente te escucha cuando hablas. Siempre consigues sacar lo mejor de mí, tienes

unos principios y una manera de hacer que ojalá abundara más en el ámbito científico y en la sociedad en general. Finalmente, tu, Luz. Muchísimas gracias por tu amor, ayuda y paciencia. Perdona por el poco tiempo que te he dedicado últimamente, así como por mis momentos de nervios y bloqueo mental. Gracias de corazón por tu comprensión y por ser lo mejor que me ha pasado en la vida. Diga lo que diga me voy a quedar muy corto. Además, prefiero decírtelo todos los días en la intimidad. Piensa en todas las palabras y gestos de agradecimiento que te puedas imaginar y conviértelos en un beso y un abrazo que te acompañen siempre. Yo, por si a caso, estaré siempre a tu lado para dártelos.

2. CERTIFICADO DE DIRECCIÓN

La Dra. Lurdes Zamora Plana, Responsable de la sección de Biología Molecular del Servicio de Hematología del Institut Català d'Oncologia-Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universidad Autònoma de Barcelona, Responsable del grupo de Genética y Epigenética de Neoplasias Mieloides en el Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreras,

El Dr. Josep Maria Ribera Santasusana, Profesor Titular de Medicina-Hematología de la Universidad Autònoma de Barcelona, Jefe de Servicio de Hematología del Institut Català d'Oncologia-Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Responsable del grupo de Leucemia Aguda Linfoblástica en el Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreras,

CERTIFICAN

Que Jordi Ribera Salas ha realizado, bajo su dirección, el trabajo **Implicación de las alteraciones en el número de copias en el pronóstico y progresión de la leucemia aguda linfoblástica de línea B del adulto** para obtener el título de Doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona en el programa de Medicina Oncología y enfermedades hematológicas.

Este trabajo ha sido realizado en el Laboratorio del Servicio de Hematología del Institut Català d'Oncologia-Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona y en el campus ICO-Germans Trias i Pujol del Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreras.

Y para que conste a efectos oportunos,

Dra. Lurdes Zamora Plana

Prof. Josep M^a Ribera Santasusana

3. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADN: ácido desoxirribonucleico
AIEOP: *Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica*
Ara-C: arabinósido de citosina
AYA: adolescentes y adultos jóvenes
BCR: *B cell receptor*
BCR-ABL1: *breakpoint cluster region – abelson tyrosine-protein kinase 1*
BFM: *Berlin Frankfurt Münster*
BLNK: *B-cell Linker*
BTK: tirosina cinasa de Bruton
BTG1: *B-cell translocation gene 1*
BTLA: *B and T lymphocyte associated*
CAR: *chimeric antigen receptor*
CARTs: *chimeric antigen receptor-modified Tcells*
ChAS: *chromosome analysis suite*
CD: *cluster of differentiation*
CDKN: *cyclin dependent kinase inhibitor*
CIR: incidencia acumulada de recaída
CGH: *comparative genomic hybridization*
CLP: *common lymphoid progenitors*
CNA: *copy number alteration* o alteración en el número de copias
CN-LOH: *copy neutral-loss of heterozigosity*
COALL: *German Cooperative Group for Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia in Childhood*
COG: *Children's Oncology Group*
CREBBP: *cAMP-response element binding protein (CREB)- Binding Protein*
CRLF2: *cytokine receptor-like factor 2*
DCOG: *Dutch Childhood Oncology Group.*
DQ: *dosage quotient*
ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*
EBF1: *early B-cell factor 1*
EGIL: *European Group of Immunological Classification of Leukemias*
ERG: *ets-related gene*
ERM: enfermedad residual mínima
ETP: *early-T cell precursor* o precursor inmaduro de células T
ETV6: *ETS variant 6*
EWALL: *European Working Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia*
FAB: *French American British*
FISH: *fluorescence in situ hybridization* o hibridación *in situ* fluorescente
FLAG-IDA: fludarabina, Ara-C, G-CSF e idarubicina
FLT3: *Fms-like tyrosine kinase 3*
GEP: *gene expression profiling*
GIMEMA: *Gruppo Italiano Malattie EMatologiche dell'Adulto*

GMALL: *German Multicenter Adult Acute Lymphoblastic Leukaemia*
GRAALL: *French-Swiss-Belgian Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia*
G-CSF: *granulocyte colony stimulating factor*
GWAS: *genome wide association study*
HCVAD: *hyperfractionated cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, dexamethasone*
HDAC: histona deacetilasa
HLA: *human leukocyte antigen*
HSC: *hematopoietic stem cell* o célula madre hematopoyética
iAMP21: *intrachromosomal amplification 21*
Ig: inmunoglobulina
IGL: inmunoglobulina *lambda*
IgM: inmunoglobulina *Mu*
IKZF: *ikaros kruppel zinc finger*
IL7R: receptor de la interleucina 7
iT-LBP: *indolent T-lymphoblastic proliferation*
JAK: *janus kinase*
KDM6A: *lysine demethylase 6A*
KRAS: *kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog*
LAIP: inmunofenotipo asociado a leucemia
LAL: leucemia aguda linfoblástica
LAL3: leucemia de Burkitt
LAL-B: leucemia aguda linfoblástica de precursores B
LAL Ph+: leucemia aguda linfoblástica con cromosoma *Philadelphia*
LAL Ph *like*: leucemia aguda linfoblástica *Philadelphia like*
LAL-T: leucemia aguda linfoblástica de precursores T
LAM: leucemia aguda mieloblástica
LCR: líquido cefaloraquídeo
LDH: lactato deshidrogenasa
LEF1: *lymphoid enhancer binding factor 1*
LIC: *leukemia initiating cell* o célula iniciadora de leucemia
LSC: *leukemia stem cell* o célula progenitora leucémica
LMC: leucemia mieloide crónica
LMPP: *lymphoid-primed multipotent progenitors*
MHC: *major histocompatibility complex*
MLL: *mixed-lineage leukemia*
MLPA: *multiplex ligation-dependent probe amplification*
MMR: *mismatch repair*
MO: médula ósea
MPAL: *mixed phenotype acute leukemia* o leucemias de fenotipo mixto
MPO: mieloperoxidasa
MPP: *multipotent progenitors*

MRD: *minimal residual disease* o enfermedad mínima residual
MSH6: *mutS homolog 6*
NCI: *National Cancer Institute*
NGS: *next generation sequencing*
NuRD: *nucleosome remodeling deacetylase*
NR3C1: *nuclear receptor subfamily 3 group C member 1*
NRAS: *neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*
NT5C2: *5'-nucleotidase, cytosolic II*
OMS: Organización Mundial de la Salud
PAX5: *paired box 5*
PCR: *polymerase chain reaction* o reacción en cadena de polimerasa
PETHEMA: Programa Español de Tratamientos en Hematología
Ph: cromosoma *Philadelphia*
POMP: *6-mercaptopurine (Purinethol), vincristine (Oncovin), methotrexate, prednisone*
PRPS1: *phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1*
PTPN11: *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11*
RAG1/2: *recombination activating 1/2*
RB1: *retinoblastoma transcriptional corepressor 1*
RC: remisión completa
RNAseq: *ribonucleic acid sequencing*
RT-PCR: *reverse transcriptase polymerase chain reaction*
SEHOP: Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica
SETD2: *SET domain containing 2*
SG: supervivencia global
SLE: supervivencia libre de evento
SNC: sistema nervioso central
SNP: *single nucleotide polymorphism*
SNV: *single nucleotide variant*
TCR: *T-cell receptor* o receptor de células T
TKI: *tyrosin kinase inhibitor* o inhibidor de tirosincinasas
TP53: *tumor protein 53*
TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos
TSLP: *thymic stromal Lymphopoietin*
UKALL: *United Kingdom Acute Lymphoblastic Leukemia Group*
VPREB1: *Pre-B Lymphocyte 1*
WHO: *World Health Organization*
WT: *wild type*

4. SUMARIO

1.	AGRADECIMIENTOS	VII
2.	CERTIFICADO DE DIRECCIÓN	XVII
3.	ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	XXI
4.	SUMARIO	XXVII
5.	RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS	XXXIII
5.1.	Tablas	XXXV
5.2.	Figuras	XXXV
6.	INTRODUCCIÓN	39
6.1.	Hematopoyesis	41
6.2.	Leucemia aguda linfoblástica (LAL)	43
6.2.1.	Concepto	43
6.2.2.	Epidemiología y pronóstico	44
6.2.3.	Etiología	46
6.3.	Clasificación de la LAL	49
6.3.1.	Clasificación morfológica	51
6.3.2.	Clasificación inmunofenotípica	52
6.3.3.	Clasificación citogenética	53
6.3.3.1.	Subtipos citogenéticos de LAL-B descritos en la clasificación de la OMS	55
6.3.3.2.	Subtipos citogenéticos relevantes no recogidos en la clasificación de la OMS	62
6.3.4.	Alteraciones secundarias	72
6.3.4.1.	Genes de diferenciación linfoide	74
6.3.4.2.	Factores de transcripción hematopoyéticos	80
6.3.4.3.	Genes que regulan el ciclo celular	81
6.3.4.4.	Genes proapoptóticos	83
6.3.4.5.	Genes de la vía JAK/STAT	84
6.3.4.6.	Genes de la vía RAS/RTK	86
6.3.4.7.	Genes con función epigenética	88
6.3.4.8.	Genes de metabolismo/resistencia a fármacos	90
6.3.4.9.	Genes de reparación del ADN	91

6.4.	Cuadro clínico de la LAL	92
6.5.	Diagnóstico integrado de la LAL	93
6.6.	Pronóstico	94
6.6.1.	Factores pronósticos del propio paciente	95
6.6.2.	Factores pronóstico de la enfermedad	96
6.6.3.	Factores pronósticos de respuesta al tratamiento	97
6.7.	Tratamiento	99
6.7.1.	Pre-fase	100
6.7.2.	Inducción a la remisión:	101
6.7.3.	Consolidación o Intensificación	101
6.7.4.	Mantenimiento	102
6.7.5.	Profilaxis de la leucemia en el sistema nervioso central (SNC)	102
6.7.6.	Duración del tratamiento y resultados	103
6.7.7.	Tratamiento de la LAL en recaída	103
6.7.8.	Trasplante de progenitores hematopoyéticos	104
6.7.9.	Subtipos de LAL con aproximaciones terapéuticas específicas	105
6.7.10.	Efectos secundarios, secuelas y segundas neoplasias	107
6.7.11.	Nuevos tratamientos	107
6.7.11.1.	Inmunoterapia basada en anticuerpos	108
6.7.11.2.	Inhibidores moleculares	116
6.8.	Recaídas y evolución clonal	116
7.	HIPÓTESIS	121
8.	OBJETIVOS	125
9.	MATERIAL Y MÉTODOS	129
10.	RESULTADOS	143
10.1.	Artículo titulado: "Prognostic Significance of Copy Number Alterations in Adolescent and Adult Patients With Precursor B Acute Lymphoblastic Leukemia Enrolled in PTHEMA Protocols"	145
10.2.	Artículo titulado: "Alteraciones en el número de copias en pacientes adultos con leucemia linfoblástica aguda B madura, tratados con inmuoquimioterapia específica"	151
10.3.	Artículo titulado: "Copy number profiling of adult relapsed B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia reveals potential leukemia progression mechanisms"--	155
11.	DISCUSIÓN	159

12.	CONCLUSIONES -----	175
13.	BIBLIOGRAFÍA -----	181

5. RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS

5.1. Tablas

Tabla 1. Principales características de las dos teorías sobre la relación entre infecciones y leucemia aguda linfoblástica. -----	48
Tabla 2. Principales pruebas para el diagnóstico de la LAL propuestas por el grupo EWALL. -----	94
Tabla 3. Definiciones de respuesta al tratamiento en función del valor de la ERM. Recomendaciones de las guías ESMO. -----	98

5.2. Figuras

Figura 1. Propiedades de las HSC. -----	41
Figura 2. Maduración de las HSC.-----	42
Figura 3. Factores de transcripción involucrados en la maduración de los linfocitos B a partir de los <i>lymphoid-primed multipotent progenitors</i> (LMPP).-----	43
Figura 4. Distribución de la LAL por edad (A) y género (B). -----	44
Figura 5. Variación de la incidencia y la mortalidad de la leucemia aguda linfoblástica a lo largo del tiempo.-----	45
Figura 6. Evolución de la probabilidad de supervivencia de la LAL infantil.-----	45
Figura 7. Hipótesis que relacionan la leucemia aguda linfoblástica con la exposición a infecciones. -----	48
Figura 8. Tipos de LAL según la clasificación FAB. -----	52
Figura 9. Frecuencia de las principales alteraciones genéticas en la LAL y su relación con la edad.54	
Figura 10. Impacto en la supervivencia de las principales alteraciones genéticas en la LAL infantil. -----	55
Figura 11. Principales vías por las que el reordenamiento BCR-ABL ejerce su actividad oncogénica. -----	56
Figura 12. <i>Partners</i> más frecuentes del reordenamiento MLL en relación con la edad y el tipo de leucemia aguda. -----	58
Figura 13. Cariotipo hiperdiploide identificado en el Laboratorio de Citogenética del Servicio de Hematología del ICO-Hospital Germans Trias i Pujol. Nótese las trisomías en los cromosomas 6, 10, 14, 18 y X, así como tetrasomía del cromosoma 21.-----	59
Figura 14. Cariotipo de un paciente con baja hipodiploidía identificado en el Laboratorio de Citogenética del Servicio de Hematología del ICO-Hospital Germans Trias i Pujol. Nótese las monosomías de los cromosomas 3, 7, 15, 16 y 17. -----	60

Figura 15. Mejoría del pronóstico de la t(1;19)(q23;p13.3) con la intensificación del tratamiento.	62
Figura 16. Utilidad de los SNP arrays en la detección y clasificación de las LAL hipodiploides.	63
Figura 17. Determinación de FISH con múltiples copias del gen RUNX1 (en rojo) del Laboratorio de Citogenética del Servicio de Hematología del ICO-Hospital Germans Trias i Pujol.	64
Figura 18. Mejoría del pronóstico de la iAMP21 con la intensificación del tratamiento.	64
Figura 19. <i>Partners</i> de fusión de PAX5.	67
Figura 20. Incidencia, relación con la edad y pronóstico de los reordenamientos DUX4, ZNF384 y MEF2D.	68
Figura 21. Mecanismos de leucemogénesis mediados por los reordenamientos DUX4 en modelos animales.	69
Figura 22. Reordenamientos en la LAL Ph-like en relación con la edad.	71
Figura 23. Principales vías de señalización en la LAL Ph-like.	72
Figura 24. Diferencias en la frecuencia de CNA en relación con la edad.	73
Figura 25. Comparación de la frecuencia de CNA en diferentes vías metabólicas en función de la edad.	73
Figura 26. Efecto del gen Ikaros en la diferenciación linfoide.	74
Figura 27. Estructura del gen Ikaros.	75
Figura 28. Inhibición de la vía FAK en pacientes con delección de Ikaros.	76
Figura 29. Relación del gen BLNK con la vía JAK-STAT.	79
Figura 30. Actividad de los genes CDKN2A, 2B y RB1 en la inhibición de la proliferación celular.	82
Figura 31. Regulación negativa del ciclo celular por parte de CDKN1B (p27 ^{KIP1}).	83
Figura 32. Mecanismo por el cual el gen CRLF2 promueve la proliferación y supervivencia de los linfocitos B.	84
Figura 33. Asociación de CREBBP con proteínas activadoras de la transcripción (parte superior) y factores de transcripción e histona acetiltransferasas (parte inferior).	88
Figura 34. Consecuencias de la inactivación de SETD2 y su contribución en la leucemogénesis.	89
Figura 35. Mecanismo de reparación del DNA por parte de MSH6.	92
Figura 36. Supervivencia global en función de la edad en pacientes con LAL.	96
Figura 37. Principales protocolos de tratamiento de la LAL de novo del grupo PETHEMA.	100

Figura 38. Expresión de antígenos en el desarrollo linfoide B.	108
Figura 39. Mecanismos de acción del anticuerpo monoclonal anti CD20 rituximab.	108
Figura 40. Estructura y mecanismo de acción de los anticuerpos monoclonales biespecíficos. --	110
Figura 41. Mecanismo de acción de inotuzumab ozogamicina.	112
Figura 42 A y B. Supervivencia global de blinatumomab (panel A) e inotuzumab (panel B) en comparación con la quimioterapia de rescate en la LAL del adulto resistente o en recaída.	113
Figura 43. Producción y administración de las CAR T cells.	114
Figura 44. Generaciones de CAR T cells.	115
Figura 45. Modelo lineal de progresión del cáncer.	117
Figura 46 Modelo ramificado de la progresión del cáncer que se asemeja al modelo de evolución de las especies propuesto por Charles Darwin.	118
Figura 47. Protocolos asistenciales del grupo PETHEMA en los que se incluyeron los pacientes (A) y clasificación de los pacientes según su riesgo (B).	131
Figura 48. Estructura de las sondas de MLPA.	133
Figura 49. Imagen obtenida del secuenciador del laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Hematología del ICO-Hospital Germans Trias i Pujol. Cada pico representa la cantidad de sonda de cada región estudiada.	133
Figura 50. Valores que determinan la presencia de CNA.	134
Figura 51. Imagen obtenida en el laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Hematología del ICO-HGTiP que muestra los valores normalizados de una paciente con delección homocigota de CDKN2A/B y duplicaciones de los genes en X/YPAR1 y EBF1.	134
Figura 52. Principales procedimientos de la técnica de SNP arrays (Thermofisher).	137
Figura 53. Visualización de las ganancias (azul) y pérdidas (rojo) de un paciente de LAL-B de nuestra serie mediante el programa ChAS.	137
Figura 54. Presencia de una delección del brazo 17p (TP53) y una duplicación de casi todo el brazo 17q en un paciente de LAL-B de nuestra serie refractario a 3 líneas de tratamiento y 2 TPH. Nótese como aumenta la cantidad de células con delección de 17p de la 1a a la 2a recaída, siendo un cromosoma normal (dotación diploide) al diagnóstico.	138
Figura 55. Delección intersticial en X/Y PAR1 que genera el gen de fusión P2RY8-CRLF2 detectada en una paciente de nuestra serierefractaria a 3 líneas de tratamiento y 2 TPH.	138

6. INTRODUCCIÓN

6.1. Hematopoyesis

La hematopoyesis es el proceso de producción de las células sanguíneas. En los organismos vertebrados, la hematopoyesis se inicia durante el desarrollo embrionario, ya que es imprescindible para la viabilidad del embrión. Se cree que existen dos ondas de hematopoyesis durante el desarrollo embrionario: la primitiva y la definitiva. La hematopoyesis primitiva se da durante las primeras fases del desarrollo embrionario en el saco vitelino y se basa en la producción de eritrocitos y macrófagos, lo que permite aportar oxígeno al embrión para su correcto desarrollo. La hematopoyesis definitiva se inicia en la aorta embrionaria, donde aparecen los hemangioblastos, un precursor común de las células endoteliales y las células hematopoyéticas. Los hemangioblastos dan lugar a las primeras células madre hematopoyéticas o *hematopoietic stem cells* (HSC). Posteriormente las HSC migran primero al hígado y bazo fetales y más tarde se dirigen a sus nichos definitivos, la médula ósea y el timo.

Todavía se desconocen muchos aspectos que gobiernan e influyen en la hematopoyesis. Sin embargo, existe un amplio consenso en que la hematopoyesis es un proceso jerarquizado en el que sólo las HSC son capaces de replicarse indefinidamente (*long term progenitors*) y, al mismo tiempo, dar lugar a células diferenciadas de todos los linajes hematopoyéticos (Figura 1).

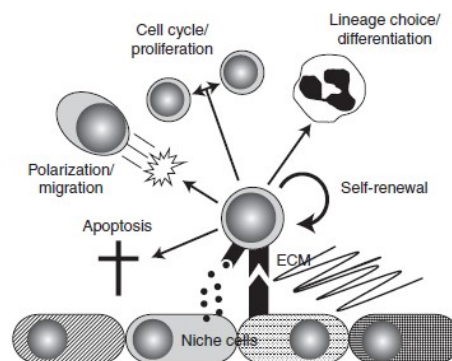


Figura 1. Propiedades de las HSC (1).

A partir de las células madre se originan los *multipotent progenitors* (MPP), los cuales reprimen gradualmente las rutas metabólicas características de célula *stem* (p.ej. Notch, Wnt o RUNX1) aunque conservan todavía el potencial para dar lugar a los diferentes linajes hematopoyéticos (*short term progenitors*). La sucesiva maduración de estos progenitores hacia el linaje mieloide o linfoide se produce gracias a la expresión de factores de transcripción específicos de cada linaje (Figura 2). Éstos promueven la expresión de genes necesarios para establecer un linaje

hematopoyético determinado, al mismo tiempo que inhiben la expresión de factores de transcripción de otros linajes hematopoyéticos.

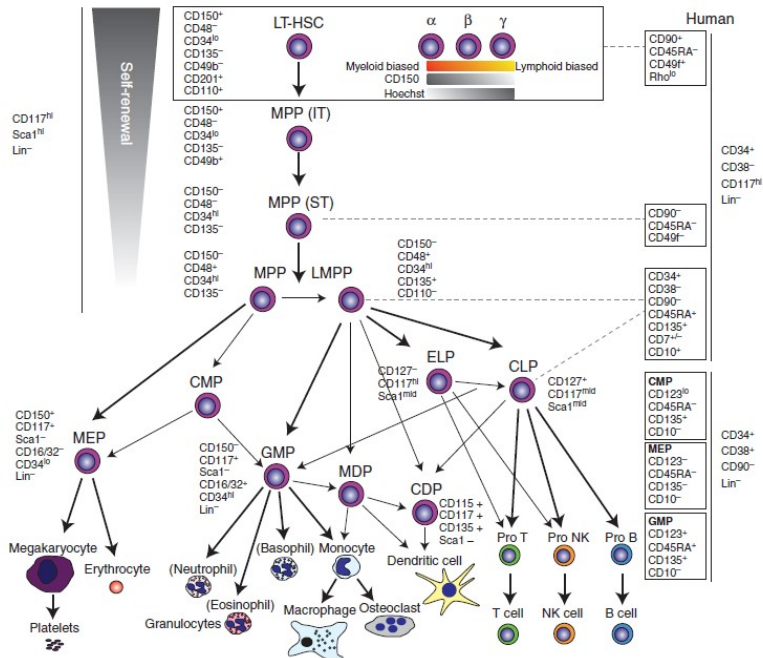


Figura 2. Maduración de las HSC (1).

Un ejemplo lo encontramos en la maduración de los linfocitos B a partir de los *lymphoid-primed multipotent progenitors* (LMPP) (Figura 3). Los factores PU.1 y E2F son esenciales para iniciar la diferenciación hacia linfocito a partir de los LMPP. Éstos promueven la expresión de EBF1 (*Early B-cell Factor 1*) y PAX5 (*Paired Box 5*), dos genes esenciales para la producción de células B. A su vez, la expresión de EBF1 también está inducida por Ikaros (IKZF1, *Ikaros Kruppel Zinc Finger 1*) y por el receptor de la interleucina 7 (IL7R). EBF1 reprime la expresión de genes del linaje mieloide (PU.1, CEBA e ID2) al mismo tiempo que induce, junto con E2F, la expresión de PAX5. Para mantener la identidad de célula B, IKZF1 y PAX5 forman un circuito de retroalimentación (*feedback loop*) para conservar la expresión de EBF1. De este modo se promueve la expresión de genes característicos de linfocito B mientras que, al mismo tiempo, estos genes reprimen la expresión de genes mieloides. La desregulación de estos factores de transcripción comporta un bloqueo prematuro de la diferenciación y un aumento del potencial multilínea, es decir, a una mayor capacidad de desdiferenciarse a MPP o LMPP. En este sentido, la presencia de deleciones de genes clave para la diferenciación linfocítica B como IKZF1, EBF1 y/o PAX5 se ha descrito ampliamente en pacientes con leucemia aguda linfoblástica de precursores B (1,2).

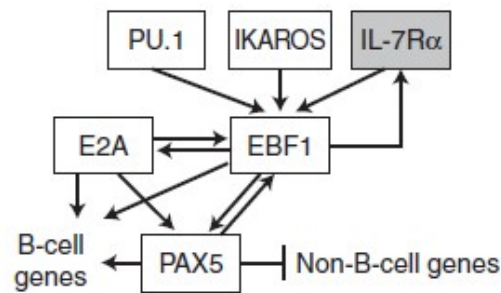


Figura 3. Factores de transcripción involucrados en la maduración de los linfocitos B a partir de los *lymphoid-primed multipotent progenitors* (LMPP) (1).

Normalmente las leucemias agudas tienen un curso más agresivo que las leucemias crónicas y linfomas. Este hecho está relacionado con las características intrínsecas de la célula de origen del proceso tumoral, así como del perfil de alteraciones genéticas de ésta. Conocer en profundidad la hematopoyesis sana es imprescindible para entender los diferentes mecanismos implicados en la leucemogénesis. Además, las características de cada célula hematopoyética durante su proceso de maduración sano ofrecen una información valiosa acerca de su *alter ego* leucémico. Esto permite extrapolar los datos para conocer las dependencias y vulnerabilidades de las células de origen de cada leucemia y diseñar nuevas aproximaciones terapéuticas para los pacientes.

6.2. Leucemia aguda linfoblástica (LAL)

6.2.1. Concepto

La LAL es una neoplasia hematológica clonal que se caracteriza por un bloqueo en la maduración de los linfocitos inmaduros o linfoblastos, que puede suceder en diferentes estadios de la hematopoyesis del linaje linfoide. Existen 2 subtipos principales de LAL en función del progenitor linfoide afectado, la LAL de precursores B (LAL-B, 75% de las LAL) y la LAL de precursores T (LAL-T, 25% de las LAL). Junto con este bloqueo prematuro de la diferenciación, se da una proliferación aberrante de estos precursores que hace que estas células tumorales o blastos se acumulen en la medula ósea, sangre periférica y otros órganos con capacidad hematopoyética (p.ej. hígado, bazo o ganglios linfáticos) y desplacen la hematopoyesis sana. Todo ello conduce a una insuficiencia medular, que es la manifestación clínica más destacada de las leucemias agudas.

6.2.2. Epidemiología y pronóstico

La incidencia global de la LAL es de 1.7 casos/100000 habitantes por año. La mediana de edad de presentación es de 15 años, aunque la incidencia de esta neoplasia es muy variable en función de la edad. Es el cáncer más frecuente en la edad pediátrica, donde representa una tercera parte de los cánceres infantiles, mientras que su incidencia en la población adulta es baja y se considera una enfermedad rara (Figura 4). Predomina en pacientes de género masculino y presenta una distribución desigual entre las diferentes etnias (3).

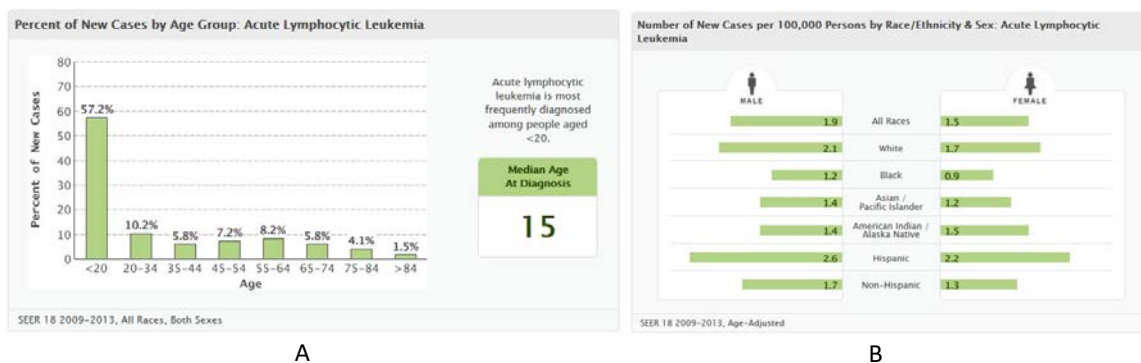


Figura 4. Distribución de la LAL por edad (A) y género (B) (3).

El pronóstico de esta enfermedad es también muy variable en función de la edad del paciente. Mientras que en los niños se obtienen porcentajes de curación del 80%-90%, tan solo en un 40% de adultos se consiguen supervivencias prolongadas libres de enfermedad (4,5). Actualmente el 15%-30% de los niños y más de la mitad de los adultos sufren una recaída de la enfermedad. La mitad o más de los pacientes pediátricos responden favorablemente a las terapias de rescate (6-9). Sin embargo el porcentaje de curación en adultos en recaída es tan solo del 10% (10-17).

La incidencia global de esta leucemia muestra una tendencia temporal ligeramente al alza, pero afortunadamente la tasa de mortalidad presenta una tendencia inversa (Figura 5). El avance de la medicina en cuanto al diagnóstico y tratamiento de la enfermedad está detrás de estas tendencias.

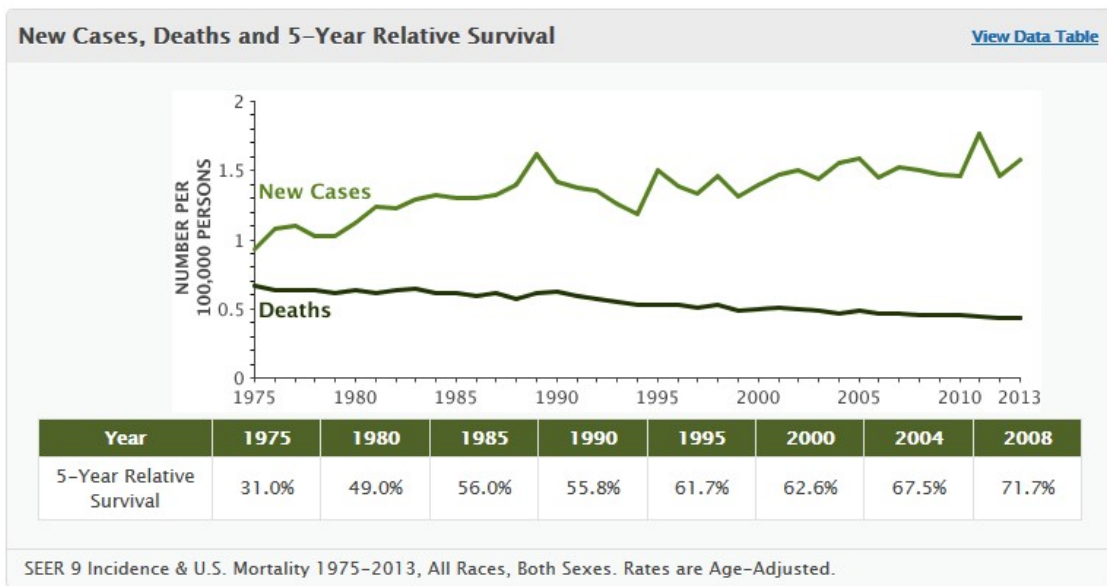


Figura 5. Variación de la incidencia y la mortalidad de la leucemia aguda linfoblástica a lo largo del tiempo (3).

Esta mejora significativa en la tasa de supervivencia se fundamenta principalmente en los progresos en el tratamiento de la LAL pediátrica (Figura 6). En la población adulta, pese a que los datos de epidemiología son más escasos, también ha habido una mejora significativa en la supervivencia, aunque de manera más discreta.

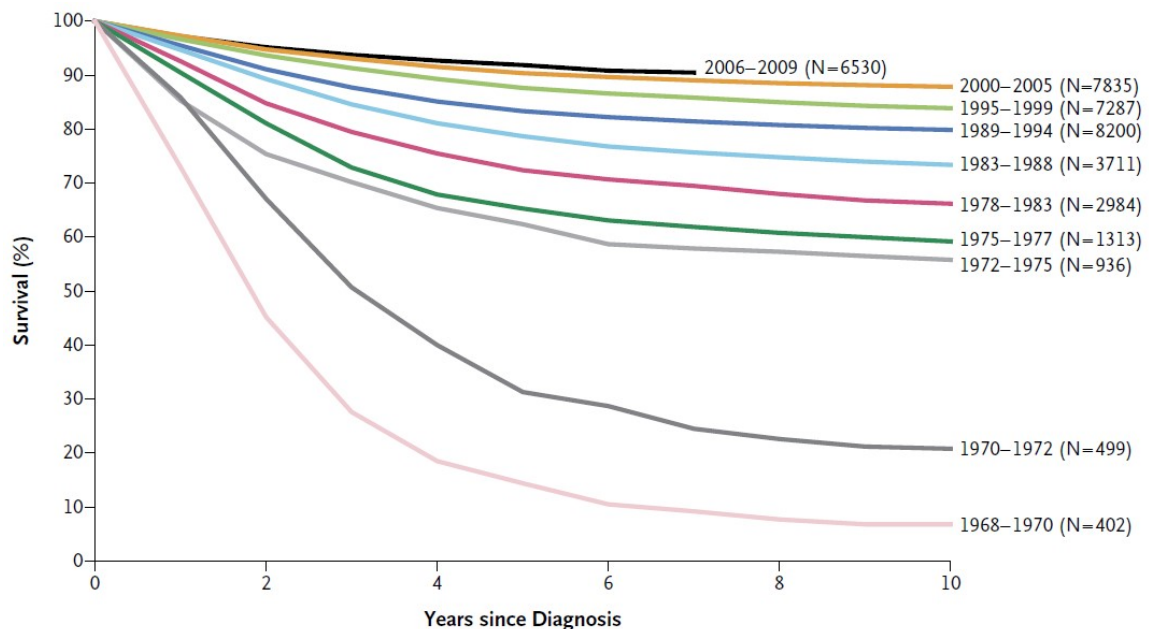


Figura 6. Evolución de la probabilidad de supervivencia de la LAL infantil (18).

6.2.3. Etiología

Los eventos que inducen al desarrollo de la LAL son todavía desconocidos hoy en día. Tan sólo una pequeña parte de los casos (5% aproximadamente) están asociados a síndromes hereditarios que predisponen a la leucemogénesis como el Síndrome de Down, el Síndrome de Bloom, el Síndrome de Li Fraumeni, el síndrome de Klinefelter, el Síndrome de Nijmegen o el Síndrome de Louis-Bar (ataxia-telangiectasia) entre otros; o a la exposición a radiaciones ionizantes o a determinados agentes quimioterápicos. Por tanto, aunque sólo representen un pequeño porcentaje de todos los casos de LAL, se intuye que factores genéticos intrínsecos del propio individuo y factores externos o ambientales juegan un papel importante en la leucemogénesis (18,19).

Varios estudios (GWAS, *Genome Wide Association Study*) han analizado la presencia de variantes génicas de riesgo que se asocian a un aumento de la probabilidad de desarrollar una LAL. Estos trabajos han conseguido identificar *single nucleotid polymorphisms* (SNP) en algunos genes implicados en la patogenia de la LAL como CDKN2A, IKZF1, PAX5, ETV6, GATA3, ARID5B o CEBPE que aumentan el riesgo de padecer esta enfermedad (20–25). Estos polimorfismos pueden comportar la infraexpresión de los genes o incluso alterar la distribución espacial de las proteínas e impedir sus funciones. Estas variantes no deben confundirse con otras variantes genéticas heredadas que juegan un papel importante en la respuesta al tratamiento (ej. polimorfismos de genes que metabolizan fármacos). Sin embargo, algunas variantes de GATA3 se han asociado a una mayor probabilidad de sufrir una LAL y, al mismo tiempo, a la respuesta al tratamiento y a la probabilidad de recaída (20). De estos estudios se concluye que el riesgo de desarrollar una LAL viene dado, en parte, por la herencia de varios de estos polimorfismos. Por tanto, existe evidencia científica de que el genoma de cada individuo juega un papel importante en la predisposición a desarrollar una leucemia, pero también en la respuesta al tratamiento y en la evolución de la enfermedad.

Por otra parte, se conoce que ciertos agentes físicos y químicos tienen potencial leucemogénico (p.ej. radiaciones ionizantes y no ionizantes, pesticidas, etc.) (26). Sin embargo, teniendo en cuenta que el pico de mayor incidencia de LAL es entre los 2 y 5 años, las hipótesis que relacionan las LAL con la exposición a infecciones víricas o bacterianas en la edad infantil son las que tienen más aceptación en la comunidad internacional. Las hipótesis más reconocidas en este campo son la de Kinlen y la de Greaves (27,28) (Figura 7 y Tabla 1). Ambas hipótesis defienden que la aparición de una LAL viene dada por una respuesta inmune anormal/patológica a infecciones víricas o bacterianas tardías (p.ej. influenza virus). Estas hipótesis vienen respaldadas por la

evidencia de que alrededor del 15% de los cánceres tienen su origen en infecciones virales (p.ej. virus del papiloma humano en cáncer de cuello de útero, virus HTLV1 en leucemia-linfoma T del adulto, virus Epstein-Barr en linfomas) (27). Concretamente, la hipótesis de Kinlen sostiene que el flujo de poblaciones portadoras de virus hacia regiones con una población pediátrica poco expuesta a estas infecciones promueve la aparición de leucemias infantiles (27). La hipótesis de Greaves argumenta que la sociedad ha tendido a sobreproteger a los niños de agentes infecciosos y facilita que éstos vivan en ambientes lo más asépticos posible. Este hecho hace que los niños que no han sido expuestos a estos agentes respondan aberrante o patológicamente ante una infección. Los niños criados en estos ambientes y portadores de lesiones pre-leucémicas de origen intrauterino (translocaciones de MLL, t(12;21) o hiperdiploidía) tendrían una mayor probabilidad de desarrollar una leucemia cuando se exponen a estas infecciones tardías. La excesiva proliferación linfocitaria debida a la respuesta inmune podría aumentar las probabilidades de sufrir el segundo evento leucemogénico necesario para el desarrollo de la leucemia. Varios estudios del grupo de Greaves han evidenciado la presencia de alteraciones cromosómicas presentes ya en el momento del nacimiento en niños que posteriormente han sufrido una LAL. Estudios realizados en gemelos univitelinos han demostrado que ambos gemelos nacen con este primer evento leucemogénico o evento preleucémico. Sin embargo, solo el gemelo que padece leucemia es portador de otras alteraciones genéticas de origen post-natal que están ausentes en el hermano sano (29–31). Un elegante trabajo realizado con modelos animales proporciona pruebas a favor de la teoría de la infección tardía de Greaves (32). En este estudio se evaluó la capacidad de diferentes agentes infecciosos de generar leucemias en ratones con una variante patogénica de PAX5 que implica la infraexpresión del gen. Dichos ratones nacieron y se criaron en ambiente estéril junto con otros ratones *wild type* (WT). Tras 2 años de observación en ambiente aséptico ningún ratón mostró síntomas de leucemia. Sin embargo, cuando estos ratones (PAX5+/- y WT) fueron expuestos a diferentes virus murinos, sólo aquellos con la variante patogénica de PAX5 desarrollaron leucemia. El análisis genético de estos ratones con leucemia demostró la presencia de mutaciones del gen JAK3, un gen recurrentemente mutado en LAL-T. Los autores sostienen que las mutaciones inactivadoras de PAX5 constituyen el primer evento leucemogénico. La exposición a virus murinos propició la proliferación y selección de clones con la mutación de JAK3 (segundo evento leucemogénico). Estas mutaciones de JAK3 indujeron leucemias con un fenotipo, genotipo y manifestaciones clínicas muy similares a las observadas en las leucemias humanas con mutaciones de PAX5 en la línea germinal.

Aún se desconocen muchos aspectos sobre la etiología de esta neoplasia. La teoría de Greaves podría ser aplicable en algunos casos de LAL, sobre todo los casos de LAL pediátrica. Sin embargo, la etiología de la LAL del adulto es más desconocida. Se han identificado mutaciones preleucémicas en individuos sanos de edad avanzada y se ha descrito que estos individuos tienen un riesgo significativamente mayor de padecer una leucemia. Algunos estudios han evidenciado la presencia de mutaciones de TET2, ASXL1 o DNMT3A en pacientes sanos que meses después desarrollaron una leucemia aguda mieloide (LAM) (33–35). Sin embargo, el origen de estas mutaciones no parece estar relacionado con infecciones víricas como en las LAL pediátricas y continúa siendo un enigma.

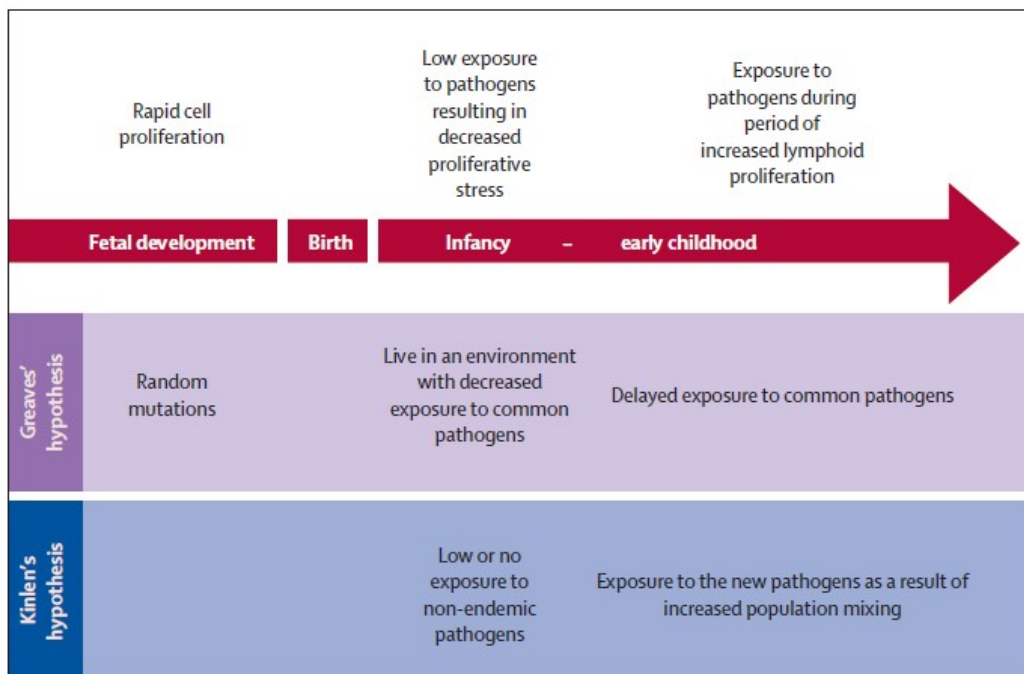


Figura 7. Hipótesis que relacionan la leucemia aguda linfoblástica con la exposición a infecciones (36).

	Hypothesis	Key notions	Timing	Agent	Evidence
Kinlen population mixing hypothesis ^{33,35}	Unusual demographic mixing of susceptible and infected individuals	Herd immunity ²⁰ Animal leukaemia precedents ²¹	Possibly perinatal	Possibly a single novel virus	Transiently increased incidence (roughly double) in several situations of population mixing or clusters ²³
Greaves delayed infection hypothesis ^{33,22}	Delayed exposure to common infections in childhood because of underexposure as infants	Mismatch between evolutionary programming of immune system and modern (hygienic) lifestyle ¹⁹ Two-step prenatal and postnatal natural history ²⁰	Late promotional or triggering event ²⁰	One or (more probably) several common infections (bacterial or viral)	Reduced risk associated with day-care attendance in infancy ^{23,24}

Tabla 1. Principales características de las dos teorías sobre la relación entre infecciones y leucemia aguda linfoblástica (19).

La LAL, al igual que el resto de leucemias, se origina por alteraciones a nivel genético pero su evolución también está gobernada por la desregulación de la expresión génica debida a procesos

epigenéticos (metilación, modificaciones del código de las histonas, RNA no codificantes, complejos *Polycomb*, entre otros) y las interacciones con células del microambiente medular. Sin embargo, la desregulación epigenética, así como las interacciones de las células leucémicas con las células del estroma medular ofrecen nuevas aproximaciones terapéuticas para los pacientes con leucemia (37–39).

6.3. Clasificación de la LAL

La Organización Mundial de la Salud (OMS) realiza periódicamente una guía para el diagnóstico y clasificación de las neoplasias hematológicas. Esta guía integra información sobre la epidemiología, etiología, presentación clínica, morfología e inmunohistoquímica, inmunofenotipo, genética y factores pronósticos de las diferentes hemopatías malignas. La LAL se encuentra en el capítulo de neoplasias de precursores linfoides. Recientemente se ha publicado la versión de 2016 que incluye nuevas entidades provisionales de LAL a las ya descritas en 2008.

Clasificación de las neoplasias de precursores linfoides de la OMS:

- Leucemia/Linfoma linfoblástico B sin especificar
- Leucemia/Linfoma linfoblástico B con alteraciones genéticas recurrentes.
 - a) Leucemia/Linfoma con t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1.
 - b) Leucemia/Linfoma con t(v;11q23); reordenamiento de MLL.
 - c) Leucemia/Linfoma con t(12;21)(p13;q22); TEL-AML1 (ETV6-RUNX1).
 - d) Leucemia/Linfoma con hiperdiploidía.
 - e) Leucemia/Linfoma con hipodiploidía (LAL hipodiploide).
 - f) Leucemia/Linfoma con t(5;14)(q31;q32); IL3-IGH.
 - h) Leucemia/Linfoma con t(1;19)(q23;p13.3); E2A-PBX1 (TCF3-PBX1).
- Leucemia/Linfoma linfoblástico T.

Por consenso, el término linfoma aplica cuando el proceso proliferativo se presenta en forma de masa localizada y no afecta (o afecta mínimamente) la médula ósea y la sangre periférica. Cuando

existe una infiltración de más de un 20% de células tumorales en médula ósea se usa el término leucemia. La nueva revisión de la OMS incluye nuevos subtipos de LAL, que por el momento tienen carácter provisional. En la categoría de LAL-B con alteraciones genéticas recurrentes se incluyen el subtipo LAL-B con *iAMP21* y el subtipo LAL-B con translocaciones que afectan a tirosincinasas o receptores de citocinas (o subtipo BCR-ABL1 *like*). Ambos subtipos se comentarán en la sección de alteraciones cromosómicas. Respecto a la LAL-T, se incluye la nueva entidad *early T-ALL* o ETP ALL (Early T-cell precursor Acute Lymphoblastic Leukemia)(40). Esta entidad se caracteriza por originarse en células muy inmaduras, con expresión de antígenos T, mieloides y de HSC. Genéticamente se caracteriza por la sobreexpresión de genes HOXA, presencia de mutaciones de genes recurrentemente mutados en neoplasias mieloides (FLT3, DNMT3A, IDH1/2, entre otros) y por la ausencia de mutaciones de NOTCH1 o CDKN1/2. Su pronóstico es muy desfavorable (41–43), aunque el grupo británico de LAL UKALL sostiene que con el empleo de protocolos más modernos, estos pacientes podrían considerarse de riesgo intermedio (44).

Finalmente, hay dos consideraciones que los autores hacen constar en la nueva clasificación. Respecto a la LAL-B, se recalca la alta incidencia de mutaciones de TP53 en el subtipo de baja hipodiploidía, así como la evidencia de que, en la mitad de los casos, éstas son constitucionales (45,46). Respecto a la LAL-T, se menciona la existencia de una entidad no patológica llamada *indolent T-lymphoblastic proliferation* (iT-LBP). Esta proliferación está formada por células no clonales con un patrón de maduración normal, no se observa inmunofenotipo aberrante y no requiere tratamiento. Se especifican los criterios clínicos, inmunofenotípicos y morfológicos para efectuar su diagnóstico diferencial.

El diagnóstico de una LAL se realiza a partir de muestras de médula ósea y/o sangre periférica. El aspirado de médula ósea es el procedimiento estándar en Europa. Sin embargo, en otros países se requiere, además, una biopsia de médula. Cuando no es posible obtener material de la médula ósea mediante aspiración, se recomienda practicar una biopsia medular. Aunque la médula ósea es el tejido más adecuado para hacer el diagnóstico de leucemia aguda, también se puede diagnosticar mediante el análisis de los blastos circulantes en sangre periférica. Además, la cuantificación del número de leucocitos en sangre periférica permite distinguir entre pacientes de alto riesgo y riesgo estándar. Sin embargo, esta aproximación puede no ser representativa de toda la heterogeneidad clonal de la leucemia.

Si bien el diagnóstico de una LAL podría realizarse solo por morfología, en la actualidad se utilizan diferentes técnicas de laboratorio además del examen microscópico. Técnicas como la citometría

de flujo, citogenética o biología molecular aportan información muy valiosa acerca del fenotipo y genotipo de cada LAL. Es evidente que cuanto mejor sea la caracterización de la leucemia de cada paciente (diagnóstico integrado), se podrán ofrecer mejores aproximaciones terapéuticas para cada caso. De hecho, los datos de laboratorio son cada vez más determinantes a la hora de asignar un tratamiento y monitorizar la respuesta a éste. Efectuar una clasificación de las LAL es extremadamente complejo debido a la infinidad de factores intrínsecos y extrínsecos del tumor que influyen en la progresión y respuesta al tratamiento. Existen varias clasificaciones en función de los parámetros analizados.

6.3.1. Clasificación morfológica

El análisis citológico de la médula ósea o mielograma es el primer paso en el diagnóstico diferencial de una leucemia aguda. Para la clasificación morfológica de la LAL se tiene en cuenta el tamaño celular, la relación núcleo/citoplasma, el estado de la cromatina, la forma del núcleo, la presencia de nucleólo visible, la basofilia citoplasmática y la presencia de vacuolas. En LAL existen 3 categorías propuestas por el grupo FAB (French-American-British Cooperative Group) (Figura 8) (47,48):

- LAL-L1: blastos pequeños y de tamaño homogéneo, con cromatina homogénea y núcleo regular. Es la variedad más frecuente en la LAL pediátrica.
- LAL-L2: blastos de tamaño heterogéneo, con cromatina heterogénea y núcleo irregular. Es la tipología más frecuente en la LAL del adulto.
- LAL-L3: blastos de tamaño grande y homogéneo, con cromatina fina y presencia de vacuolas. Este subtipo generalmente corresponde al diagnóstico de leucemia de Burkitt.

Pese a que algunos artículos (publicados en los años 1980) han correlacionado estos subtipos con el pronóstico de la enfermedad, su supuesto valor predictivo no se tiene en cuenta en los protocolos asistenciales actuales (48–50).

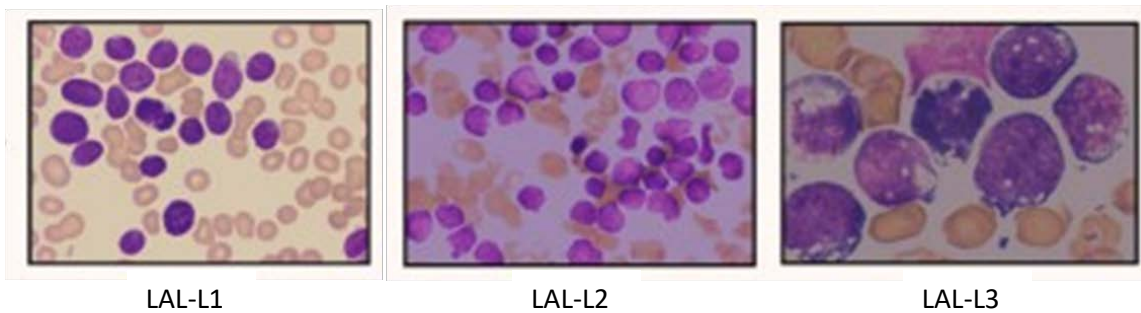


Figura 8. Tipos de LAL según la clasificación FAB (51).

6.3.2. Clasificación inmunofenotípica

El diagnóstico por citometría de flujo es clave para la determinación del linaje mixto, bifenotípico, B o T de las leucemias agudas. La citometría de flujo es imprescindible para conocer el estado de maduración de los blastos leucémicos o, lo que es lo mismo, saber en qué punto de la hematopoyesis se originó la leucemia. La evidencia científica sugiere que la inmadurez de la célula iniciadora de leucemia (LIC) se relaciona con el pronóstico de la enfermedad (p.ej. los subtipos LAL early T y LAL con reordenamiento de MLL tienen pronóstico adverso). Además, la determinación de la expresión de antígenos de membrana es útil para la administración de anticuerpos monoclonales u otras modalidades de inmunoterapia (p.ej. anticuerpos biespecíficos, anticuerpos inmunoconjugados o CARTs). Mediante citofluorometría también se puede determinar la ploidía de la leucemia mediante el valor del índice de ADN.

El grupo EGIL (European Group for the Immunological Characterization of Leukemias) identificó diferentes subtipos de LAL-B y T en función de su expresión antigénica y publicó los criterios para clasificar dichos subtipos (52).

LAL de célula B:

- pro-B o pre-pre-B (BI): TdT+, CD19+, CD79a+, CD22+, CD10-, cIgμ-, slg-.
- pre-B común (BII): TdT+, CD19+, CD79a+, CD22+, CD10+, cIgμ-, slg-.
- pre-B (BIII): TdT+, CD19+, CD79a+, CD22+, CD10+, cIgμ+, slg-.
- B madura (BIV): TdT+/-, CD19+, CD79a+, CD22+, CD10+/-, cIgμ-, slg+.

LAL de célula T:

- pro-T (TI): TdT+, CD7+, CD3c+, CD2-, CD5-, CD3-, CD1a-, CD4-, CD8-.
- pre-T (TII): TdT+, CD7+, CD3c+, CD2+, CD5+, CD3-, CD1a-, CD4+/-, CD8+/-.
- Tímica cortical (TIII): TdT+, CD7+, CD3c+, CD2+, CD5+/-, CD3+, CD1a+/-, CD4+/-, CD8+/-.
- Tímica Madura (T IV): TdT+, CD7+, CD3c+, CD2+, CD5+/-, CD3+, CD1a-, CD4+/-, CD8+/-.

Posteriormente, el grupo EuroFlow ha publicado guías para realizar un óptimo diagnóstico de las diferentes hemopatías malignas mediante citometría de flujo (53). Recientemente este grupo ha publicado las guías para la monitorización de la enfermedad residual mínima (ERM) en LAL de precursores B (54). La importancia que tiene la medición de la ERM se comentará más adelante en el apartado de factores pronósticos.

Además de su valor en el diagnóstico y en el seguimiento de la ERM, la determinación de la expresión de antígenos de membrana también puede discriminar el pronóstico de los pacientes. Un ejemplo lo encontramos en la expresión de CD34 y CD38. La expresión de estos marcadores (CD34+/CD38-) mimetiza el de las células madre hematopoyéticas y las LIC en la LAM. Pese a que existen resultados contradictorios, parece ser que el inmunofenotipo CD34+/CD38- podría tener valor pronóstico negativo en la LAL-B (55–60).

6.3.3. Clasificación citogenética

El estudio del cariotipo es esencial para el diagnóstico, pero sobre todo para el pronóstico de la LAL. Permite la detección de translocaciones (alteraciones estructurales) y aneuploidías (alteraciones numéricas). Pese a tener una resolución baja (10-20 Mb), su valor predictivo es incontestable, tal como se ha demostrado ampliamente en pacientes de todas las edades (61,62). La técnica de *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH) ofrece mayor resolución que el estudio de bandas G y se utiliza para detectar translocaciones crípticas como la t(12:21) o alteraciones numéricas de tamaño variable (desde ploidías hasta genes individuales) como la iAMP21. Además, la FISH proporciona información acerca de la heterogeneidad clonal de la muestra, ya que puede identificar alteraciones a nivel de célula individual.

Las alteraciones cromosómicas son eventos primarios iniciadores de la leucemogénesis pero son insuficientes *per se* para desarrollar una leucemia (30,63,64). Normalmente, los reordenamientos cromosómicos están presentes en todas las células de la leucemia y se mantienen en la recaída (65,66). En general, existen 2 tipos de translocaciones cromosómicas en función de las consecuencias funcionales de la translocación. El primer tipo se caracteriza por el reordenamiento de un oncogen (con la totalidad de su secuencia de ADN) detrás de la región reguladora de la expresión (*enhancer* o promotor) de un gen con alta expresión. Como ejemplos tenemos las translocaciones del gen C-MYC con los genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IGH) o con los genes de las cadenas ligeras (IGK, IGL); los reordenamientos de CRLF2 con IGH y EPOR con IGK; o los reordenamientos de TLX1 o TLX3 con el receptor de células T (TCR). El segundo tipo de translocaciones implica la yuxtaposición de parte de dos genes que conlleva la formación de una proteína de fusión con características diferentes de las de sus genes de origen. Ejemplos de este tipo son la LAL ETV6-RUNX1, TCF3-PBX1, BCR-ABL1 y los reordenamientos de MLL.

Como se observa en la Figura 9, la frecuencia de las alteraciones citogenéticas de LAL varía significativamente en función de la edad. La presencia de cariotipos de mal pronóstico es significativamente mayor en los subgrupos de edad con peor pronóstico (p.ej. reordenamientos de MLL en niños <1 año, cromosoma *Philadelphia* (Ph) aumenta con la edad). Por el contrario, la presencia de cariotipos de buen pronóstico es significativamente mayor en la población pediátrica comparado con la edad adulta (alta hiperdiploidía y t(12;21)). Los motivos de esta distribución desigual son desconocidos, pero juegan un papel decisivo en la diferencia de pronóstico entre niños y adultos, entre otros factores (Figura 10).

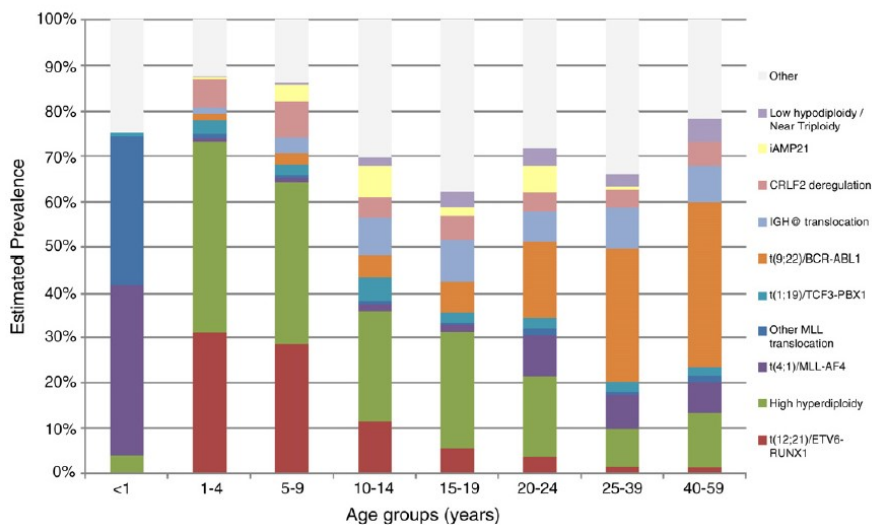


Figura 9. Frecuencia de las principales alteraciones genéticas en la LAL y su relación con la edad (67).

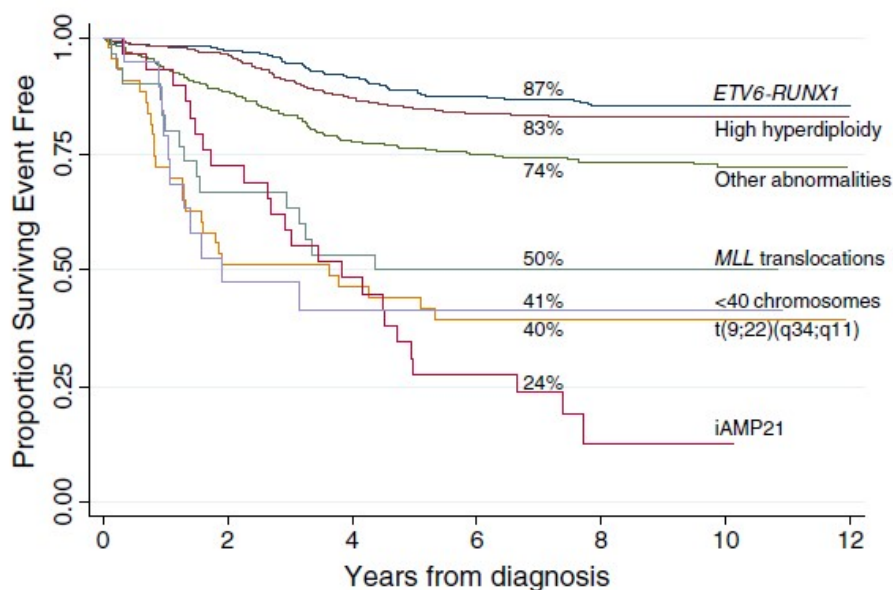


Figura 10. Impacto en la supervivencia de las principales alteraciones genéticas en la LAL infantil (67).

Aproximadamente un 75% de los casos de LAL tienen alteraciones cromosómicas recurrentes. Sin embargo, gracias a las nuevas tecnologías (principalmente *ribonucleic acid sequencing* (RNAseq)) se han identificado nuevos reordenamientos, por lo que el porcentaje de casos con alteraciones no recurrentes o desconocidas es cada vez más pequeño (reordenamientos de LAL *Ph-like*, reordenamientos de *MEF2D*, *ZNF384*, *DUX4*, entre otros). Puesto que la población a estudio de esta Tesis Doctoral está constituida por pacientes con LAL-B, no se comentarán los cariotipos característicos del subtipo T.

6.3.3.1. Subtipos citogenéticos de LAL-B descritos en la clasificación de la OMS

- a. Leucemia/Linfoma con *t(9;22)(q34;q11.2)*; BCR-ABL1.

La *t(9;22)(q34;q11.2)* conlleva la fusión de los genes BCR y ABL1 dando lugar al cromosoma *Philadelphia* (Ph). Dependiendo del punto de rotura de BCR encontramos diferentes isoformas de esta oncoproteína (p185 o p190, p210 y p230). La isoforma más frecuente en la LAL es la p190, mientras que las isoformas p210 y p230 se encuentran mayoritariamente en la LMC y en la LMC con neutrofilia, respectivamente. Esta alteración cromosómica también se encuentra en otras LA aparte de la LAL (LAM y LA bifenotípica). La incidencia de la *t(9;22)* en LAL es muy variable en función de la edad (~3% en LAL pediátricas, 25% en adultos jóvenes y 40% en adultos mayores de 55 años) y es el subtipo citogenético más abundante en la población adulta. BCR-ABL1 ejerce su

acción oncogénica mediante la estimulación de vías proliferativas y antiapoptóticas como PI3K, MYC, BTK, SOX4, STAT y ERK1/2, entre otras (68–70) (Figura 11). Los pacientes con BCR-ABL1 tienen un perfil de expresión génica característico con sobreexpresión de tirosincinasas (ABL, FYN, YES1) y genes que promueven la progresión del ciclo celular (CCND2, E2F2) (71,72). Las alteraciones secundarias más frecuentes en la LAL Ph+ son las deleciones de IKZF1 (64%-80%), CDKN2A/B (50%), PAX5 (45%), VPREB1 (40%) y BTG1 (25%) (73–75). Los pacientes con deleción de IKZF1 y/o CDKN2A/B presentan peor pronóstico que los pacientes sin deleción (74–76). El pronóstico de la LAL Ph+ ha sido históricamente adverso. Sin embargo, la introducción de inhibidores de tirosincinasa (TKI) en combinación con la quimioterapia convencional ha mejorado significativamente las expectativas de vida de pacientes de todas las edades (79–82). De hecho, los pacientes de edad avanzada con LAL Ph+ tienen mejor pronóstico que los que no presentan el cromosoma Ph (83). Más recientemente se están evaluando nuevas aproximaciones terapéuticas para estos pacientes, como la combinación de TKI con inhibidores de la vía JAK/STAT o inhibidores de FAK (este último en casos de LAL Ph+ con deleciones de IKZF1) (84,85).

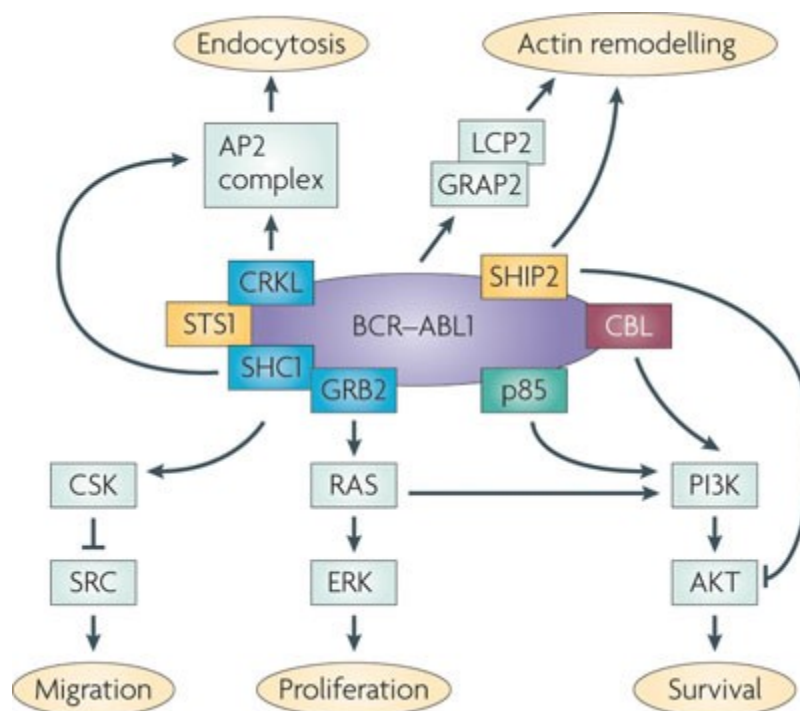


Figura 11. Principales vías por las que el reordenamiento BCR-ABL ejerce su actividad oncogénica (86).

b. Leucemia/Linfoma con t(v;11q23); reordenamiento de MLL.

El gen MLL o KMT2A es imprescindible para mantener una hematopoyesis sana, ya que mantiene la cantidad y el carácter quiescente de las células madre hematopoyéticas (HSC) mientras que promueve la proliferación de los MPP (87). Este gen se encuentra translocado en leucemia con >100 genes diferentes siendo AF4 (t(4;11)), AF9 (t(9;11)) y ENL1 (t(11;19)) los *partners* más frecuentes (88) (Figura 12). Las translocaciones dan lugar a una proteína MLL truncada, la cual mantiene su dominio N terminal, pero pierde el dominio C terminal involucrado en su actividad metiladora y acetiladora de histonas. El resultado es una desregulación de la expresión génica mediada por MLL (bien por metilación o por codificación anormal de las histonas) que confiere a estas células características de HSC (89–92). La LAL con reordenamiento de MLL es un subtipo genéticamente muy estable, en el sentido que presenta pocas CNA y pocas mutaciones (93,94). La desregulación masiva a nivel epigenético causada por el reordenamiento de MLL podría ser suficiente para el desarrollo de la leucemia (92). Este hecho podría ser una excepción al modelo de carcinogénesis más aceptado en la actualidad, que postula que el cáncer se origina por la acumulación de varias alteraciones a nivel genético (95). La desregulación epigenética de la LAL, cuyo impacto pronóstico aún está por determinar, añade un nivel más de complejidad en la patogenia de esta enfermedad, pero al mismo tiempo puede ofrecer aproximaciones terapéuticas para los pacientes (inhibidores de DOT1L). Las series de pacientes más ampliamente reportadas son aquellas con t(4;11)(q21;q23) (MLL-AF4). Este subtipo presenta refractariedad a prednisona, expresión aberrante de marcadores mieloides, mutaciones de N/KRAS, sobre expresión de MEIS1, FLT3 y CD44 e infra expresión de genes HOXA, siendo la expresión de éstos últimos un posible factor pronóstico (92,96–101). Aunque parece que la proteína recíproca (p.ej. AF4-MLL) está implicada en el proceso de leucemogénesis, su importancia para la progresión de la leucemia aún está por determinar (102,103). El pronóstico de esta LAL es muy adverso en lactantes y adverso en niños y adultos. Sin embargo, los esquemas de quimioterapia más actuales han evidenciado una mejora del pronóstico de los pacientes pediátricos y adultos (61,62). El pronóstico de otras translocaciones de MLL no está tan claro (61). Las deleciones e inversiones de este gen sin la presencia de reordenamiento podrían tener buen pronóstico (104,105).

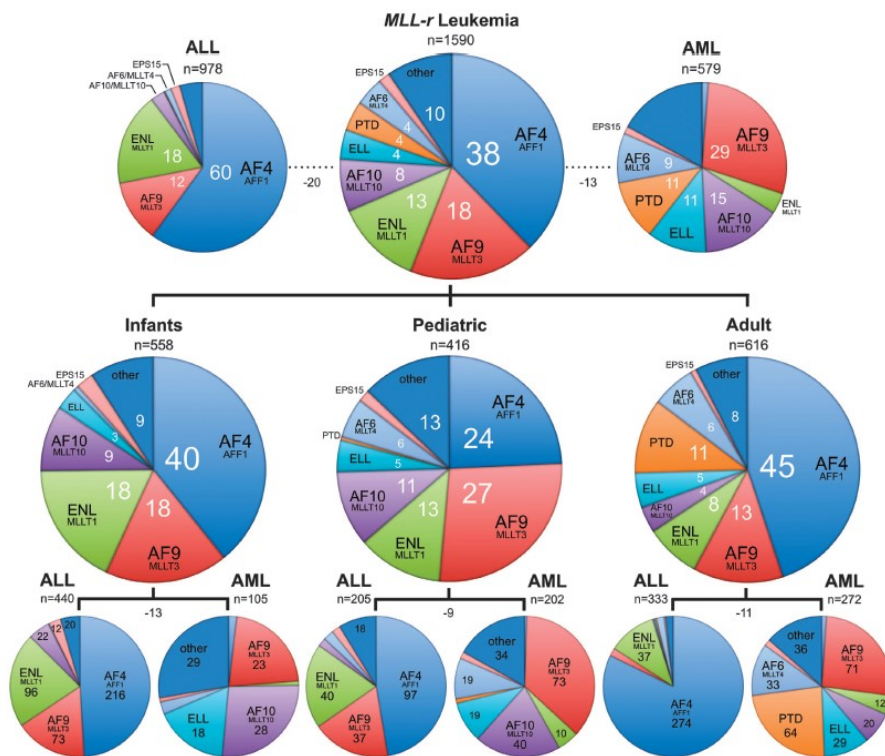


Figura 12. Partners más frecuentes del reordenamiento MLL en relación con la edad y el tipo de leucemia aguda (88).

c. Leucemia/Linfoma con t(12;21)(p13;q22); TEL-AML1 (ETV6-RUNX1).

La t(12;21)(p13;q22), que da lugar al gen de fusión ETV6-RUNX1, es la translocación cromosómica más frecuente en la LAL pediátrica (25% de las LAL-B), aunque su presencia en la LAL del adulto es muy baja (<2%). Esta translocación es críptica y no fue hasta 1994 que se descubrió por FISH (106). El pronóstico de los pacientes pediátricos de este subtipo de LAL es muy favorable, con tasas de supervivencia global alrededor del 90% (61,107–110). Los pacientes adultos también parecen tener buen pronóstico, aunque existen muy pocas series reportadas (111).

Las alteraciones secundarias más frecuentes son la delección del alelo no translocado del gen ETV6 (en ~60% de los pacientes) y la duplicación del cromosoma 21 o del cromosoma 21 derivativo de la t(12;21) que ocurre en un 20% de los casos; sin embargo, el valor pronóstico de estas alteraciones es controvertido, aunque podría no tener impacto pronóstico (67). Los perfiles de expresión de estos pacientes muestran sobreexpresión del gen antiapoptótico BIRC7 y la proteína de adhesión celular DSC3 (112). Se han descrito otras alteraciones secundarias en la LAL con t(12;21) como delecciones de IKZF1, CDKN2A/B, PAX5, RAG1 y BTLA/CD200, entre otras (67,113,114). Los pacientes con delección o mutación de CREBBP podrían tener mayor probabilidad de recaída (115).

d. Leucemia/Linfoma con hiperdiploidía (51-65 cromosomas).

La LAL con hiperdiploidía es el subtipo citogenético más común en la LAL pediátrica (30%) y está presente en un 10% de las LAL del adulto (61,62). Los pacientes presentan duplicaciones cromosómicas (trisomías y tetrasomías) de entre 5 y 19 cromosomas. Las ganancias no son al azar, ya que las duplicaciones de los cromosomas 4, 6, 10, 14, 17, 18, 21 y X son claramente las más recurrentes (Figura 13). Los cromosomas 14 y 21 suelen presentar tetrasomía (116–119). Los pacientes con hiperdiploidía responden muy favorablemente a la terapia con metotrexato y tienen una supervivencia global del 80%-90% (61,120–122). Algunos grupos cooperativos han observado un pronóstico más favorable en los pacientes no hiperdiploides que presentan trisomías de los cromosomas 4, 10 y 17 o trisomía solo del cromosoma 18 (61,123). Las deleciones de CDKN2A/B, ETV6, PAX5 y RAG1 y mutaciones de N/KRAS se observan con frecuencia en este subtipo de LAL (114,118,124).

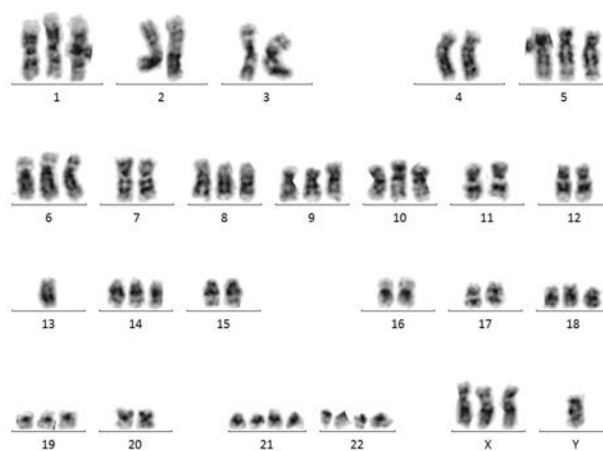


Figura 13. Cariotipo hiperdiploide identificado en el Laboratorio de Citogenética del Servicio de Hematología del ICO-Hospital Germans Trias i Pujol. Nótese las trisomías en los cromosomas 6, 10, 14, 18 y X, así como tetrasomía del cromosoma 21.

e. Leucemia/Linfoma con hipodiploidía (LAL hipodiploide)

Las LAL con hipodiploidía presentan cariotipos con 30-39 cromosomas. Las monosomías tampoco se dan al azar, ya que las más frecuentes son las de los cromosomas 3, 7, 15, 16 y 17, mientras que los cromosomas 1, 6, 11 y 18 suelen presentar dotación par. Con frecuencia se observan casos de LAL hipodiploide que presentan subclones con casi triploidía causada por la presencia de tetrasomías de los cromosomas 1, 6, 11 y 18 (inicialmente los cromosomas en dotación par) y

dotaciones pares de los cromosomas 3, 7, 15, 16 y 17 (inicialmente las monosomías). Este fenómeno responde a la duplicación del contenido cromosómico de clones hipodiploides, lo que puede parecer que sean LAL hiperdiploides. Es importante analizar el patrón de ganancias cromosómicas en las LAL con hiperdiploidía para no confundir subtipos citogenéticos, por las consecuencias en la asignación de tratamiento que puedan conllevar (125). La LAL con hipodiploidía es poco frecuente en niños mientras que en adolescentes y adultos jóvenes (AYA) y adultos está presente en un 3%-5% de los casos. El pronóstico de estos pacientes es desfavorable (61,62).

Algunos autores sugieren que el subtipo de LAL con hipodiploidía está formado, de hecho, por tres subgrupos diferenciados: casi haploidía (<30 cromosomas), baja hipodiploidía (30-39 cromosomas) y alta hipodiploidía (40-45 cromosomas) que tienen distinto pronóstico (61,67). Las LAL con baja hipodiploidía se distinguen de las de alta hipodiploidía por varios hechos: el número de cromosomas (<40 vs ≥ 40); las LAL con alta hipodiploidía no presentan subclones con la duplicación cromosómica observada en las LAL hipodiploides; algunas LAL con alta hipodiploidía presentan $t(12;21)(p13;q22)$, $t(9;22)(q34;q11.2)$ o $t(1;19)(q23;p13.3)$. Este subtipo presenta una alta frecuencia de mutaciones de TP53 (en más de la mitad de los casos también en la línea germinal) y IKZF2 así como deleciones de RB1 (45). Los casos de LAL con 40-45 cromosomas (alta hipodiploidía) son muy infrecuentes (0.2%) y no parecen presentar pronóstico adverso (61).

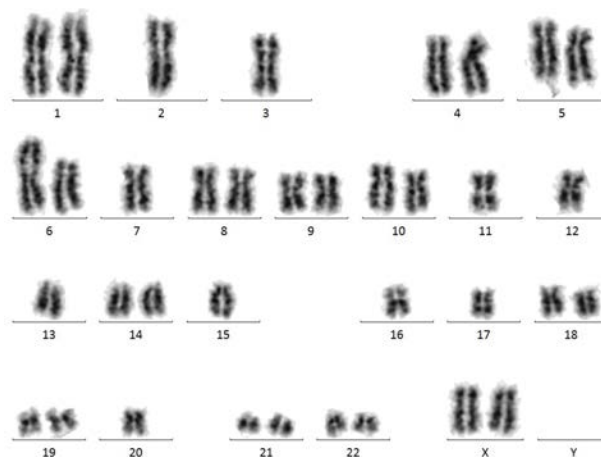


Figura 14. Cariotipo de un paciente con baja hipodiploidía identificado en el Laboratorio de Citogenética del Servicio de Hematología del ICO-Hospital Germans Trias i Pujol. Nótese las monosomías de los cromosomas 3, 7, 15, 16 y 17.

f. Leucemia/Linfoma con t(5;14)(q31;q32); IL3-IGH.

Esta entidad tiene muy baja incidencia (<1% tanto en niños como en adultos) y se caracteriza por la presencia de blastos de línea B CD10+/CD19+ en la médula ósea acompañados de eosinofilia en sangre periférica. La translocación cromosómica se puede detectar por estudio de bandas G o FISH y sitúa al gen IL3 detrás del promotor de IGH, lo que comporta la sobreexpresión constitutiva de IL3 (126). Puesto que IL3 estimula el crecimiento de los eosinófilos, no es de extrañar que estas LAL presenten elevados recuentos de eosinófilos circulantes (127). En ocasiones, la hipereosinofilia precede al diagnóstico de esta entidad. El pronóstico de este reordenamiento es bastante desconocido, aunque podría ser de riesgo intermedio.

g. Leucemia/Linfoma con t(1;19)(q23;p13.3); E2A-PBX1 (TCF3-PBX1)

En el 90%-95% de las translocaciones t(1;19)(q23;p13) se forma el gen de fusión TCF3-PBX1 (128). El porcentaje restante presenta otros genes de fusión sin un patrón recurrente (129,130). Las t(1;19)(q23;p13.3) pueden ser balanceadas en la mitad de los casos, o no balanceadas, observándose solo el cromosoma derivativo der(19)t(1;19) en la otra mitad de casos. Las translocaciones balanceadas siempre forman el gen de fusión TCF3-PBX1. Los casos que no forman el gen de fusión presentan der(19)t(1;19) y en algunos casos ello ocurre dentro de un cariotipo hiperdiploide (130). Una característica inmunofenotípica relacionada con este subgrupo citogenético es que la mayoría de las LAL con t(1;19)(q23;p13.3) son LAL pre-B (128). Este subgrupo cuenta con un perfil de expresión génica característico, el cual presenta sobreexpresión de quinasas PRKCZ, EB-1, WNT16, BLK y MERTK, entre otras (71,72,100,112). Al contrario de los otros subtipos citogenéticos, la incidencia de esta translocación no varía con la edad, siendo del 3%-5% (67). Aunque en protocolos de los años 1990 los niños con t(1;19)(q23;13.3) presentaban mal pronóstico, en los protocolos terapéuticos actuales el riesgo citogenético de estos pacientes es intermedio y su pronóstico es intermedio-favorable (61,121). En los pacientes adultos existe más controversia en cuanto al riesgo de estos pacientes, aunque se suele considerar que tienen citogenética de riesgo intermedio (Figura 15) (62,131–133).

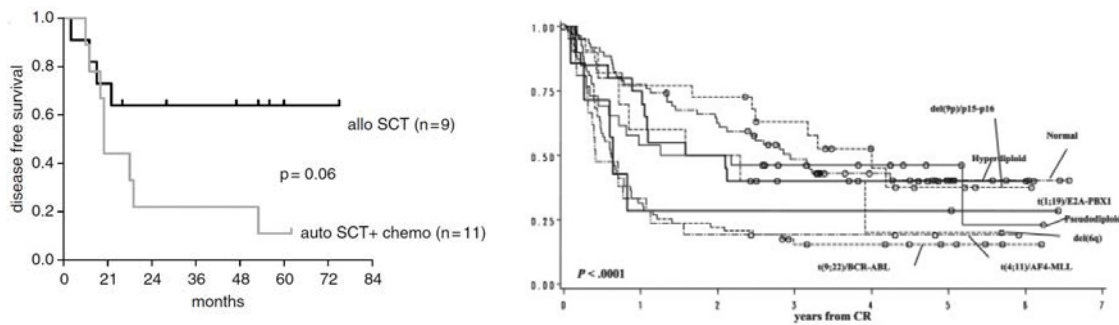


Figura 15. Mejoría del pronóstico de la t(1;19)(q23;p13.3) con la intensificación del tratamiento (133,134).

6.3.3.2. Subtipos citogenéticos relevantes no recogidos en la clasificación de la OMS

a. Casi haploidía (<30 cromosomas)

Tal y como se ha comentado anteriormente, existe una proporción de LAL con hipodiploidía que presenta <30 cromosomas, típicamente entre 25 y 28 (135). Esta dotación numérica se debe a que estos pacientes presentan monosomía de la mayoría de los cromosomas y no presentan nulisomía (pérdida de ambos cromosomas del mismo par) ni alteraciones estructurales. Las monosomías no son al azar, ya que en la mayoría de casos se retienen ambos cromosomas 10, 14, 18 y 21. La evolución clonal en forma de subclones que presentan duplicación de la dotación cromosómica inicial es un fenómeno recurrente (135). El resultado es una dotación par de todos los cromosomas excepto los cromosomas 10, 14, 18, 21 y X que presentan tetrasomía. Es importante no confundir estos casos con LAL con hiperdiploidía ya que, al contrario que los pacientes hiperdiploides, los pacientes con casi haploidía tienen un pronóstico muy adverso (Figura 16)(61,136). La incidencia de esta LAL es afortunadamente muy baja. Solo está presente en un 1% de las LAL pediátricas, mientras que son extremadamente raras en pacientes adultos (137,138). Este subgrupo se caracteriza por la presencia de delecciones de IKZF3 y mutaciones de genes de la ruta metabólica Ras (FLT3, NF1, N/KRAS y PTPN11) (45).

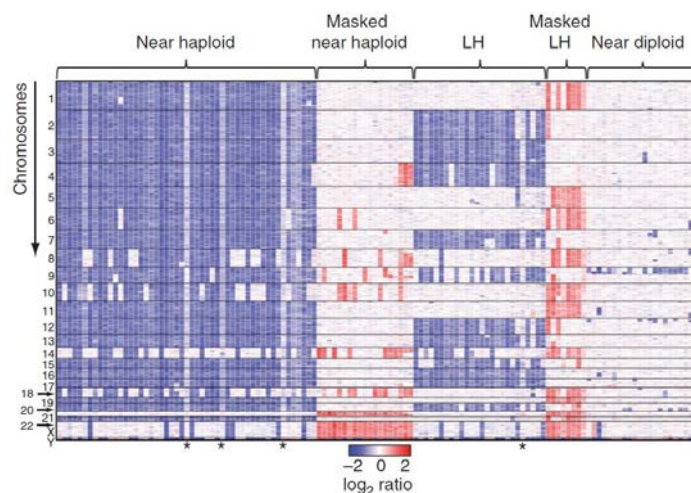


Figura 16. Utilidad de los SNP arrays en la detección y clasificación de las LAL hipodiploides (45).

b. Cariotipo complejo

La definición de cariotipo complejo puede variar entre las diferentes neoplasias hematológicas. En los síndromes mielodisplásicos y las LAM, los casos con cariotipo complejo presentan ≥ 3 alteraciones cromosómicas, mientras que en LAL los cariotipos complejos tienen ≥ 5 alteraciones siempre y cuando no sean alteraciones cromosómicas que constituyen un subtipo citogenético establecido (p.ej. t(9;22)) (62). La incidencia de los cariotipos complejos parece aumentar con la edad y representa un 5%-10% de las LAL-B Ph negativas (132). El pronóstico de los pacientes con cariotipo complejo parece ser adverso, aunque no existe un consenso absoluto al respecto (62,139–142).

c. iAMP21, *intrachromosomal amplification 21*

La iAMP21 se relaciona con la presencia a nivel germinal de la rob(15;21)(q10;q10) (143). Esta entidad se caracteriza por la presencia de un cromosoma 21 estructuralmente anormal, que ha sufrido cromotripsis en 21q y que en consecuencia, presenta múltiples regiones de delección, inversión y duplicación de material genético en el brazo largo (144). Mediante CGH i SNP arrays se ha conseguido mapear una región comúnmente duplicada entre 21q22.11 y 21q22.12 que contiene el gen RUNX1, así como delecciones teloméricas (<1 Mb) en un 80% de los casos (145). Pese a que los casos con iAMP21 muestran heterogeneidad génica en esta región y los perfiles de expresión son variables entre pacientes, esta alteración constituye un subtipo citogenético *per se* (62,146,147). Puesto que el gen RUNX1 siempre se encuentra duplicado en estos pacientes, la

técnica preferente para detectar esta entidad es la FISH mediante sondas dirigidas contra este gen. Para considerar un caso iAMP21 positivo deben existir por lo menos 3 copias (o más) de RUNX1 que equivalen a 5 o más señales de FISH (Figura 17) (148).

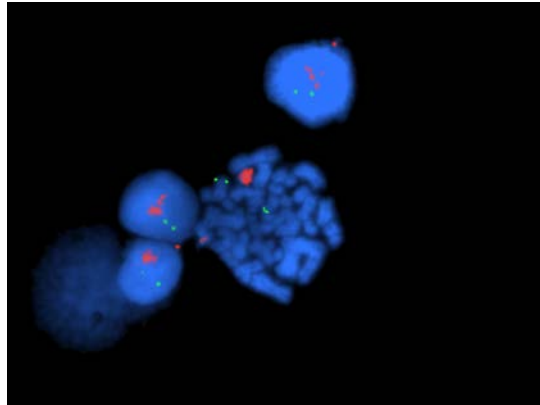


Figura 17. Determinación de FISH con múltiples copias del gen RUNX1 (en rojo) del Laboratorio de Citogenética del Servicio de Hematología del ICO-Hospital Germans Trias i Pujol.

Esta es una entidad de LAL pediátrica, ya que prácticamente no existe en pacientes mayores de 20 años (62). Afecta a un 3%-5% de las LAL pediátricas, los pacientes tienen una mediana de edad de 10 años y suelen presentar bajos recuentos de leucocitos al diagnóstico (149). Si estos pacientes se tratan con protocolos de riesgo intermedio, presentan una elevada tasa de recaídas y una supervivencia libre de evento del 15% a los 10 años (Figura 10) (62,150,151). Más recientemente, la intensificación del tratamiento en estos pacientes ha mejorado significativamente su pronóstico (Figura 18) (78,152). Las alteraciones secundarias más frecuentes son la ganancia del cromosoma X, pérdida del cromosoma 7 y deleciones de ETV6 y RB1 (152).

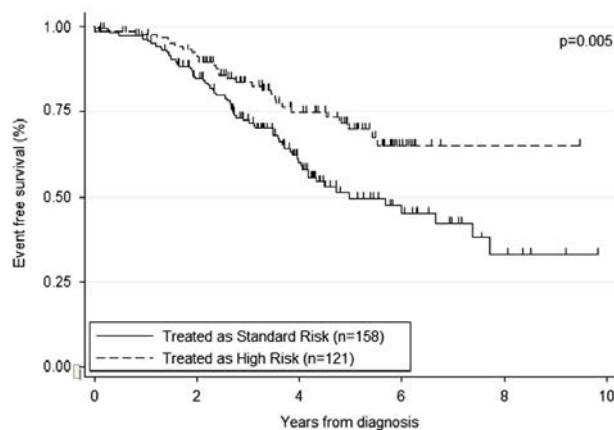


Figura 18. Mejoría del pronóstico de la iAMP21 con la intensificación del tratamiento (152).

d. Translocaciones de IGH:

Las translocaciones de IGH son un evento recurrente en linfomas y mieloma múltiple aunque también están presentes en pacientes de LAL de precursores B (153). Como se ha comentado anteriormente, las translocaciones de IGH o TCR suelen situar a un oncogen detrás de la región *enhancer* o promotora de IGH o TCR, genes que se expresan en gran cantidad constitutivamente. El resultado es la sobreexpresión constitutiva del oncogen reordenado (154). Existen diferentes *partners* de translocación del gen IGH entre los que destacan CRLF2, 5 de los 6 miembros de la familia CEBP (*CCAAT/Enhancer Binding Protein*, CEBPA, CEBPB, CEBPD, CEBPE y CEBPG), ID4, miR-125b-1, EPOR y, recientemente, DUX4 (155–159). La presencia de translocaciones de IGH es recurrente en las LAL Ph *like* (p.ej. CRLF2-IGH, EPOR-IGH) (160,161). En total, las translocaciones de IGH constituyen el 5% de las LAL, aunque son más frecuentes en AYA e individuos adultos (67). Parece que las translocaciones de IGH comportan mal pronóstico, aunque solo en análisis univariantes (162,163). El efecto negativo en la supervivencia de los pacientes con translocación de IGH podría depender del *partner* de la translocación, ya que las translocaciones CRLF2-IGH parece que podrían comportar mal pronóstico (164,165), pero dadas las características propias de este grupo de pacientes, se trataran aparte en el siguiente apartado.

e. Translocaciones de CRLF2

La sobreexpresión de CRLF2 se da en los casos en que existe la translocación críptica de este gen con IGH ($t(X;14)(p22;q32)$ y $t(Y;14)(p11;q32)$), una delección críptica en la región X/Y PAR1 que conlleva la fusión P2RY8-CRLF2 o, menos frecuentemente, a mutaciones activadoras (SNV CRLF2 F232C) (166–168). Las duplicaciones de este gen también comportan un aumento en la expresión del gen en la mayoría de los casos (164,169–171). La sobreexpresión de CRLF2 activa la vía JAK/STAT mediante la fosforilación de STAT5 y ERK estimulando así la proliferación celular (166,167). Los pacientes con sobreexpresión de CRLF2 muestran un perfil de expresión génica parecido al de las LAL Ph+ y suelen tener mutaciones de la vía JAK/STAT, sobretodo de JAK2, así como delecciones de IKZF1, CDKN2A/B y PAX5 (166–168,172). La sobreexpresión también se ha detectado en casos de LAL-T pediátrica de alto riesgo y parece asociarse con pronóstico adverso (173). Pese a que existen diferencias entre estudios, las translocaciones de CRLF2 se observan en un 5%-10% de LAL-B pediátricas y adultas, con la excepción de las LAL con Síndrome de Down, donde existe translocación de CRLF2 en el 50%-60% de los casos (162,166,174). Las translocaciones de CRLF2 pueden coexistir con otras translocaciones recurrentes en LAL-B (175).

En niños, la proporción de P2RY8-CRLF2:IGH-CRLF2 es de 5:1 mientras que en adultos es 1:2 (67). Existen resultados contradictorios en cuanto al pronóstico de estas translocaciones. Algunos estudios sugieren que las translocaciones son un marcador de mal pronóstico en pacientes pediátricos (170–172,174,176–178). Por contra, otros estudios no han encontrado asociación con pronóstico adverso (169,179–185). En pacientes adultos también existe controversia acerca del significado pronóstico de las translocaciones de CRLF2. Algunos estudios apuntan que son un marcador de mal pronóstico (186–188). Sin embargo, el grupo británico de LAL ha identificado las translocaciones como factor de mal pronóstico solo en análisis univariantes (162,163).

Por tanto, no todos los casos con sobreexpresión de CRLF2 tienen mal pronóstico. Quizás solo aquellos con translocaciones presentan mala evolución y las translocaciones confieren peor pronóstico en pacientes de riesgo intermedio comparado con pacientes de alto riesgo. Es posible también que la presencia de alteraciones adicionales frecuentes en este subgrupo como las deleciones de IKZF1 o CDKN2A/B module el pronóstico de los pacientes con estas translocaciones. Un ejemplo lo tenemos en los pacientes con LAL Ph *like*, que presentan reordenamiento de CRLF2 en un 50% de los casos y que tienen alteraciones genéticas de mal pronóstico como deleciones de IKZF1, mutaciones de JAK2 y de genes de la vía Ras, que pueden influir en el pronóstico de los pacientes (160,170,172,186,189). Las diferencias en las pautas de tratamiento entre los grupos cooperativos también pueden repercutir en esta disparidad de resultados.

La adición de inhibidores de JAK/STAT y/o mTOR a la quimioterapia convencional podría mejorar la supervivencia de los pacientes con sobreexpresión de CRLF2 (190–193).

f. Translocaciones de PAX5

El gen PAX5 se encuentra reordenado con diferentes genes en un 2%-3% de las LAL-B, aunque la frecuencia de estas translocaciones podría ser superior en la LAL pre-B (194–198). En las translocaciones, el dominio 5' N-terminal de unión al ADN de PAX5 se fusiona con el extremo 3' del gen de fusión en la mayoría de los casos. El resultado de las translocaciones es la pérdida del dominio de transactivación de PAX5, lo que comporta la pérdida de función del gen en la mayoría de los casos (199). La presencia de translocaciones de PAX5 no excluye la presencia de otras translocaciones como la t(9;22) (194,200,201) (Figura 19). A parte de su función en la diferenciación de los linfocitos B, se ha descrito recientemente que este gen podría ser un gen supresor de tumores, ya que en experimentos de mutagénesis dirigida se observa un incremento

de alteraciones genéticas secundarias cuando muta PAX5. Por lo tanto, la pérdida de función de PAX5 podría tener un doble impacto en las células tumorales: bloqueo de la diferenciación y aumento de la inestabilidad genética (202,203). Además, en algunos casos, el gen de fusión puede tener propiedades oncogénicas como en el caso de las fusiones PAX5-JAK2 o las fusiones PAX5-ETV6 (204–206). La translocación PAX5-JAK2 está presente en algunos casos de LAL Ph *like* e implica la activación de la vía JAK/STAT aunque su impacto pronóstico, así como el de otros *partners*, está por determinar (161,204,205).

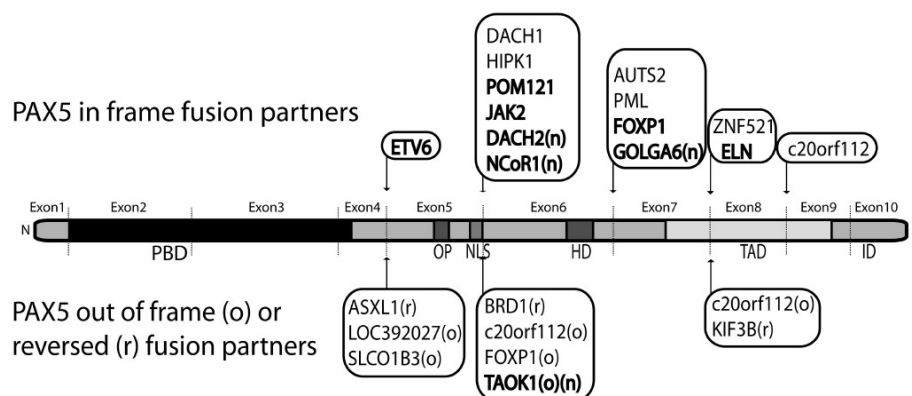


Figura 19. *Partners* de fusión de PAX5 (201).

g. Translocaciones de MEF2D

MEF2D se encuentra reordenado preferentemente con BCL9, aunque también existen translocaciones con HNRNPUL1, SS18, FOXJ2, CSF1R y DAZAP1. En todos los casos el dominio de unión al ADN de MEF2D se conserva y el gen de fusión aumenta la actividad de este factor de transcripción e induce proliferación celular, inhibición de apoptosis y leucemia (100,207–209). La translocación DAZAP1-MEF2D es el resultado de una translocación variante de la t(1;19)(q23;p13.3) (208). La incidencia de estos reordenamientos es del 3%-5% en LAL-B pediátricas y 7% en adultos. Los pacientes con reordenamientos MEF2D-BCL9 tienen inmunofenotipo pre-B, deleciones de IKZF1 (sobre todo isoforma Ik6), mutaciones de la vía RAS, resistencia a dexametasona y posiblemente mal pronóstico en todas las edades (Figura 20)(159,209–211). La translocación MEF2D-BCL9 comporta la sobreexpresión de HDAC9 y su inhibición con inhibidores de histona desacetilasa (HDAC) reduce la proliferación celular en modelos animales de leucemia (209).

h. Translocaciones de ZNF384

Las translocaciones de ZNF384 forman genes de fusión compuestos por genes que codifican proteínas modificadoras de la cromatina o factores de transcripción (EP300, CREBBP, TAF15, SYNRG, EWSR1, TCF3 i ARID1B) y el gen ZNF384 entero (212–214). Estas LAL se caracterizan por tener fenotipo B CD10- con expresión de antígenos mieloides y de HSC, así como mutaciones de la vía RAS (215,216). Representan el 3%-4% de las LAL-B pediátricas y el 7% de las del adulto (209). El pronóstico de estos reordenamientos podría ser dependiente del *partner* del reordenamiento ya que, aunque se han publicado pequeñas series de pacientes, éstas han mostrado resultados no concordantes (67,159,209,215,217) (Figura 20). Las translocaciones EP300-ZNF384 y CREBBP-ZNF384 causan una reducción de la acetilación de las histonas y confieren sensibilidad a inhibidores de HDAC (218).

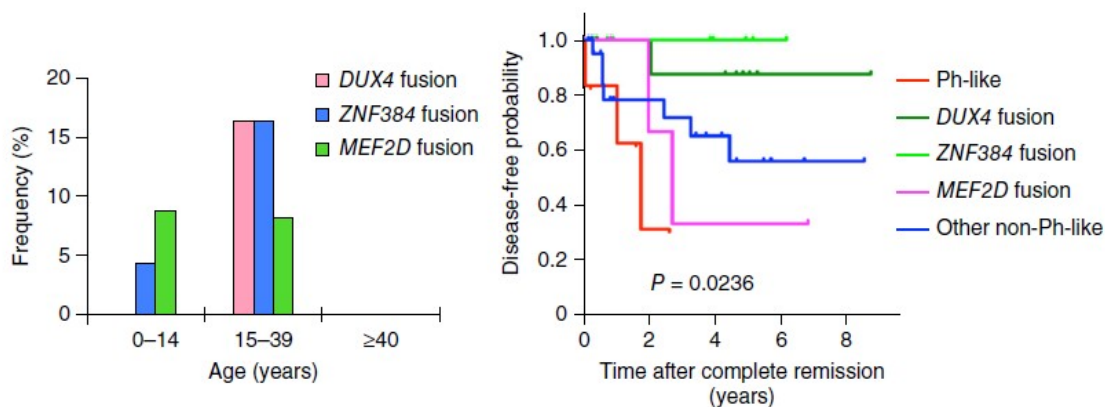


Figura 20. Incidencia, relación con la edad y pronóstico de los reordenamientos DUX4, ZNF384 y MEF2D (159).

i. Translocaciones de DUX4

El gen DUX4 se encuentra en la región terminal del cromosoma 4 (4qter). Esta es una región altamente polimórfica en la población, ya que contiene entre 11 y 150 repeticiones en tándem D4Z4. Se cree que estas repeticiones en tándem (altamente metiladas) compactan la cromatina y silencian la expresión del gen DUX4, ya que éste no se expresa en ningún tejido en la población sana (219). Los pacientes con distrofia facioescapulohumeral tienen delección de las repeticiones D4Z4 que causan una desrepresión y, por tanto, la expresión de DUX4. En un 4%-7% de las LAL-B (y en un 25% de las LAL sin reordenamientos recogidos en la clasificación de OMS) el gen DUX4 se

transloca con el gen IGH (por detrás de su *enhancer*) resultando en la sobreexpresión de una isoforma truncada de DUX4 (159,209,220). Esta isoforma truncada carece del dominio C-terminal, el cual confiere características proapoptóticas (221,222). Estos reordenamientos no son visibles en el cariotipo. DUX4 también se reordena con ERG, aunque con menor frecuencia que con IGH (223). Este subgrupo de pacientes presenta un inmunofenotipo y perfil de expresión génica característico y distinto al de otras LAL (209,223). En los casos de translocación con IGH, la proteína DUX4 truncada se une al intrón 6 del gen ERG y promueve la expresión de proteínas aberrantes de ERG truncadas en su dominio C-terminal (ERGalt). Estas isoformas retienen su dominio de unión al ADN y el dominio de transactivación e inhiben la función del alelo WT de ERG generando leucemias en modelos animales (159,220) (Figura 21). Además, la mayoría de casos con reordenamiento de DUX4 tienen deleciones intragénicas del gen ERG en el otro alelo, que se asocian a buen pronóstico a pesar de la presencia de deleciones de IKZF1 en un 40% de los pacientes con deleción intragénica de ERG (Figura 20)(209,220,223–227).

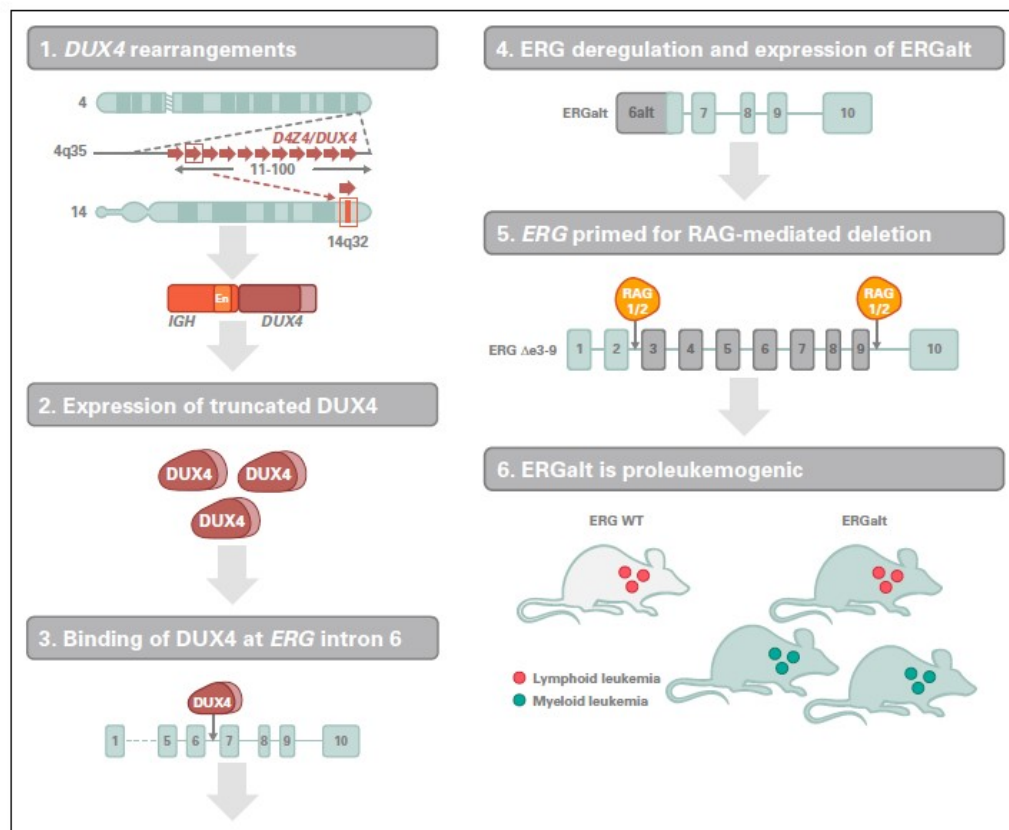


Figura 21. Mecanismos de leucemogénesis mediados por los reordenamientos DUX4 en modelos animales (228).

j. LAL Ph *like*

En el año 2009, los grupos de investigación de LAL pediátrica europeos DCOG (Dutch Childhood Oncology Group) y COALL (German Cooperative ALL trials in childhood) y el grupo americano de St Jude (COG) identificaron, mediante arrays de expresión, un conjunto de pacientes con un perfil de expresión génica muy similar al de las LAL Ph+ pero sin presentar dicho reordenamiento. Estos pacientes presentaban refractariedad al tratamiento y un pronóstico muy desfavorable, muy parecido al de los pacientes Ph+ (75,76). Posteriormente, el pronóstico desfavorable de este subgrupo se ha confirmado en LAL de todas las edades (161,165,229,230). Sin embargo, la toma de decisiones terapéuticas en función de los valores de ERM podría contrarrestar el mal pronóstico de este subtipo, por lo menos en pacientes pediátricos (231).

La incidencia de la LAL Ph *like* es variable en función de la edad, siendo los AYA el grupo de edad a partir del cual la incidencia aumenta claramente (12% en <18 años, 28% AYA, 20% adultos y 24% adultos de edad avanzada)(165,230,231). Este subtipo de LAL se caracteriza por la presencia de alteraciones genéticas que activan constitutivamente receptores de citocinas y quinasas que inducen la proliferación celular (90% de los casos). Esta activación constitutiva se da mediante translocaciones cromosómicas de CRLF2 (CRLF2-IGH o CRLF2-P2RY8 en la mitad de casos de LAL Ph *like*); translocaciones de tirosincinasas tipo ABL como ABL1, ABL2, CSF1R, PDGFRA o PDGFRB (12%); reordenamientos de JAK2 (7%), reordenamientos del receptor de la eritropoyetina (EPOR)(3%), mutaciones puntuales de la vía JAK/STAT (JAK1/2, IL7R)(11%); mutaciones en genes de la vía RAS (FLT3, K/NRAS, PTPN11, NF1) (6%) y mutaciones de otras cinasas (BLNK, TYK2, PTK2B) (Figuras 22 y 23). Además, estos pacientes suelen presentar deleciones de genes de diferenciación linfoide (IKZF1, EBF1, PAX5, RAG1/2 y VPREB1) así como deleciones de CDKN2A/B o BTG1 (75,160,224,232,233). Los pacientes con reordenamiento de CRLF2 suelen presentar mutaciones de JAK2 en la mitad de los casos, aunque también pueden presentar mutaciones en JAK1 o JAK3 (166,168). Las alteraciones activadoras de quinasas tipo ABL podrían ser sensibles a TKI tal como se ha evidenciado en cultivos celulares y modelos animales de muestras de pacientes y en el tratamiento de pacientes aislados (160,161,192,193). Las mutaciones de JAK2 y reordenamientos de CRLF2 podrían ser sensibles a inhibidores de JAK2 como ruxolitinib o inhibidores de mTOR (191–193). En este sentido, se han iniciado varios ensayos clínicos para valorar la eficacia de Dasatinib y Ruxolitinib en pacientes con LAL Ph *like* (234).

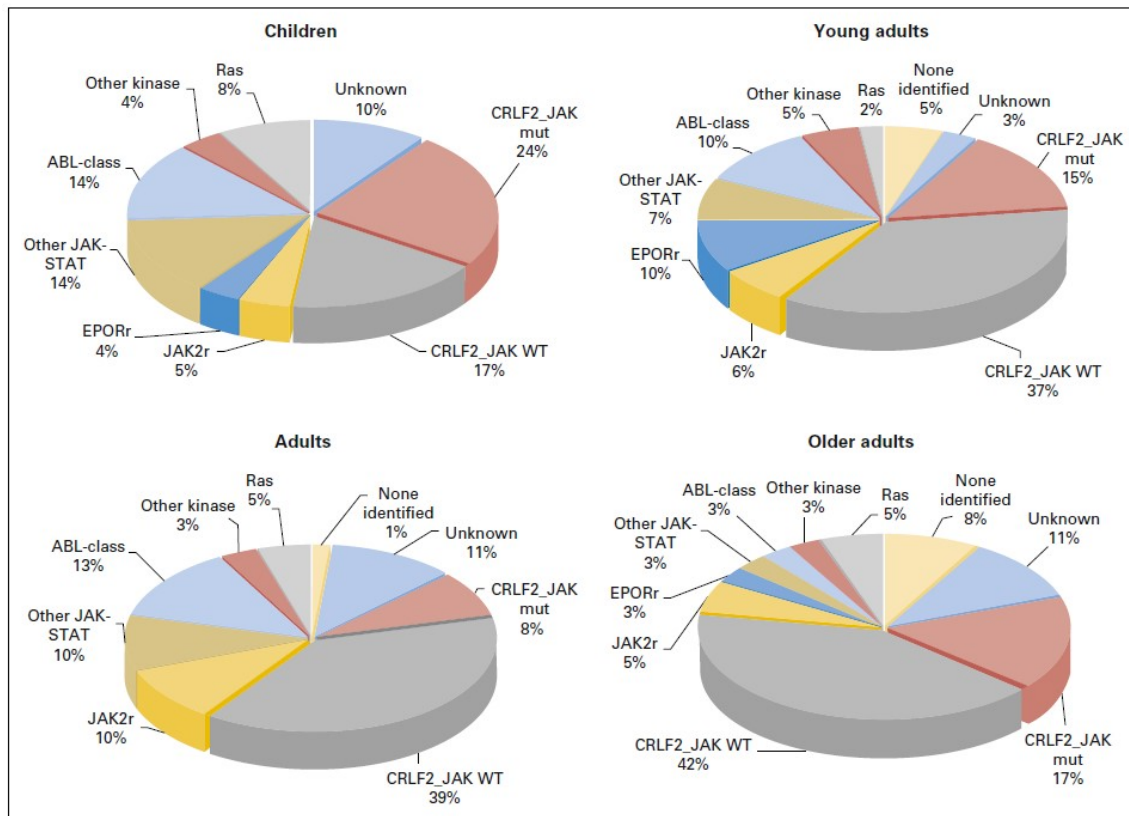


Figura 22. Reordenamientos en la LAL Ph-like en relación con la edad (228).

Este subtipo de LAL es muy heterogéneo y no existe una única lesión molecular que lo defina. El algoritmo de trabajo que conllevaría el diagnóstico de estos pacientes por técnicas de rutina asistencial es difícil de asumir por motivos de tiempo, personal y recursos, y además no aseguraría la detección del 100% de los casos. La identificación certera de estos pacientes solo se puede hacer mediante análisis de perfiles de expresión génica (arrays de expresión o RNA-seq) con las dificultades y el sesgo que esto conlleva (RNA menos estable que DNA y dificultad y variabilidad en el análisis de los datos) (235). Actualmente se están centrando muchos esfuerzos para efectuar un diagnóstico más estandarizado y sencillo de estas LAL (236). En este sentido, el grupo alemán GMALL ha reportado que las mutaciones de JAK2 y/o los reordenamientos de IGH-CRLF2 podrían encontrarse exclusivamente en pacientes Ph like (165).

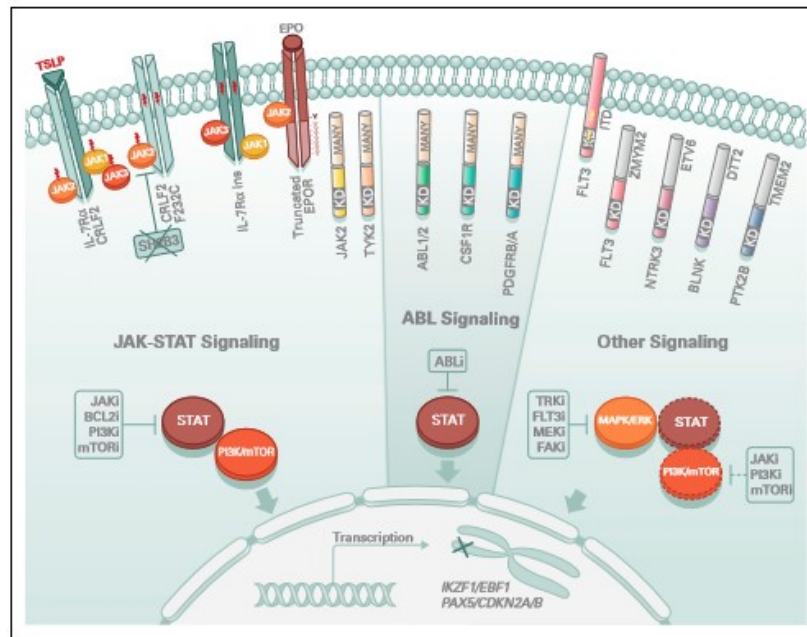


Figura 23. Principales vías de señalización en la LAL Ph-like (228).

6.3.4. Alteraciones secundarias

Las tecnologías basadas en *arrays* y más recientemente de secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing, NGS) han supuesto un avance fundamental en el conocimiento de la patogenia de la LAL. Se han identificado un gran número de alteraciones secundarias en forma de ganancias y pérdidas de ADN (CNA, Copy Number Alteration), pérdida de heterocigosidad (CN-LOH, Copy Neutral-Loss Of Heterocigosity) así como mutaciones somáticas (SNV, single nucleotide variant) que afectan a genes clave para la diferenciación linfocítica, el control del ciclo celular y la regulación de la apoptosis, entre otros (237). Mediante *arrays* de expresión se ha conseguido obtener los perfiles de expresión génica característicos de los diferentes subtipos citogenéticos de la LAL así como descubrir nuevos subgrupos como la LAL Ph like (75,76). La técnica de RNAseq también ha facilitado la identificación de nuevas translocaciones cromosómicas, así como la detección de isoformas patológicas de varios genes (p.ej. DUX4, ERG) (209).

Estas técnicas han constatado que la LAL es una neoplasia extremadamente heterogénea a nivel genético y a nivel epigenético, lo que hace pensar que no hay una LAL igual a otra ni genotípica ni fenotípica. Las LAL tienen una mediana de 8-10 CNA y ~10 SNV al diagnóstico (65,209,237,238). Al igual que sucede con los subtipos citogenéticos, la frecuencia de estas alteraciones también presenta variaciones según la edad. Parece ser que en individuos adultos los genes implicados en la diferenciación linfocítica B, la regulación del ciclo celular o regulación

epigenética están significativamente más alterados que en la población pediátrica (209,239) (Figuras 24 y 25).

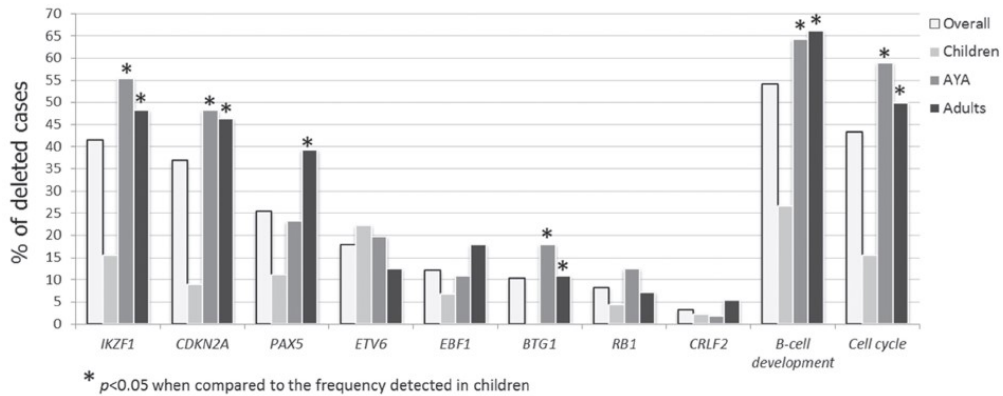


Figura 24. Diferencias en la frecuencia de CNA en relación con la edad (239).

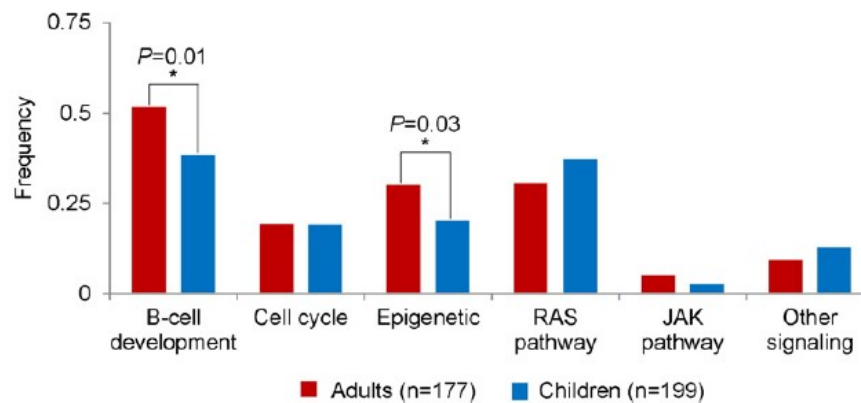


Figura 25. Comparación de la frecuencia de CNA en diferentes vías metabólicas en función de la edad (209).

El significado pronóstico de estas alteraciones de manera individual y en diferentes combinaciones, está centrando muchos esfuerzos en investigación traslacional. Conocer con exactitud el impacto pronóstico de estas alteraciones (y de sus diferentes combinaciones) en el pronóstico de los pacientes no solo permite una mejor estratificación de éstos por grupos de riesgo para asignar tratamiento, sino que además, proporciona evidencia científica para generar moléculas terapéuticas dirigidas contra las vías metabólicas desreguladas. Pese a la gran cantidad de nuevas alteraciones identificadas en el genoma de la LAL, pocas tienen un impacto pronóstico ampliamente aceptado en la comunidad internacional. Es probable que el uso de diferentes técnicas para su detección, así como la heterogeneidad de los tratamientos que recibieron los pacientes con estas alteraciones, estén detrás de estos resultados contradictorios. Además, intentar esclarecer el significado pronóstico de una alteración génica sin tener en cuenta el resto

de alteraciones del tumor dificulta el proceso. Algunas alteraciones pueden ver modulado su impacto pronóstico por la presencia de otras alteraciones en la misma célula. Un ejemplo lo encontramos con las deleciones de *Ikaros*, en las que su pronóstico parece diferir en función de la presencia o ausencia del cromosoma *Philadelphia* o de las deleciones de *ERG* (77,162,225). Por otro lado, las mutaciones y deleciones de *TP53* confieren mal pronóstico, independientemente del subtipo citogenético de la LAL (240–242). Esclarecer el significado pronóstico de estas alteraciones influirá decisivamente en el diseño de los nuevos protocolos terapéuticos para los pacientes con LAL.

A continuación, se comentan algunos de los genes más relevantes en la patogenia de la LAL-B, con criterios de incidencia y posible valor pronóstico en la enfermedad:

6.3.4.1. Genes de diferenciación linfoide

IKZF1, Ikaros Kruppel Zinc Finger 1

Ikaros es un factor de transcripción que pertenece a la familia de factores de transcripción *Ikaros Kruppel Zinc Finger* (*IKZF*) involucrado en la diferenciación de los linfocitos (243). Este gen es imprescindible para establecer el linaje linfoide a partir de HSC (244). *Ikaros* actúa a nivel del complejo *Nucleosome Remodeling Deacetylase* (*NuRD*) promoviendo la expresión de genes del linaje linfoide al mismo tiempo que reprime la expresión de genes proliferativos, genes del linaje mieloide y de célula *stem* (188,245–248) (Figura 26).

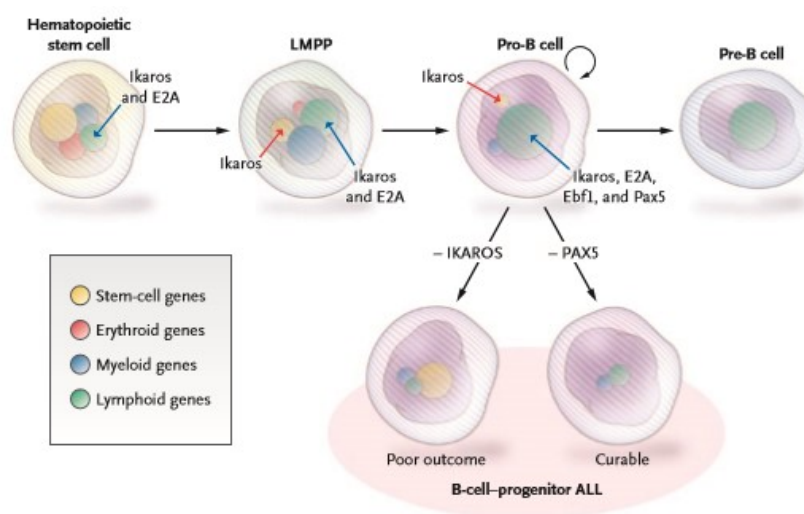


Figura 26. Efecto del gen *Ikaros* en la diferenciación linfoide (249).

Sin embargo, también se han descrito alteraciones del gen IKZF1 en neoplasias del linaje mieloide (250–252). La expresión de este gen es diferente en función del estadio de maduración de los linfocitos y es imprescindible para su correcta maduración (253–258). Los ratones con mutaciones germinales de Ikaros que conllevan infraexpresión del gen o generan isoformas dominantes negativas tienen defectos graves en la hematopoyesis y generan clones pre-leucémicos (84,259–261). Varios trabajos de Georgopoulos y colaboradores han descrito la estructura proteica, los dominios de la proteína y sus funciones mediante mutagénesis dirigida en modelos de ratón (259,260,262,263). Estos trabajos han revelado que los dominios de unión al ADN y de dimerización de la proteína juegan papeles clave en su función (264).

Este gen contiene ocho exones, aunque solo se transcriben siete, ya que el exón 1 contiene el codón de inicio de transcripción, pero el resto del exón no se transcribe. Los exones 4, 5 y 6 codifican para los dedos de unión al ADN de la proteína, responsables de la unión al ADN para promover o reprimir su transcripción. En el exón 8 se encuentran otros dedos de zinc que sirven para que la proteína pueda dimerizar con otras isoformas del gen o de otros miembros de la familia IKZF. De manera natural, el gen IKZF1 regula su función mediante la expresión de diferentes isoformas proteicas. Cuando se transcriben todos los exones del gen, o mejor dicho, cuando se transcriben todos los exones que contienen los dedos de zinc (de unión a ADN y de dimerización) la proteína ejerce sus funciones de manera normal (isoformas largas). La expresión de isoformas cortas con dominio de dimerización, pero sin dedos de unión al ADN, hace que éstas dimericen con las isoformas largas e inhiban su función cuando ya no es requerida. En varios modelos animales se ha sugerido que diferentes isoformas desregulan diferentes rutas metabólicas y que la isoforma dominante negativa Ik6 (sin dedos de unión a ADN pero con dominio de dimerización) es la más deletérea (265,266) (Figura 27).

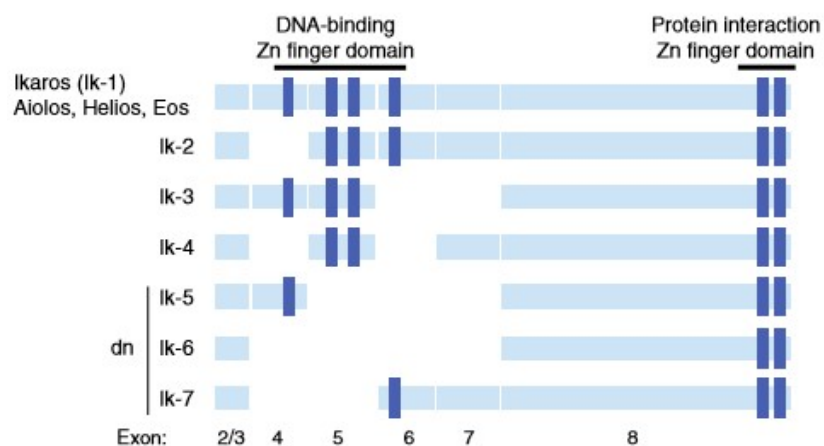


Figura 27. Estructura del gen Ikaros (265).

Este gen se encuentra afectado mayormente por deleciones que pueden afectar al gen entero o pueden afectar a varios exones del gen (deleciones intragénicas). La mayoría de estas deleciones (2/3 partes) causan pérdida de función del gen mientras que la 1/3 restante codifican para la expresión de Iκ6. La frecuencia de deleciones varía según la edad, ya que en niños se observa en un 15%, mientras que en adultos la frecuencia es al menos el doble. Además, se encuentra más frecuentemente alterado en LAL de alto riesgo (LAL Ph+, LAL con hiperleucocitosis, LAL Ph *like*) y sus deleciones se relacionan con resistencia al tratamiento (267–270). En las LAL Ph+, Iκ6 es la isoforma más frecuente de deleción. Por el momento se ha descrito que las deleciones de este gen son un marcador de mal pronóstico en LAL-B a cualquier edad, tanto en pacientes Ph+ como en pacientes Ph negativos. Se podría decir que Ikaros es el marcador pronóstico genético más aceptado a nivel internacional en la LAL-B. Estudios de series numerosas de pacientes pediátricos y adultos tratados homogéneamente y varios metanálisis así lo sugieren (76,271–276). Sin embargo, su impacto pronóstico negativo no está tan claro en pacientes Ph negativos (162,277). Parece ser que cualquier tipo de deleción (de gen entero o de algunos exones) confiere mal pronóstico, pero éste y otros aspectos relacionados con el impacto pronóstico de las alteraciones en este gen está por esclarecer en el seno de ensayos clínicos (185,271,278,279). Este gen también se ve afectado por mutaciones que podrían conferir mal pronóstico, al igual que las deleciones (280).

Se están evaluando diferentes aproximaciones terapéuticas para tratar las LAL con deleción de Ikaros, como inhibidores de FAK, agentes que inducen la expresión del alelo no delecionado en los casos de deleción heterocigota como los retinoides o los inhibidores de CK2 y los inhibidores de HO-1 (Figura 28) (84,281–283).

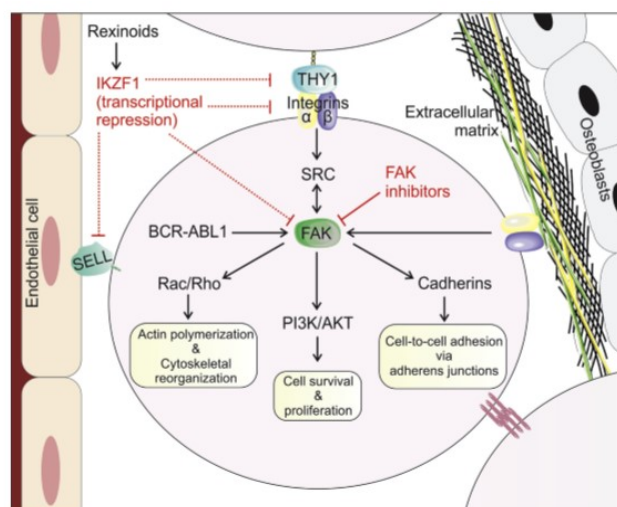


Figura 28. Inhibición de la vía FAK en pacientes con deleción de Ikaros (281).

IKZF2/3/4/5, *Ikaros Kruppel Zinc Finger 2,3,4,5*

Los genes IKZF2 (Helios) e IKZF3 (Aiolos) junto con IKZF4 (Eos) e IKZF5 (Pegasus) también son factores de transcripción de la familia IKZF. Los miembros de la familia IKZF actúan por dímeros de proteínas, pudiendo ser homodímeros o heterodímeros con otros miembros de la familia IKZF (284). Esta familia de factores de transcripción promueve la proliferación y diferenciación de los linfocitos y se cree que estas proteínas podrían tener funciones redundantes o complementarias entre sí (285,286). La expresión más elevada de IKZF2 se da en los CLP (*common lymphoid progenitors*) mientras que la de IKZF3 en precursores linfoides más maduros (287,288). Las deleciones de IKZF2 son muy frecuentes en las LAL con hipodiploidía baja (53%) mientras que las de IKZF3 son más recurrentes en las LAL casi haploides (13%) (45) y su pronóstico es desconocido.

EBF1, *Early B-cell Factor 1*

Tras la expresión de IKZF1, la expresión de EBF1 es esencial para mantener el linaje linfóide de la célula B. EBF1 promueve la expresión de PAX5 y CD79a (237,289–291). Al mismo tiempo EBF1 reprime la expresión de genes que no sean de maduración del linaje linfóide B (CEBPA, Pu.1, ID2, ID3) (292–294). Las deleciones de EBF1 se han descrito en LAL al diagnóstico (10%) aunque su frecuencia podría ser más alta en LAL en recaída, lo que sugiere que estas deleciones confieren resistencia al tratamiento (76,295). Su papel pronóstico está por esclarecer, aunque las deleciones de este gen podrían ser un marcador de mal pronóstico (162,172,279).

PAX5, *Paired Box 5*

Para establecer y mantener el fenotipo B de los linfocitos es imprescindible la expresión de PAX5 (296,297). Este gen se ve afectado por deleciones, mutaciones o translocaciones en el 30% de LAL-B, las cuales comportan la pérdida de función del gen o efectos dominantes negativos (160,194,202,237,298). Estudios en modelos animales demuestran que la desregulación de este gen contribuye activamente al proceso de leucemogénesis (202). Ciertos SNP constitucionales en este gen predisponen significativamente a padecer leucemia. Sin embargo, no parece que las deleciones, mutaciones o translocaciones detectadas en LAL-B tengan significado pronóstico, aunque el grupo británico sugiere que podría ser un marcador de buen pronóstico (162,182,200,271).

RAG1/2, *Recombination Activating Gene 1/2*

La actividad de RAG1 y RAG2 es imprescindible para la maduración de los linfocitos, ya que corta los fragmentos V, D y J para la producción del receptor de célula B (*B Cell Receptor*, BCR) y del receptor de célula T (*T Cell Receptor*, TCR). La actividad aberrante de estos genes parece ser importante en la patogenia de la LAL. En muchas de las deleciones características de la LAL (p.ej. IKZF1), se observan marcas de actividad aberrante de estas proteínas en el punto de corte del ADN (237,299–304). Sin embargo, las deleciones de estos genes también están relacionadas con la leucemogénesis (305). Las deleciones de RAG1 parecen ser más frecuentes en los subgrupos con ETV6-RUNX1 y alta hiperdiploidía y parecen tener más incidencia en la LAL en recaída, hecho que apunta a su posible importancia en la progresión de la leucemia (114).

VPREB1, *Pre-B Lymphocyte 1*

El gen VPREB1 (CD179a) se expresa en estadios tempranos de la diferenciación de las células B (pro-B y early pre-B). Este gen, junto con CD179b, forma una estructura proteica similar a las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas llamada pseudocadena ligera. Esta pseudocadena se une a la cadena pesada de las inmunoglobulinas en el pre-BCR integrado en la membrana plasmática. La expresión de este gen es necesaria para una correcta proliferación y maduración de los linfocitos B, ya que las deleciones de este gen se asocian con agammaglobulinemia (306–308). Este gen se encuentra en 22q11.22 muy cerca del *locus* de la inmunoglobulina *lambda* (IGL). Inicialmente se consideró que estas deleciones eran consecuencia del reordenamiento VDJ de IGL, aunque otros estudios sugieren que no están relacionadas con estos reordenamientos (237,309). Las deleciones de VPREB1 afectan a un 25%-40% de las LAL-B y son más frecuentes en LAL Ph+ (40%), LAL Ph *like* (34%) y LAL ETV6-RUNX1 (40%-70%) (75,309,310). La pérdida de VPREB1 comporta la infraexpresión del gen (309). Algunos estudios han referido que las deleciones de VPREB1 podrían ser un marcador de mal pronóstico (75,224,309).

BLNK, *B-cell Linker*

BLNK es otro gen involucrado en la maduración de los linfocitos B, ya que la infraexpresión de este gen se ha descrito en LAL pre-B (311). Sin embargo, otros autores han referido que el papel de este gen en la patogenia de la LAL es raro o poco relevante (312). Este gen también puede

jugar un papel de supresor de tumores, ya que regula negativamente la vía JAK/STAT (313) (Figura 29).

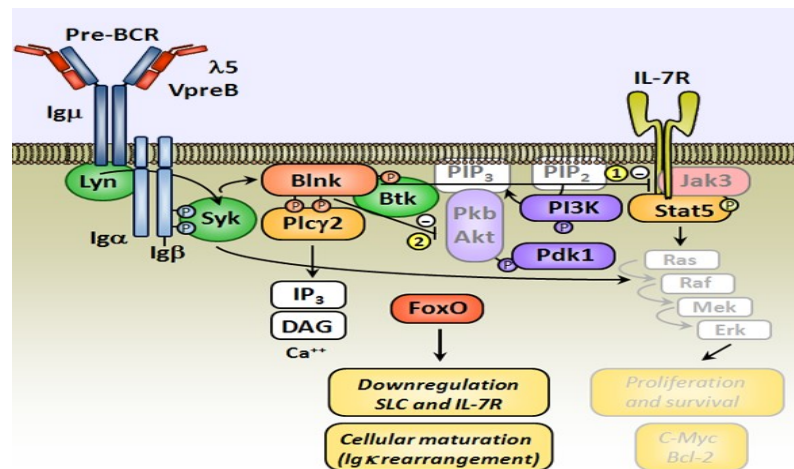


Figura 29. Relación del gen BLNK con la vía JAK-STAT (314).

BTLA/CD200, *B and T Lymphocyte Associated/Cluster of Differentiation 200*

BTLA codifica para una glicoproteína de membrana expresada en linfocitos B y T con funciones inhibitorias en la proliferación celular relacionada con la respuesta inmune (315). La expresión de CD200 es frecuente en la LAL-B y es más intensa en células CD34 positivas de pacientes de LAL-B que en células CD34 negativas (316,317). También es un marcador útil para el seguimiento de EMR (318). Ambos genes se encuentran en 3q13.2, uno al lado del otro.

La codeleción de estos genes está presente en un 5%-10% de las LAL pediátricas y 3% de las LAL del adulto, con más incidencia en las LAL con t(12;21), iAMP21, LAL con síndrome de Down, o LAL en recaída (113,237,270,319,320). Las deleciones de este gen se asocian con ERM+, mayor probabilidad de recaída y menor supervivencia libre de evento (76,113).

LEF1, *Lymphoid Enhancer binding Factor 1*

El gen LEF1 regula la maduración de los linfocitos T, a través de la regulación de la expresión de TCRalpha, pero también de los linfocitos B (321,322). PAX5 promueve la expresión de este gen en células pro-B y luego su expresión se reprime a través del pre-BCR (323,324). LEF1, junto con PAX5 y C-MYC, estimulan la expresión de RAG2 (325). Curiosamente, los ratones LEF1^{-/-} no muestran defectos en la maduración de las células B pero tienen pocas células B debido a la falta de

proliferación y aumento de apoptosis en células pro-B. Este incremento de la apoptosis podría deberse al aumento de la expresión de FAS y C-MYC en estas células. Por el contrario, la inactivación de LEF1 sí que parece detener la maduración de los linfocitos T (326). LEF1 estimula la proliferación celular a través de la vía Wnt (327).

Las deleciones de LEF1 están presentes en un 2% de LAL-B y en un 8% de las LAL-T y las leucemias de fenotipo mixto (237,328). Existen resultados contradictorios en cuanto al impacto pronóstico de la expresión de este gen en LAL, aunque la sobreexpresión de este gen podría ser un marcador de mal pronóstico (329–331).

6.3.4.2. Factores de transcripción hematopoyéticos

ETV6, *ETs Variant 6*

Varios estudios con modelos animales han evidenciado que el gen ETV6 es esencial para el desarrollo embrionario y una correcta hematopoyesis (332). Este gen es necesario para la supervivencia de las HSC en sus nichos hematopoyéticos (333) y también cumple funciones de gen supresor de tumores (334,335). Varios estudios sugieren que ETV6 podría inhibir la vía de RAS (336,337).

Las deleciones de 12p que contienen ETV6 y CDKN1B son un hecho recurrente en varias neoplasias hematológicas (338,339). Las deleciones de ETV6 también son un hecho recurrente en las LAL con t(12;21), ya que en 2/3 de estas LAL, el alelo no translocado de ETV6 está delecionado (340–344). Curiosamente aquellos pacientes con t(12;21) sin deleción del alelo no reordenado de ETV6, muestran infraexpresión del gen, hecho que sugiere que otros mecanismos interfieren en la expresión del alelo no translocado (342). Sin embargo, también existe una proporción significativa de pacientes con deleción de este gen sin reordenamiento ETV6-RUNX1 (162).

A parte de con RUNX1, se han identificado translocaciones de ETV6 con más de 30 genes diferentes, algunas de ellas presentes en la LAL Ph *like* (ETV6-ABL1, ETV6-JAK2 o ETV6-PDGFRB) (160). Los reordenamientos de ETV6 suelen implicar tirosina quinasas, factores de transcripción u otras proteínas. En el primer caso (p.ej. ABL1/2, JAK2, SYK, FLT3, PDGFRA/B, etc.) la translocación mantiene constitutivamente activa la proteína cinasa y estimula la proliferación celular (p.ej. vía STAT). Cuando ETV6 se transloca con factores de transcripción, la proteína de fusión resultante modifica las funciones normales de ETV6 y su *partner*, resultando en la desregulación de la expresión génica de las dianas de ambos genes. Además, también se silencia la expresión del alelo

no translocado (345). Finalmente, en el caso de translocación con otras proteínas, se suele observar sobreexpresión de genes próximos al gen que se ha translocado con ETV6.

Las deleciones de ETV6 podrían jugar un papel en la progresión de la leucemia, aunque parece que no tienen valor pronóstico ni al diagnóstico ni en recaída (62,273,346), si bien algunos estudios sugieren que los pacientes con t(12;21) y deleción del alelo ETV6 no translocado tienen mejor pronóstico que los pacientes sin deleción (347). Por el contrario, otros estudios han reportado resultados opuestos (348).

ERG, *Ets-Related Gene*

ERG codifica para un factor de transcripción esencial para la hematopoyesis y la función de las HSC y su expresión induce proliferación celular y expresión de genes de HSC (349–351). La sobreexpresión de este gen genera clones preleucémicos, está relacionada con resistencia al tratamiento y es un marcador de mal pronóstico en LAL-T y LAM con cariotipo normal (352–356).

Las deleciones de ERG, aunque son infrecuentes (3%-5%), atraen interés en la LAL-B principalmente por su posible impacto pronóstico. Algunos estudios sugieren que las deleciones de ERG inducen un perfil de expresión génica característico y que las deleciones de ERG podrían constituir un nuevo subtipo de LAL-B (224,225). Estos y otros estudios sugieren que el subtipo de LAL-B con deleciones de ERG tiene muy buen pronóstico incluso cuando los pacientes presentan deleciones concomitantes de IKZF1, hecho muy habitual en este subgrupo (224–226,357). Las deleciones de ERG y la expresión de isoformas variantes que reprimen la función de las isoformas canónicas también son muy frecuentes en pacientes con reordenamientos de IGH-DUX4 o ERG-DUX4 (4%-7% LAL-B) (209,220,223).

6.3.4.3. Genes que regulan el ciclo celular

CDKN2A/B, *Cyclin Dependent Kinase iNhibitor 2A/2B*

El gen CDKN2A y el gen CDKN2B están delecionados en muchos tipos de tumores sólidos, así como en la LAL, tanto de precursores T (70%) como de precursores B (30% en todas las LAL-B, 50% en LAL Ph+). Estos genes inhiben la proliferación celular y promueven la apoptosis mediante la inhibición de las ciclinas dependientes de quinasa 4 y 6 (CDK4/6) y la inhibición de HDM2, que

evita la degradación de TP53 (Figura 30). El papel de estos genes en el control del ciclo celular es clave y su desregulación es un hecho recurrente en la LAL (358,359). Las LAL con deleciones de CDKN2A/B cursan con hiperleucocitosis al diagnóstico y tienen valores de ERM durante el tratamiento más elevados que los pacientes sin deleción (360,361). Las muestras de LAL en recaída presentan una alta frecuencia de deleciones de CDKN2A (50%), muchas de ellas en homocigosis (66). Se han publicado muchos estudios que han evaluado el pronóstico de estas deleciones. Algunos han demostrado valor pronóstico solo para las deleciones homocigotas mientras que otros han objetivado valor pronóstico solo en pacientes con LAL Ph+. No existe un consenso sobre el valor pronóstico de las deleciones de estos genes, pero si lo tiene podría ser en pacientes adultos (162,362–377).

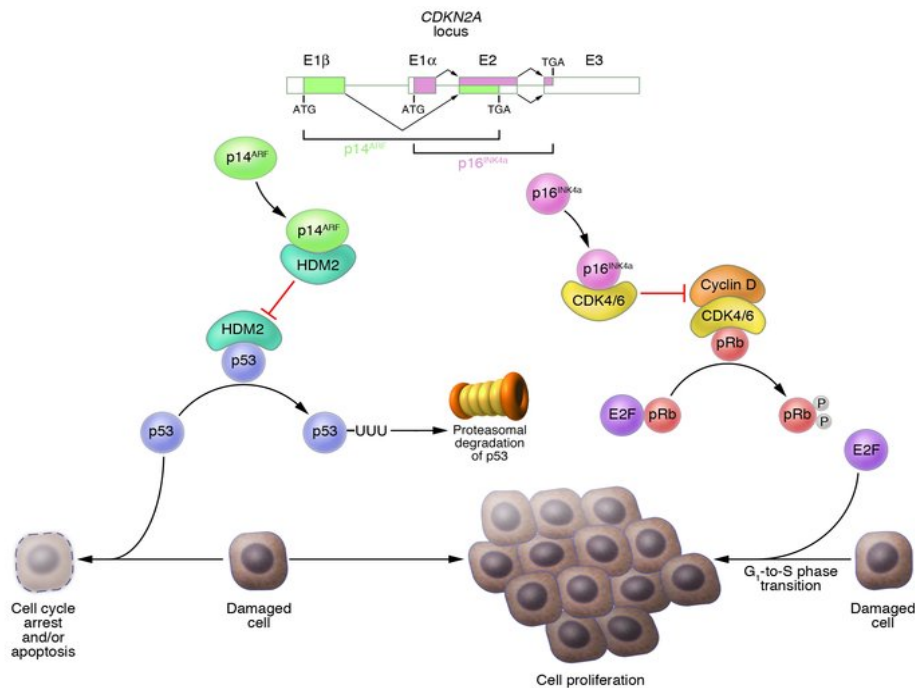


Figura 30. Actividad de los genes CDKN2A, 2B y RB1 en la inhibición de la proliferación celular (378).

RB1, *Retinoblastoma 1*

Este es un gen supresor de tumores que juega un papel importante en el control del ciclo celular (Figura 30) (379). Se encuentra delecionado en un 7%-15% de las LAL-B, en especial en las LAL con iAMP21 (270,380,381). Aunque las deleciones de RB1 son un evento recurrente en la LAL-B, no parecen tener valor pronóstico (76,162,279).

CDKN1B, *Cyclin Dependent Kinase iNhibitor 1B*

El gen CDKN1B (p27) es un inhibidor de las ciclinas dependientes de quinasa CDK2 y CDK4, por lo que regula negativamente el avance del ciclo celular (382,383) (Figura 31). Este gen se encuentra en 12p13.1, muy cerca de ETV6 y BCL2L14. Las deleciones se encuentran en un 15% de las LAL-B pediátricas en el momento del diagnóstico y son frecuentes en los pacientes con t(12;21) (343,384,385). La incidencia de deleción de este gen en el subgrupo t(12;21) parece aumentar en recaída respecto al diagnóstico (37%) y podría ser un marcador de mal pronóstico (343).

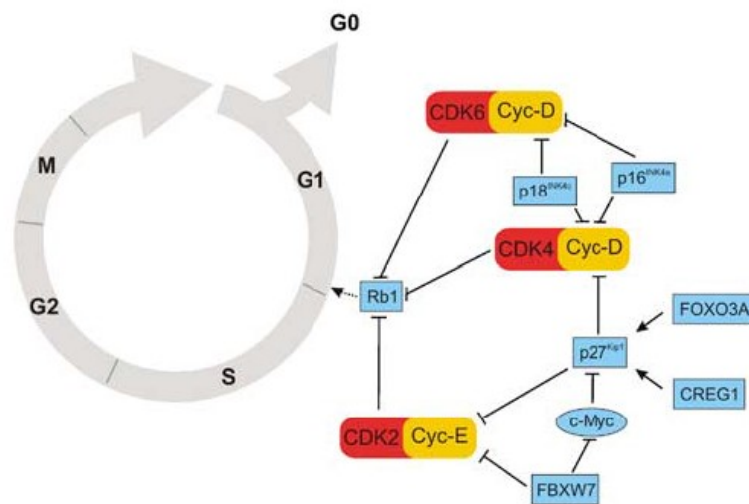


Figura 31. Regulación negativa del ciclo celular por parte de CDKN1B (p27^{KIP1}) (385).

6.3.4.4. Genes proapoptóticos

BTG1, *B-cell Translocation Gene 1*

El gen BTG1 pertenece a la familia de genes BTG/Tob, los cuales tienen funciones antiproliferativas y se ven alterados en diferentes cánceres (386). Las deleciones de este gen están presentes en un 10% de las LAL y parecen ser un poco más frecuentes en LAL Ph+, LAL con ETV6-RUNX1 y LAL con Síndrome de Down (73,320). Algunos estudios sugieren que BTG1 regula la respuesta a glucocorticoides, ya que las células de pacientes de LAL-B con deleción de este gen presentan un mayor índice de proliferación celular y resistencia a prednisona (387).

TP53, Tumor Protein 53

Ya hace años que se especula que las mutaciones de TP53 juegan un papel activo en la progresión de la LAL (388–391). Sin embargo, no ha sido hasta hace pocos años que se ha demostrado que, tanto las mutaciones como las deleciones, tienen un impacto negativo en cohortes de pacientes tratados homogéneamente o en grandes cohortes de pacientes. En muchos casos las deleciones ocurren concomitantemente con mutaciones en el otro alelo del gen (241). Las alteraciones de TP53 se asocian a refractariedad al tratamiento, presencia de recaídas y menor supervivencia global en LAL de todas las edades (240–242,392,393). Las mutaciones y deleciones de TP53 se encuentran en un 10%-20% de las LAL al diagnóstico y en un 6% de las LAL pediátricas en recaída (394). La frecuencia de alteraciones de TP53 se incrementa con la edad (392). También son un rasgo característico de las LAL con hipodiploidía (45). Un hecho relevante es que en la mitad de casos con hipodiploidía, éstas también se encuentran en la línea germinal, lo que sugiere su papel en la etiología y quizás en el pronóstico desfavorable de la enfermedad (45,46).

6.3.4.5. Genes de la vía JAK/STAT

CRLF2, Cytokine Receptor-Like Factor 2

EL gen CRLF2 codifica para el receptor de membrana del TSLP (Thymic Stromal LymphoPoietin) que, junto con IL7R, promueve la proliferación y supervivencia celular de los linfocitos B mediante las vías JAK/STAT y PI3K/mTOR (191,395,396) (Figura 32).

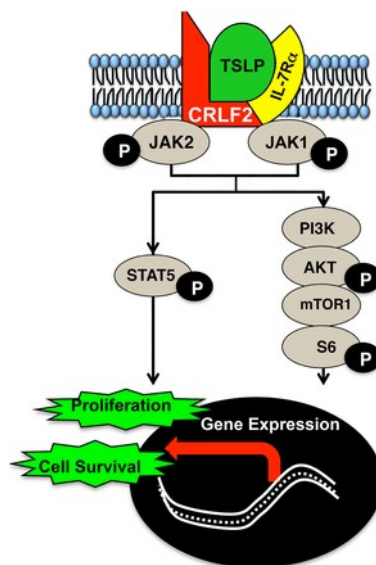


Figura 32. Mecanismo por el cual el gen CRLF2 promueve la proliferación y supervivencia de los linfocitos B (397).

Tal como se ha explicado anteriormente, la sobreexpresión de este gen se da en un 10%-15% de las LAL, se encuentra más frecuentemente en LAL de alto riesgo y se asocia a mutaciones de JAK2, una asociación que hiperactiva aún más la vía JAK/STAT (166–168,398). El valor pronóstico de la sobreexpresión de este gen se ha comentado anteriormente.

IL7R, *InterLeukin 7 Receptor*

El receptor de IL7 es necesario para la maduración de los linfocitos, ya que las mutaciones que implican pérdida de función de este receptor causan inmunodeficiencias (399,400). Este receptor forma un dímero con IL2R para su unión con IL7 o bien forma un dímero con el receptor CRLF2 para el ligando TSLP. La unión del ligando induce la fosforilación de JAK1/2 y la activación de STAT5, lo que estimula la proliferación celular (401,402). Curiosamente, los pacientes con mutación de IL7R tienen significativamente más mutaciones o translocaciones de CRLF2, una cooperación necesaria para mantener hiperactivada la vía JAK/STAT (403). La frecuencia de estas mutaciones es baja en LAL-B (0.7%-2%), aunque es más recurrente en LAL-T (10%) (170,404). La sobreexpresión de IL7R o las mutaciones activadoras podrían comportar mal pronóstico (188). Los pacientes con mutaciones de IL7R y/o CRLF2 podrían ser sensibles al tratamiento con inhibidores de la vía JAK/STAT o inhibidores de bromodominio BET (405–407).

JAK 1/2/3, *JANus Kinase 1,2,3*

La implicación de la familia de las *Janus Kinases* (JAK) en la patogenia de la LAL se describió hace casi 20 años con la identificación de la translocación ETV6-JAK2 (408,409). Sin embargo, no fue hasta 10 años más tarde que se describió en series de pacientes (410) y se evidenció la asociación de mutaciones de JAK (sobre todo JAK2) con LAL con Síndrome de Down (411), translocaciones de CRLF2 (166,167), deleciones de IKZF1 y CDKN2A/B, LAL de alto riesgo y mal pronóstico (224,239,412–414). Las mutaciones de JAK2 están presentes en un 6% de las LAL pediátricas en recaída (394). Las mutaciones de JAK3 se observan en un 6%-12 % de las LAL-T (394,415). Los reordenamientos y mutaciones de JAK2, fuera del codón típico de las neoplasias mieloproliferativas crónicas, son frecuentes en la LAL *Ph like*, por lo que la inhibición de JAK se está evaluando en modelos animales derivados de muestras de pacientes de esta LAL (192,406,416,417). La administración de inhibidores de HSP90 parece ser efectiva para los casos que presentan resistencia a los inhibidores de JAK (193,418).

6.3.4.6. Genes de la vía RAS/RTK

FLT3, Fms-Like Tyrosine kinase 3

FLT3 codifica para un receptor de membrana con actividad tirosínkinasa implicado en la activación de vías de proliferación celular, como PI3K, RAS/MAPK, ERK1/2 y STAT5. La expresión de este receptor es clave para el desarrollo de las HSC, los progenitores de célula B, los progenitores de célula dendrítica y las células NK (419–421). La sobreexpresión de FLT3 y/o la presencia de mutaciones son un rasgo característico de las LAL con reordenamiento de MLL (422). Sin embargo, esta sobreexpresión también se da en otros subtipos de LAL como las LAL early T, LAL *Ph like*, LAL Ph+, LAL con t(12;21) y LAL en recaída y podría tener un impacto pronóstico adverso (99,423–427). El receptor FLT3 y su ligando podrían jugar un papel importante en la resistencia a la quimioterapia (428). La demostración de la importancia que este gen puede tener en el subtipo de LAL con reordenamiento de MLL empezó hace unos 15 años, por lo que se está investigando el papel de la inhibición de este receptor de membrana desde entonces (98,429–432). En la actualidad se están evaluando los inhibidores de FLT3 midostaurina, quizartinib y lestauritinib en LAL refractaria o en recaída (433).

N/KRAS, Neuroblastoma/Kirsten RAt Sarcoma 2 viral oncogene homolog

Las proteínas RAS pertenecen a la familia de proteínas con actividad GTPasa involucradas en la señalización intracelular en respuesta a estímulos externos. Esta cascada de señalización estimula la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis. Sin embargo, las mutaciones RAS activan constitutivamente las proteínas RAS con independencia de las señales extracelulares y comportan una proliferación celular aberrante (434). La implicación de los genes RAS en la génesis de la LAL y de otras neoplasias hematológicas es un hecho bien establecido. Ya en los años 1980 se detectaron mutaciones de KRAS en series de pacientes de LAL (435–437). Las mutaciones de KRAS y NRAS se detectan en un 10%-27% de las LAL pediátricas y parecen ser más frecuentes en casos de LAL con alta hiperdiploidía, LAL con Síndrome de Down, LAL con reordenamiento MLL y LAL early T (124,438–445). Las mutaciones de N/KRAS también están presentes en las LAL *Ph like*, aunque en proporción más baja (232). La mutación de NRAS y KRAS es frecuente en las LAL pediátricas en recaída (20%) (394). La mutación KRAS G12D como evento único podría ser capaz de generar una leucemia, aunque otros autores sugieren lo contrario (446–450). La mutación KRAS G12V se asocia a infiltración del SNC, así como a hiperleucocitosis en modelos de LAL MLL-

AF4 en ratones (451). Las mutaciones de K/NRAS son un marcador de mal pronóstico en LAL infantil con reordenamiento de MLL-AF4 y en LAL-T (426,452,453) y en LAL sin reordenamientos recurrentes recogidos en la clasificación de la OMS (239). Las mutaciones de KRAS y CREBBP se observan recurrentemente en LAL con alta hiperdiploidía en el momento de la recaída, lo que sugiere que la mutación de ambos genes es importante para la progresión de la leucemia (454–456). Los pacientes con mutación de KRAS G12D presentan resistencia a metotrexato pero sensibilidad a vincristina (394). La frecuencia de mutaciones de KRAS es mayor en recaída comparada con el diagnóstico (442,457,458). En la LAL en recaída, las mutaciones de KRAS se encuentran en pacientes con recidiva temprana, afectación del SNC, resistencia al tratamiento y pronóstico adverso (mal pronóstico solo en aquellos pacientes con mutación de KRAS). En la mayoría de casos, las mutaciones de K/NRAS están presentes en varios subclones minoritarios en el momento del diagnóstico, mientras que aparecen en el clon predominante de la recaída (65,427,454,459). Sin embargo, también se han observado cambios de mutación e incluso la desaparición de mutaciones de N/KRAS, presentes al diagnóstico, en la recaída (394). Los inhibidores de MEK, MAPK, PI3K/mTOR, así como TKI muestran actividad antileucémica en pacientes con mutaciones de la vía RAS (239,427,445,460,461).

PTPN11, Protein Tyrosine Phosphatase, Non-receptor type 11

El gen PTPN11 codifica para la proteína tirosín fosfatasa SHP2, la cual activa la vía de las MAP cinasas cuando éstas se activan por la unión de factores de crecimiento y citocinas a sus receptores de membrana (462,463). Este gen se expresa tanto a nivel embrionario, regulando múltiples procesos durante el desarrollo del embrión, como en individuos adultos donde promueve la hematopoyesis de ambos linajes mieloide y linfoide (464,465). Las mutaciones de este gen se encuentran en individuos con el Síndrome de Noonan, el cual está relacionado con una mayor probabilidad de desarrollar leucemias, entre ellas, la LAL. Las mutaciones de este gen son activadoras, se encuentran en un 4%-9% de las LAL-B tanto de adultos como de niños y son más frecuentes en LAL con alta hiperdiploidía y LAL de fenotipo B común (426,438). Estas mutaciones también se observan en muestras de LAL-B en recidiva (65,457). Las mutaciones de PTPN11 podrían tener un impacto pronóstico favorable, aunque otros estudios no han encontrado relación con la evolución de la enfermedad (414,427,439,466).

6.3.4.7. Genes con función epigenética

CREBBP, *cAMP-Response Element Binding protein (CREB)- binding protein*

Este gen codifica para una proteína coactivadora de la transcripción con varias funciones en la regulación de la hematopoyesis. Esta proteína *scaffold* interactúa con varios factores de transcripción y también regula la transcripción mediante la acetilación de histonas (Figura 33) (467,468). Las deleciones y mutaciones (de pérdida de función o que truncan prematuramente la proteína) de CREBBP se han detectado en un 10%-20% de las LAL-B pediátricas en recaída y parecen ser frecuentes en los casos con t(12;21) (115,394). Estas alteraciones podrían tener influencia en la respuesta al tratamiento y en especial a los glucocorticoides. Las mutaciones de CREBBP disminuyen la expresión de los *targets* del gen del receptor de glucocorticoides y parecen conferir resistencia a dexametasona (115). Sin embargo, otros estudios no han observado diferencias en la inducción a apoptosis mediada por glucocorticoides (456). En estudios con muestras pareadas de diagnóstico y recaída se ha constatado que estas alteraciones aparecen *de novo* en recaída en la gran mayoría de casos (115,458,466,469). El pronóstico de las alteraciones de CREBBP parece desfavorable, aunque no todos los estudios presentan los mismos resultados (115,466).

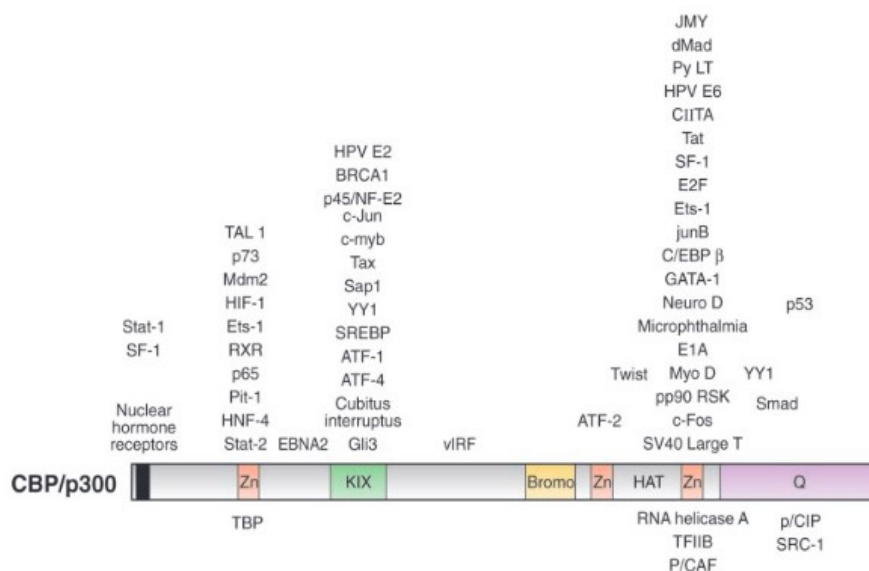


Figura 33. Asociación de CREBBP con proteínas activadoras de la transcripción (parte superior) y factores de transcripción e histona acetiltransferasas (parte inferior) (468).

SETD2, *SET Domain containing 2*

SETD2 codifica para una trimetilasa de la histona H3K36 frecuentemente mutada en tumores infantiles (470). Las mutaciones de SETD2 se observan en un 12% de las LAL-B *de novo* y con más frecuencia en los subtipos MLL reordenado y ETV6-RUNX1 (471). Las mutaciones comportan la pérdida de función del gen en la mayor parte de los casos, lo que sugiere que este es un gen supresor de tumores. La desregulación de SETD2 parece que estimula la proliferación de las HSC (472) (Figura 34). El subtipo early-T también presenta mutaciones y deleciones de SETD2 (441). Sin embargo, la frecuencia de mutaciones de este gen parece ser mayor en LAL en recaída, por lo que podría jugar un papel relevante en la progresión de la leucemia. Las mutaciones de SETD2 suelen ser concomitantes a mutaciones de CREBBP en estos pacientes (458,471).

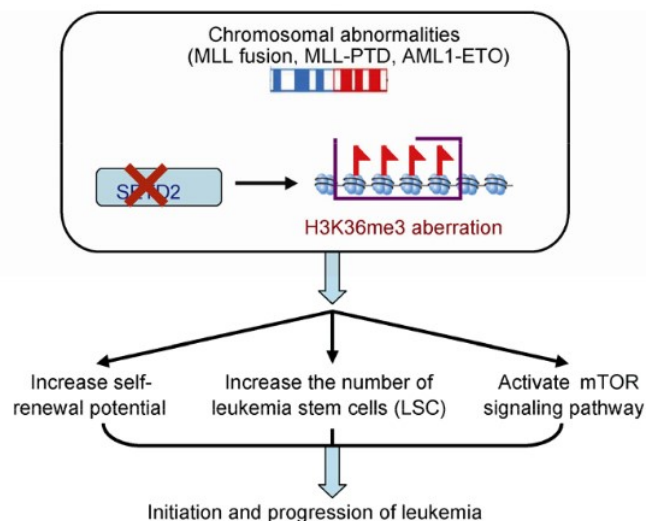


Figura 34. Consecuencias de la inactivación de SETD2 y su contribución en la leucemogénesis (473).

MLL2, *Mixed-Lineage Leukemia 2*

MLL2 (KMT2D) pertenece a la familia de proteínas lisina metiltransferasas MLL. Este gen codifica para una trimetiltransferasa de la histona H3K4 que regula la transcripción de numerosos genes, muchos de ellos implicados en el desarrollo embrionario, como genes de la familia HOX, entre otros (474). Curiosamente, la inactivación de MLL2 parece reducir la potencial tumoral de la línea celular de LMC K562, así como de líneas celulares de cáncer de colon y meduloblastoma (475,476). Las mutaciones de MLL2 se han descrito en tumores sólidos y también son muy

frecuentes en linfoma folicular y LDCGB (470,477). El subtipo LAL early-T presenta una incidencia de mutaciones de MLL2 de aproximadamente el 10% (424). La incidencia de mutaciones en LAL-B pediátrica en recaída es del 5%, siendo el 90% de ellas mutaciones inactivadoras y comportando la infraexpresión del gen (394,478). Las mutaciones de este gen están presentes en un 7%-20% de las LAL-B pediátricas en recaída (455,471).

KDM6A, lysine DeMethylase 6A

KDM6A (UTX) codifica para una demetilasa de la histona H3K27 que actúa junto con MLL2 en el complejo MLL2 H3K4 metiltransferasa. Su implicación en el desarrollo embrionario es importante, ya que mutaciones germinales de este gen causan el Síndrome de Kabuki (479). KDM6A presenta mutaciones inactivadoras en tumores pediátricos y presentes en un ~4% de las LAL-B al diagnóstico (480). Sin embargo, la incidencia de mutaciones de este gen aumenta en recaída (458,471). También se encuentran mutaciones de este gen en las LAL-T (423,479,481,482). Se considera que éste es un gen supresor de tumores, aunque se ha descrito un papel oncogénico en el subtipo TAL1 de LAL- T (483).

6.3.4.8. Genes de metabolismo/resistencia a fármacos

NR3C1, Nuclear Receptor subfamily 3 group C member 1

Varios estudios han revelado que este gen juega un papel clave en la respuesta a glucocorticoides (360). Este gen presenta mutaciones o deleciones en las LAL en recaída (3%), y su papel parece ser relevante especialmente en las LAL hiperdiploides (394,458,484). También se han referido deleciones de este gen en pacientes adultos en el diagnóstico (270). Las deleciones de NR3C1 se asocian a ERM+ y mayor riesgo de segunda recaída en pacientes pediátricos de LAL-B ETV6-RUNX1 en primera recidiva (7,343,360)

NT5C2, 5'-NucleoTidase, Cytosolic II

Codifica la enzima NT5C2, que cataliza la defosforilación (inactivación) de monofosfatos de 6-hidroxipurina entre los que destacan los monofosfatos 6-tioinositol y 6-tioguanosin, moléculas clave en la respuesta a 6-mercaptopurina y 6-tioguanina (485). Las mutaciones de NT5C2 se

adquieren *de novo* con frecuencia en la recaída de la LAL-T (20%), aunque también se han detectado en LAL-B en recaída (3%-10%) (394). En pacientes tratados con esquemas Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) o del Children's Oncology Group (COG) los pacientes con mutación de NT5C2 presentan mayor probabilidad de recaída temprana. En algunos casos, el clon portador de la mutación y responsable de la recaída estaba presente en el momento del diagnóstico en forma de subclon muy minoritario (0.01%). Estudios con cultivos celulares han observado que estas mutaciones confieren refractariedad a 6-mercaptopurina y 6-tioguanina (486–488).

PRPS1, *PhosphoRibosyl Pyrophosphate Synthetase 1*

El gen PRPS1 codifica para un enzima clave para el metabolismo de las tiopurinas (489). La incidencia de mutaciones en este gen es del ~6% de las LAL pediátricas en recaída y su presencia está relacionada con resistencia a entrar en apoptosis inducida por 6-mercaptopurina y 6-tioguanina (488).

6.3.4.9. Genes de reparación del ADN

MSH6, *MutS Homolog 6*

MSH6 pertenece a la familia MutS de genes de reparación del ADN (*Mismatch Repair genes*, MMR genes) (490). El reconocimiento inicial de una base no complementaria lo realizan heterodímeros de MSH2-MSH6 (MutS α) o MSH2-MSH3 (MutS β) (Figura 35). MutS α suele unirse preferentemente a bases no complementarias, así como inserciones o deleciones de 1-2 nucleótidos, mientras que MutS β suele unirse a *loops* en el ADN. La ausencia de MSH2 o MSH6 comporta la acumulación de mutaciones y aparición de neoplasias hematológicas en modelos murinos (491,492). Algunos pacientes con LAL tienen baja expresión de genes de MMR, entre los cuales, MSH6 (493,494). Este gen está delecionado o tiene mutaciones inactivadoras en líneas celulares y en pacientes con LAL-T con pronóstico desfavorable (495,496). Además, las deleciones y mutaciones de este gen aparecen en un 10% de pacientes pediátricos de LAL-B en recaída (295,471).

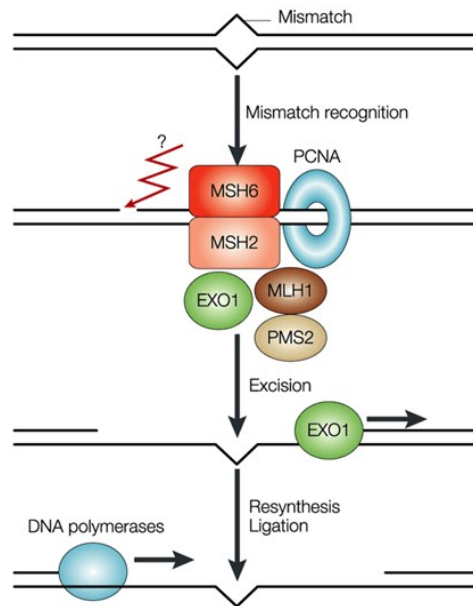


Figura 35. Mecanismo de reparación del DNA por parte de MSH6 (497).

6.4. Cuadro clínico de la LAL

Las manifestaciones clínicas de los enfermos con LAL son el reflejo de la insuficiencia medular causada por la proliferación aberrante de los blastos leucémicos y de la invasión de otros órganos y tejidos por parte de éstos. Aunque cualquier órgano puede estar infiltrado por blastos leucémicos, los órganos con capacidad hematopoyética son los que se ven más frecuentemente afectados. En este sentido, en la LAL pediátrica los pacientes presentan infiltración del hígado, bazo o ganglios linfáticos en un 80%, 70% y 50% de los casos, respectivamente. Alrededor del 10% de los casos hay ensanchamiento del mediastino pudiendo provocar un síndrome de la vena cava superior. Aproximadamente un 5% de los casos presenta infiltración leucémica en el líquido cefalorraquídeo y se manifiesta en forma de parálisis de pares craneales y/o de síndrome de hipertensión intracraneal. Algunos subtipos tienen patrones de infiltración más o menos característicos. La LAL de línea B madura suele cursar con hepatoesplenomegalia de gran tamaño, masa abdominal y afectación del SNC. Otro ejemplo es la LAL-T, que suele cursar con masa mediastínica en más de la mitad de los casos y frecuente infiltración del SNC. La infiltración de otros tejidos como mama, testículos y piel o mucosas es poco frecuente en el momento del diagnóstico, aunque puede constituir la localización inicial de las recaídas.

Dada la agresividad del curso de enfermedad, el tiempo transcurrido desde los primeros síntomas y el diagnóstico de esta neoplasia no suele exceder los 3 meses. Las manifestaciones clínicas más

frecuentes son astenia, anorexia, pérdida de peso, dolores articulares, fiebre y diátesis hemorrágica cutánea o mucosa. En el momento del diagnóstico los pacientes presentar anemia (sin dismorfia de los hematíes), elevada cifra de leucocitos en un 75% de los pacientes (en 15-20% de los casos de LAL los pacientes presentan leucopenia) y plaquetopenia inferior a $50 \times 10^9/L$ en más de la mitad de los casos. Los trastornos bioquímicos más frecuentes son la hiperuricemia, hipocalcemia, hiperfosfatemia, hiperpotasemia y aumento de los valores séricos de LDH. Estas alteraciones suelen estar presentes en casos de LAL con elevado recuento de leucocitos al diagnóstico, visceromegalias o adenopatías y reflejan la intensa actividad metabólica del proceso neoplásico, así como el elevado recambio celular. Un 30% de los pacientes presenta hipogammaglobulinemia.

6.5. Diagnóstico integrado de la LAL

El diagnóstico de LAL se sospecha mediante el examen morfológico del aspirado de médula ósea. El estudio inmunofenotípico permite confirmar el origen linfoide de la población blástica, su fenotipo T o B y, dentro de cada fenotipo, el subtipo inmunológico de LAL. Dicho estudio permite detectar, además, asincronías madurativas o expresión aberrante de determinados marcadores, que servirán para monitorizar la EMR. El estudio citogenético convencional permite conocer si existen alteraciones numéricas y, especialmente, estructurales. El estudio citogenético convencional puede complementarse con la FISH y, de hecho, algunos reordenamientos solo son detectables con esta técnica. Por último, el estudio molecular permite, por una parte, constatar la existencia de reordenamientos específicos (sobre todo genes de fusión) y, por otra, detectar los reordenamientos específicos de los genes de las Ig o del receptor T, que, aparte de constatar la clonalidad, son muy útiles para el estudio de la EMR. Además del estudio de la médula ósea, es obligado el examen del LCR, tras citocentrifugación, para descartar infiltración del SNC. El estudio morfológico puede complementarse con el estudio inmunofenotípico.

La Tabla 2 resume las maniobras diagnósticas de la LAL según las recomendaciones del European Working Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (EWALL) (498).

Proceso diagnóstico	Resultado/subtipo LAL	Recomendación
Morfología		
<ul style="list-style-type: none"> Médula ósea y sangre periférica 	<ul style="list-style-type: none"> Blastos linfoides/indiferenciados ($\geq 20\%$ infiltración medular) 	Obligatorio
<ul style="list-style-type: none"> Líquido cefalorraquídeo 	<ul style="list-style-type: none"> Morfología FAB LAL3 en leucemia de Burkitt Infiltración del SNC 	Recomendado Obligatorio
Citometría de flujo		
<ul style="list-style-type: none"> MPO (diagnóstico diferencial vs LAM) Marcadores de línea B: CD19, CD79a, cCD22 (al menos 2); otros: TdT, CD10, CD20, CD24, cIgM, slg (κ o λ) 	<ul style="list-style-type: none"> MPO negativa; marcadores B/T $> 20\%$ (CD3, CD79a $> 10\%$) LAL-B: Pro-B/B-I (CD19/CD79a/cCD22) Común/B-II (CD10+/cIgM-) Pre-B/B-III (cIgM+/slg-) B madura/B-IV (slg+) 	Obligatorio Obligatorio
<ul style="list-style-type: none"> Marcadores de línea T: cCD3; otros: TdT, CD1a, Cd2, CD5, Cd7, CD4, CD8, TCR α/β o γ/δ 	<ul style="list-style-type: none"> LAL-T: Pro-T/T-I (cCD3/CD7+) Pre-T/T-II (CD2/CD5) T Cortical/T-III (CD1a+) T madura/T-IV (CD3+/CD1a-) 	Obligatorio
<ul style="list-style-type: none"> Marcadores de HSC/mieloides (variable): CD34, CD13, CD33, CD117 		
Citogenética/Biología Molecular		
<ul style="list-style-type: none"> Cariotipo/FISH/RT-PCR 	<ul style="list-style-type: none"> LAL con características clínico-biológicas adversas: Ph+ (rápida detección, terapia con TKI) t(4;11) t(1;19) otros cariotipos de alto riesgo 	Obligatorio
<ul style="list-style-type: none"> CGH/SNP/GEP/NGS 	<ul style="list-style-type: none"> LAL con características clínico-biológicas adversas: LAL Ph-like LAL Early-T NOTCH1/FBXW7 no mutado/RAS/PTEN IKZF1, CRLF2, MLL, TP53, CREBBP, RAS 	Recomendable para nuevos ensayos clínicos
Estudio de ERM		
<ul style="list-style-type: none"> Marcadores de ERM: LAIP (inmunofenotipo/qPCR) 	<ul style="list-style-type: none"> Clasificación del riesgo según el valor de ERM 	Obligatorio
Conservación de material diagnóstico		
<ul style="list-style-type: none"> Criopreservación celular/DNA/RNA/proteínas 	<ul style="list-style-type: none"> Otros/futuros estudios 	Muy recomendable
Tipaje HLA		
<ul style="list-style-type: none"> Paciente/hermanos 	<ul style="list-style-type: none"> Posible TPH 	Recomendable
<p>LAL, leucemia aguda linfoblástica; SNC, sistema nervioso central; MPO, mieloperoxidasa; LAM, leucemia aguda mieloide; c, citoplasmático; IgM, inmunoglobulina M; s, superficie; Ig, inmunoglobulinas; FISH, <i>fluorescence in situ hybridization</i>; RT-PCR, <i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>; Ph+, <i>Philadelphia-positive</i>; TKI, <i>tyrosine kinase inhibitor</i>; CGH, <i>comparative genomic hybridization</i>; SNP, <i>single nucleotide polymorphism</i>; GEP, <i>gene expression profiling</i>; NGS, <i>next generation sequencing</i>; Ph, <i>Philadelphia</i>; LAL-T, LAL de precursores T; EMR, enfermedad mínima residual; LAIP, inmunofenotipo asociado a leucemia/qPCR; PCR, <i>polymerase chain reaction</i>; HLA, <i>human leucocyte antigen</i>; TPH, trasplante de progenitores hematopoyéticos.</p>		

Tabla 2. Principales pruebas para el diagnóstico de la LAL propuestas por el grupo EWALL (498).

6.6. Pronóstico

La experiencia médica y de laboratorio a lo largo de los años ha evidenciado que diferentes factores pronósticos son útiles para predecir la evolución de la enfermedad de cada paciente. En base a estos factores se diseñan los protocolos de tratamiento y se estratifica a los pacientes en los protocolos en función del riesgo de su enfermedad. En la LAL pediátrica existen protocolos de LAL de bajo riesgo, riesgo estándar y alto riesgo. En la LAL del adulto los pacientes se estratifican

en protocolos de riesgo estándar y alto riesgo. La tendencia en el tratamiento de la leucemia es la de ofrecer tratamientos cada vez más específicos para cada paciente. Los factores que se enumerarán a continuación son las bases hacia una terapia personalizada que tiene en cuenta las características basales de cada paciente, así como las características genéticas y fenotípicas de la leucemia que padece. Es probable que, gracias a las nuevas tecnologías de diagnóstico e investigación, el listado de factores pronósticos de la LAL se amplíe a corto plazo.

6.6.1. Factores pronósticos del propio paciente

Edad

Se podría considerar que la edad es el factor pronóstico más determinante en la LAL. Solo cabe ver las diferencias de supervivencia por grupos de edad: 80-90% en LAL pediátrica, ~70% en adolescentes y adultos jóvenes, ~50% en adultos y <10% en la población mayor de 70 años (Figura 36) (498). Las diferencias de supervivencia en función de la edad han estado presentes desde los primeros protocolos asistenciales hasta la actualidad. Recientemente han aparecido nuevos marcadores pronósticos en la LAL basados en hallazgos moleculares o detección de enfermedad residual. Sin embargo, la edad sigue siendo un factor pronóstico independiente de otras variables. La edad está íntimamente relacionada con la tolerancia (o la toxicidad) al tratamiento. Es decir, la mayor tolerancia a altas dosis de quimioterapia en edades jóvenes frente a edades más avanzadas es un factor clave que explica en buena parte las diferencias de supervivencia entre diferentes grupos de edad. Las toxicidades hematológicas y no hematológicas del tratamiento pueden llevar a la suspensión o retraso del mismo, hechos que indudablemente comprometen el pronóstico del paciente (499). En la actualidad todos los protocolos asistenciales tienen en cuenta la edad en su diseño. De este modo encontramos protocolos adaptados al riesgo en función de la edad para las siguientes poblaciones: lactantes (<1 año), niños (1-15 años), adolescentes y adultos jóvenes (15/18-35/40 años), adultos (35/40-55/60 años), adultos de edad avanzada (>55/60 años) y adultos frágiles (>70/75 años).

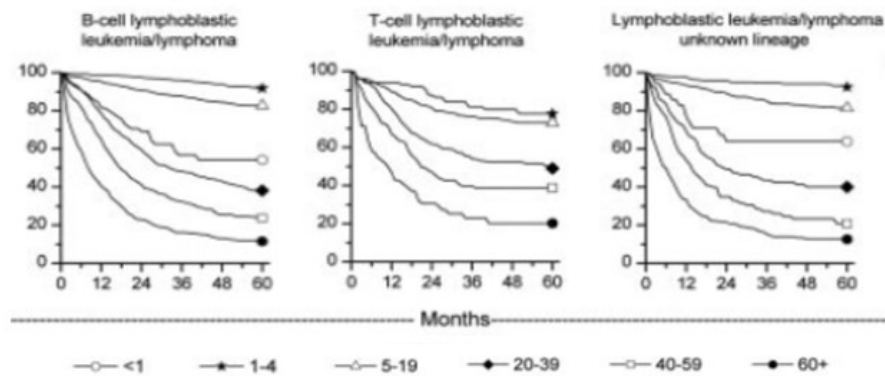


Figura 36. Supervivencia global en función de la edad en pacientes con LAL (500).

Estado general del paciente

El estado general del paciente se mide según los criterios definidos en el índice ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*). El grado de afectación del estado general del paciente en el momento del diagnóstico, así como durante el tratamiento, es otro factor pronóstico importante. Al diagnóstico, los pacientes con afectación de otros órganos y sistemas, como cardíaca, hepática y renal, entre otras, pueden ver condicionado su tratamiento bien sea por imposibilidad de recibir un fármaco o por la administración del fármaco a dosis más bajas. Las toxicidades durante el tratamiento también pueden comprometer la calidad de vida del paciente y comprometer su adherencia al mismo (501).

6.6.2. Factores pronóstico de la enfermedad

Número de leucocitos al diagnóstico

El número de leucocitos en el momento del diagnóstico es un indicador de la carga tumoral y de la capacidad proliferativa de la leucemia. En este sentido, numerosos estudios han demostrado que los pacientes adultos con LAL-B con una cifra de leucocitos superior a $30 \times 10^9/L$ o los pacientes de LAL-T con más de 100×10^9 leucocitos/L tienen un pronóstico significativamente peor que los pacientes con cifras inferiores (61,502). En consecuencia, los pacientes con cifras superiores a las mencionadas se consideran de alto riesgo.

Inmunofenotipo

Como se ha comentado anteriormente, el grado de inmadurez de los blastos leucémicos podría relacionarse con un pronóstico adverso. La última guía de expertos de la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO) recomienda la determinación inmunofenotípica de la LAL para detectar inmunofenotipos de alto riesgo como el pro-B o el *early T* (498).

Cariotipo

Los pacientes con cariotipo ETV6-RUNX1 o alta hiperdiploidía se consideran de buen pronóstico y por tanto se tratan con protocolos de riesgo estándar, mientras que los pacientes con LAL Ph+ o con reordenamiento de MLL se consideran de alto riesgo. Los pacientes con LAL con iAMP21, cariotipo complejo, -7, del(17p), del(6q) o hipodiploidía baja/casi triploidía, entre otras, también se consideran de riesgo elevado (498).

Infiltración del sistema nervioso central

La presencia de blastos leucémicos en el líquido cefalorraquídeo se da en un 5% de las LAL y se había considerado clásicamente como un factor de mal pronóstico en todas las edades. Sin embargo, con las modernas pautas de tratamiento ha perdido su significado adverso. Ello se debe a la inclusión, junto al tratamiento intratecal, de quimioterapia con fármacos a altas dosis, como el metotrexato, capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (503–505).

6.6.3. Factores pronósticos de respuesta al tratamiento

En la actualidad, los factores pronósticos comentados anteriormente determinan la inclusión de pacientes en protocolos de bajo, intermedio o alto riesgo de manera provisional. Sin embargo, la respuesta al tratamiento puede comportar variaciones en el protocolo o la inclusión en un protocolo asistencial diferente. La evaluación de la respuesta al tratamiento es altamente informativa incluso en etapas iniciales de éste. La morfología de médula ósea tras la prefase con prednisona o entre los días 8 y 15 de inicio del tratamiento de inducción ofrece información valiosa para predecir la respuesta al tratamiento posterior. Asimismo, la rapidez con que se obtiene la remisión completa constituye un factor pronóstico de primer orden (506).

Las técnicas de monitorización de la enfermedad residual mínima (ERM) han supuesto una revolución en el tratamiento de la LAL y de las demás neoplasias hematológicas (507). Los valores de ERM durante el tratamiento son un reflejo de la cantidad de tumor residual presente en el paciente y permiten predecir la posibilidad de recaída. El valor pronóstico de los valores de ERM durante el tratamiento es tan importante, que constituye el único factor pronóstico en algunos estudios (508,509). En la actualidad todos los protocolos terapéuticos en LAL tienen en cuenta los valores de ERM en determinados momentos del tratamiento para la toma de decisiones (5,498). El valor de 10^{-4} (0.01%) o inferior es el utilizado a nivel internacional para definir la remisión molecular (498) (Tabla 3). De este modo, los pacientes con un valor de $ERM > 0.01\%$ tienen una ERM positiva (ERM+), mientras que los pacientes con $ERM < 0.01\%$ tienen ERM negativa (ERM-).

Terminología	Definición
Respuesta Completa Hematológica	<ul style="list-style-type: none"> • Células leucémicas no detectables en MO, SP, LCR (<5% blastos) por microscopía
Respuesta Completa Molecular/ERM-	<ul style="list-style-type: none"> • Paciente en Respuesta Completa Hematológica • ERM no detectable por qPCR (sensibilidad $\geq 10^{-4}$)
Respuesta Molecular/ERM+, menos que CRMol	<ul style="list-style-type: none"> • Paciente en Respuesta Completa Hematológica, no en CRMol • ERM no cuantificable ($< 10^{-4}/0.01\%$) por qPCR • Detectable mediante citometría de flujo 8-12 colores
Fallo Molecular/ERM+	<ul style="list-style-type: none"> • Paciente en Respuesta Completa Hematológica, no en Respuesta Completa Molecular/Respuesta Molecular • ERM cuantificable mediante qPCR ($\geq 10^{-4}/0.01\%$) • Detectable por citometría de flujo convencional
Recaída Molecular	<ul style="list-style-type: none"> • Paciente todavía en Respuesta Completa Hematológica, habiendo alcanzado previamente Respuesta Completa Molecular/Respuesta Molecular • Pérdida de Respuesta Completa Molecular/Respuesta Molecular ($\geq 10^{-4}/0.01\%$) • Detectable por citometría de flujo convencional
Recaída	<ul style="list-style-type: none"> • Pérdida de Respuesta Completa Hematológica • Recaída Hematológica (>5% blastos en MO) • Recaída extramedular (SNC, otro tejido)

ERM, enfermedad residual mínima; MO, médula ósea; SP, sangre periférica; LCR, líquido cefalorraquídeo; qPCR, PCR cuantitativa; SNC, sistema nervioso central.

Tabla 3. Definiciones de respuesta al tratamiento en función del valor de la ERM. Recomendaciones de las guías ESMO (498).

Varios estudios han demostrado que los pacientes con ERM positiva tienen significativamente más probabilidades de recaída que los pacientes con ERM negativa (508–510). Sin embargo, alrededor del 30% de los pacientes, sobre todo adultos, con ERM negativa al final de la fase de consolidación experimentan una recaída de la leucemia (511). Ello podría deberse a que el dintel de 10^{-4} no es lo suficientemente fiable para predecir la progresión de la LAL, o bien que los

métodos estándar de monitorización de ERM tienen limitaciones para medir la selección clonal que induce el tratamiento.

La monitorización de la ERM por citometría de flujo se basa en el análisis del número de células con un fenotipo aberrante (asincrónico o de expresión de marcadores de linaje mieloide) en las muestras de seguimiento. La sensibilidad de esta técnica depende del número de eventos que se cuentan en cada determinación, pudiendo llegar a una sensibilidad de 10^{-5} - 10^{-6} con los modernos protocolos (54). Las técnicas basadas en PCR cuantitativa miden la cantidad de reordenamientos de los genes de las inmunoglobulinas (IGH, IGK, IGL) en muestras de pacientes de LAL-B o de los genes del receptor de célula T (TCRG, TCRD, TCRB, TCRA) para los pacientes con LAL-T (512). La cuantificación por PCR también se aplica en la monitorización de genes de fusión tales como BCR-ABL1 en las LAL Ph+ o MLL-AF4 en las LAL pro-B. La sensibilidad de esta técnica es de 10^{-5} . La detección cualitativa de estos genes de fusión puede llegar hasta 10^{-6} mediante *nested* PCR. Actualmente se está investigando la utilidad de la secuenciación de nueva generación o *next generation sequencing* en la determinación de la ERM en diferentes neoplasias hematológicas, entre ellas la LAL (513–515).

6.7. Tratamiento

Protocolos de tratamiento

En la actualidad existen 2 grandes líneas de quimioterapia empleadas por la comunidad internacional en el tratamiento de la LAL del adulto. Las pautas derivadas del grupo pediátrico BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) son las más empleadas en Europa, mientras que en algunos centros de Estados Unidos y otras partes del mundo se usa más la pauta *hyper-CVAD* (*hyperfractionated cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, dexamethasone*). Las pautas tipo BFM contiene 2 bloques de inducción y varios ciclos de consolidación y en algunos casos se administra un ciclo de inducción adicional o reinducción al final de la consolidación. El esquema *hyper-CVAD* alterna ciclos con ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina y dexametasona con otros con metotrexato y citarabina a altas dosis, hasta completar 8 ciclos, seguidos de mantenimiento con la pauta POMP (*6-mercaptopurine (Purinethol), vincristine (Oncovin), methotrexate, prednisone*).

En España, los pacientes con LAL infantil se tratan según los protocolos conjuntos de los grupos cooperativos SEHOP (Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica) y PETHEMA

(Programa Español de Tratamientos en Hematología), basados en el esquema BFM, mientras que en los adultos se emplean protocolos adaptados al riesgo del grupo PETHEMA (Figura 37). Los protocolos se diseñan teniendo en cuenta el subtipo de LAL y el riesgo de recidiva de cada leucemia, por lo que presentan variaciones en los fármacos y las dosis. A grandes rasgos, el tratamiento de la LAL se basa en varios bloques de quimioterapia (inducción y consolidación) que finalizan con la realización o no de un TPH (preferentemente alogénico) en función del riesgo de recaída de la leucemia.

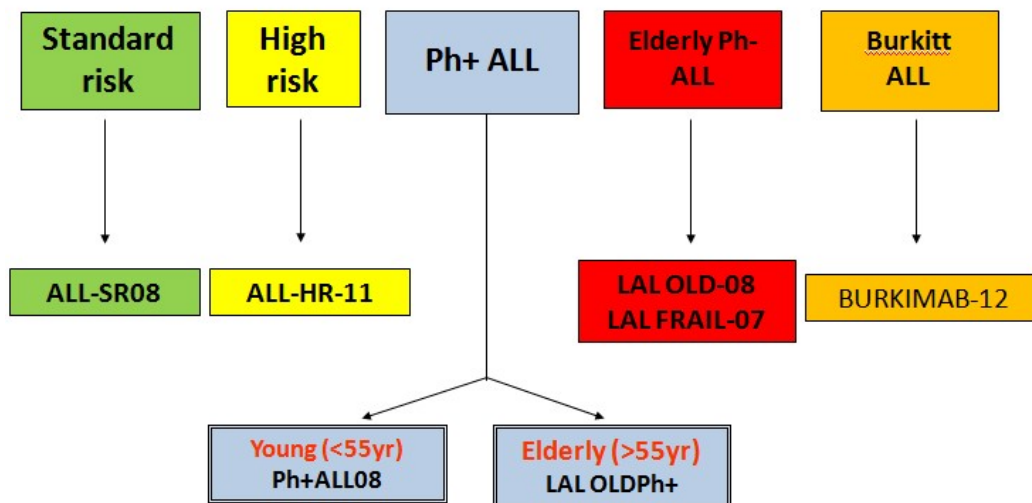


Figura 37. Principales protocolos de tratamiento de la LAL de novo del grupo PETHEMA.

6.7.1. Pre-fase

Los grupos cooperativos recomiendan realizar una pre-fase antes de iniciar el tratamiento de quimioterapia convencional, sobretodo en pacientes con hiperleucocitosis al diagnóstico. La pre-fase se basa en el uso de glucocorticoides como prednisona a dosis de 20-60 mg o dexametasona a dosis de 6-16 mg al día por vía oral o intravenosa. En algunos protocolos se administra la primera dosis de terapia intratecal. El objetivo de la pre-fase es doble: por un lado, reducir la masa tumoral de manera segura y evitar así el síndrome de lisis tumoral y, por otro, dar tiempo a la caracterización genética y molecular de la LAL para administrar un tratamiento más específico. El grado de respuesta a la pre-fase es un reflejo de la quimiosensibilidad de la leucemia y constituye un factor predictivo de la respuesta al tratamiento posterior (506,516).

6.7.2. Inducción a la remisión:

El tratamiento de inducción consiste en administrar quimioterapia para alcanzar una respuesta completa en un plazo de 4 o 5 semanas. Alcanzar la respuesta o remisión completa implica eliminar los signos clínicos y síntomas de la enfermedad, normalizar los valores del hemograma y presentar menos de 5% de blastos leucémicos en médula ósea. Los pacientes con una ERM- al final de la inducción gozan de mayores probabilidades de supervivencia que los pacientes con ERM+ (498,507).

Las pautas de inducción están constituidas por un glucocorticoide (prednisona, prednisolona o dexametasona), vincristina, asparaginasa y un antraciclínico (habitualmente daunorrubicina). Algunos protocolos dirigidos a LAL de alto riesgo añaden ciclofosfamida, metotrexato, arabinósido de citosina (Ara-C) o etopósido. Para la profilaxis del SNC se administran 1 o 2 dosis intratecales de metotrexato solo o asociado a Ara-C e hidrocortisona. Los protocolos de inducción actuales muestran unas tasas de remisión completa del 95%-100% en niños y del 80%-90% en adultos. La mortalidad en inducción es relativamente baja (1% en niños y 6%-10% en adultos) y se debe principalmente a infecciones.

6.7.3. Consolidación o Intensificación

La consolidación se inicia inmediatamente después de alcanzar la remisión completa y tiene la finalidad de eliminar la enfermedad residual. La intensidad y la duración del tratamiento están ajustadas en función del riesgo de recidiva de cada LAL en los diferentes protocolos asistenciales. En los pacientes de riesgo bajo e intermedio se administran 3 o 4 ciclos de antimetabolitos como metotrexato a dosis altas (2-5 g/m²) y en ocasiones se intercala con dosis intermedias (1g/m²) de AraC. La administración de altas dosis de metotrexato o de asparaginasa y antraciclinas de forma intensiva ha hecho mejorar significativamente el pronóstico de las LAL-T (históricamente peor que el de la LAL-B) hasta alcanzar el mismo pronóstico que el de las LAL-B. A continuación, se puede administrar un tratamiento similar al de la inducción llamado reinducción o consolidación tardía. En los pacientes de alto riesgo se administran entre 3 y 6 ciclos de metotrexato y Ara-C altas dosis junto a citostáticos usados en la inducción. La duración de la terapia de consolidación dura entre 3 y 4 meses.

En este punto del tratamiento el valor de la ERM adquiere una importancia capital, ya que en los protocolos modernos determina aquellos pacientes candidatos a recibir un TPH tras acabar la

consolidación. Pese a que existe un intenso debate acerca de qué pacientes deben recibir un TPH tras el tratamiento de consolidación, varios estudios han demostrado el beneficio de las decisiones terapéuticas tomadas a partir de los valores de ERM. Los pacientes con LAL de riesgo estándar que tienen una EMR+ al final de la consolidación tienen un alto riesgo de recaída a no ser que reciban un TPH (517). Por el contrario, los pacientes de riesgo intermedio con ERM- que no reciben un TPH tienen unas tasas de recaída realmente bajas (518). En pacientes de LAL de alto riesgo, la decisión de no trasplantar a los pacientes con ERM- es más arriesgada. Sin embargo, los resultados de protocolos recientes sugieren que los pacientes de alto riesgo con ERM- tras la consolidación se podrían beneficiar de quimioterapia de mantenimiento en vez de recibir un TPH (evitando así la mortalidad debida al trasplante) (5,519). Para los pacientes alto riesgo con ERM+ tras la consolidación, el TPH es la única terapia potencialmente curativa (14).

6.7.4. Mantenimiento

En el tratamiento de mantenimiento se administran dosis diarias de mercaptopurina junto con dosis semanales de metotrexato durante un periodo de 18 a 24 meses dependiendo de la duración de las terapias de inducción y consolidación. En algunos protocolos se utilizan tratamientos cortos de refuerzo de fármacos utilizados en la inducción como prednisona y vincristina y, en ocasiones, asparaginasa.

6.7.5. Profilaxis de la leucemia en el sistema nervioso central (SNC)

La irradiación corporal total se ha sustituido gradualmente por la administración intratecal de quimioterapia y altas dosis de metotrexato por vía intravenosa. La quimioterapia intratecal se inicia en la fase de inducción y también se administra durante la consolidación y mantenimiento. En los pacientes de bajo riesgo se administran 10-12 dosis de triple terapia intratecal (metotrexato, Ara-C e hidrocortisona) durante los primeros 6 meses. Los pacientes de riesgo intermedio y alto reciben un mínimo de 14 dosis junto con altas dosis de metotrexato por vía intravenosa.

6.7.6. Duración del tratamiento y resultados

El tratamiento de la LAL dura aproximadamente entre 2 y 3 años, a excepción de la LAL de Burkitt en las que el tratamiento dura aproximadamente medio año. Los protocolos de tratamiento actuales muestran una probabilidad de supervivencia libre de enfermedad del 85%-95% en niños con LAL de bajo riesgo, 75%-85% en riesgo intermedio y 60%-65% en alto riesgo. Los pacientes adultos de riesgo intermedio tienen una probabilidad de supervivencia del 60%-70% mientras que la de los de alto riesgo es aproximadamente del 40%.

6.7.7. Tratamiento de la LAL en recaída

La LAL en recaída sigue siendo un desafío terapéutico. Un 15%-30% de los niños y aproximadamente la mitad de los adultos presentan una recaída de la enfermedad. La cinética de la recaída está relacionada con el pronóstico. Las recaídas que ocurren antes de los 6 primeros meses después de acabar el tratamiento (recaídas tempranas) o durante el tratamiento activo tienen peor pronóstico que las que suceden pasados los 6 meses de la suspensión del tratamiento (11). En recaídas tempranas se pueden alcanzar tasas de remisión completa en el 60%-70% de los niños y en un 30%-40% de los adultos tanto si se usan pautas similares a las recibidas en inducción como pautas diseñadas para tratar las recaídas. Tras la remisión o después de una consolidación de corta duración se debe realizar un TPH alogénico. Si la recidiva es aislada en el SNC se administra el tratamiento mencionado junto con repetidas dosis de terapia intratecal. Si las recaídas medulares ocurren pasados los primeros 6 meses desde el cese del tratamiento, se pueden alcanzar remisiones completas en un 80%-90% de los niños y en un 50%-60% de los adultos. En estos últimos debe efectuarse un TPH alogénico, mientras que ello es más discutible en los niños. Con esta aproximación se consiguen supervivencias del 40%-50% en niños. En LAL del adulto en recaída, tanto precoz como tardía, el TPH es la única opción para consolidar el tratamiento de rescate, aunque sólo se alcanzan remisiones prolongadas en un 20% de los casos (13,14).

No existe un esquema de quimioterapia de rescate aceptado internacionalmente, aunque FLAG-IDA (fludarabina, Ara-C a altas dosis, G-CSF e idarubicina) seguido de un TPH es la aproximación más utilizada en Europa para la LAL del adulto en recaída (520). Otros esquemas basados en altas dosis de clofarabina y que incluyen citarabina, ciclofosfamida o etopósido se utilizan en base a la

experiencia pediátrica (521). El uso de vincristina liposomal ofrece tasas de remisión completa del 20% (522), mientras que nelarabina muestra tasas de remisión completa del 36% en LAL-T (523).

Dado que los esquemas de quimioterapia de rescate se basan en repetir pautas de quimioterapia similares a las usadas en el diagnóstico, es razonable pensar que se necesitan tratamientos con un mecanismo de acción diferente para alcanzar la remisión completa de nuevo. Por tanto, probablemente la mejor opción para alcanzar la respuesta completa (para llegar al TPH) de los pacientes en recaída es su inclusión en ensayos clínicos con fármacos con nuevos mecanismos de acción o con terapia celular. En este sentido cabe citar los resultados más favorables que se han logrado con inmunoterapia, ya sea con anticuerpos monoclonales o con linfocitos T genéticamente modificados (células T CAR) (ver más adelante).

6.7.8. Trasplante de progenitores hematopoyéticos

La mejora de los resultados de los esquemas de quimioterapia junto a la reducción de los riesgos intrínsecos del TPH y al aumento de la disponibilidad de fuentes de TPH contribuye a que no exista unanimidad en el uso del TPH en la LAL. Algunos grupos tienen más tendencia a trasplantar a todos los pacientes, mientras que otros opinan que el TPH debe restringirse a casos de LAL alto riesgo. Existe unanimidad en que el TPH está indicado en los pacientes que no obtienen la remisión completa y en los pacientes en recaída. La indicación de TPH también se da en pacientes que presentan alteraciones citogenéticas de alto riesgo como la LAL Ph+ o la LAL con reordenamiento MLL-AF4 una vez alcanzan la primera remisión completa (13,524). En la práctica clínica actual, la decisión de trasplantar o no a un paciente depende cada vez más del valor de la EMR al final de la consolidación. La tendencia actual es la de trasplantar cada vez menos (sobre todo en LAL infantil) y administrar terapia de mantenimiento a aquellos pacientes que alcanzan la remisión molecular (ERM-), y realizar el TPH en casos con citogenética de alto riesgo (independientemente del valor de ERM), LAL con ERM+ o en pacientes que sufren una recaída.

La fuente de progenitores hematopoyéticos preferible es la de una donante familiar histocompatible, aunque estudios recientes han demostrado resultados muy similares cuando el donante no es familiar (525–527). Los trasplantes de donante familiar haploidéntico están ofreciendo resultados prometedores, por lo que su práctica está aumentando de forma notoria (528,529). En la pauta de acondicionamiento, la irradiación corporal total puede ofrecer resultados más favorables en cuanto a la supervivencia libre de evento. El acondicionamiento

mieloablato es el preferido, aunque en pacientes no candidatos a éste se puede efectuar un acondicionamiento de intensidad reducida. La realización de trasplantes autólogos en LAL ha caído en desuso debido a la elevada tasa de recaídas post-trasplante (aprox. 60%) (530–533). Sin embargo, algunos estudios sugieren que podría tener un papel en la LAL Ph+ (524,534,535).

6.7.9. Subtipos de LAL con aproximaciones terapéuticas específicas

LAL Ph+

Hasta la aparición de los TKI, la LAL Ph+ tenía un pronóstico muy desfavorable en todas las edades (10%-20%). La mejora del pronóstico de estos pacientes con la administración de TKI en combinación con quimioterapia es incuestionable (79,536,537). Tanto es así que en la actualidad existe un interesante debate acerca de si se tienen que reducir las dosis de quimioterapia convencional en el tratamiento de la LAL Ph+ y basar el tratamiento en TKI principalmente, al menos en ciertos subgrupos de pacientes (82,524,538). Con los protocolos actuales se alcanzan tasas de remisión completa del 95%-100% y una supervivencia libre de evento en adultos del 40%-60%. Se recomienda trasplantar a los pacientes adultos jóvenes al final de la consolidación y es una práctica bastante común administrar terapia de mantenimiento con TKI post-trasplante (539). En adultos de edad de avanzada las perspectivas de curación son más limitadas ya que muchos de estos pacientes no son candidatos a recibir un TPH y presentan una elevada tasa de recaídas (540).

En la LAL Ph+ las recaídas suelen estar relacionadas con mutaciones en el dominio kinasa de ABL1, el cual constituye el lugar de unión de los TKI. Estas mutaciones implican cambios de aminoácidos que comportan una modificación espacial de la proteína, la cual impide la unión del inhibidor a la oncoproteína. Se han descrito muchas mutaciones puntuales en este dominio, que implican diversos grados de resistencia a los diferentes TKI. La mutación T315I está presente en más del 40% de las LAL Ph+ en recaída (541). Desgraciadamente, es la mutación más refractaria a los TKI aunque se han observado respuestas en un 40% de pacientes tratados con ponatinib (542,543). Además, estudios más recientes han evidenciado que la eficacia de los TKI se ve muy reducida en casos de pacientes que tienen más de una mutación en el dominio kinasa (mutaciones combinadas)(544). El cambio de TKI (asociado a quimioterapia de rescate) o la inclusión en ensayos clínicos con el objetivo de alcanzar una nueva remisión completa como puente al TPH

parece ser la única opción terapéutica para los pacientes con LAL Ph+ en recaída. La inmunoterapia puede ser una opción prometedora en esta situación.

LAL con reordenamiento MLL-AF4

Este subtipo de LAL es el mayoritario en la LAL del lactante y se asocia a mal pronóstico. El tratamiento más extendido se basa en quimioterapia con altas dosis de Ara-C seguido de un TPH alogénico en primera remisión completa. Con esta aproximación se alcanzan supervivencias libres de evento del 40%-50%. La edad inferior a 6 meses y una hiperleucocitosis superior a $300 \times 10^9/L$ son factores de mal pronóstico. En los pacientes en recaída se está ensayando terapia epigenética o con inhibidores de FLT3, entre otros.

LAL de fenotipo B maduro o tipo Burkitt

La LAL B madura debe tratarse como los linfomas de Burkitt en estadios avanzados. Los protocolos incluyen la administración de ciclofosfamida a dosis altas y fraccionadas, altas dosis de metotrexato, prednisolona, Ara-C, vincristina, etopósido y adriamicina. La duración del tratamiento es de entre 4 y 6 meses y no requiere tratamiento de mantenimiento. La adición de anticuerpos monoclonales contra CD20 como rituximab ha mejorado sensiblemente las probabilidades de supervivencia de estos pacientes (545,546). En la actualidad se alcanza la curación en más del 80% de los niños y en un 70% de los adultos.

LAL en adolescentes y adultos jóvenes (AYA)

Varios estudios han demostrado que los AYA responden mejor a protocolos pediátricos que a los propios de LAL del adulto. De hecho, el pronóstico de los AYA en los protocolos más recientes es muy similar al de la LAL pediátrica. Una práctica cada vez más extendida es la de tratar a los pacientes AYA de riesgo intermedio con protocolos pediátricos.

6.7.10. Efectos secundarios, secuelas y segundas neoplasias

Los efectos del tratamiento sobre el SNC pueden comportar atrofia cerebral, calcificaciones, déficit de algunas funciones intelectuales y, en menor frecuencia, encefalopatías graves. Estos trastornos son el reflejo de la profilaxis del SNC y se observaban más frecuentemente en pacientes que han recibido irradiación holocraneal en edad temprana en vez de triple terapia intratecal y terapia sistémica con fármacos que atraviesan la barrera hematoencefálica. También puede verse afectado el crecimiento, con tendencia a talla más corta y obesidad. Actualmente la práctica de irradiación holocraneal está cada vez más en desuso. Los pacientes pediátricos con LAL también presentan un inicio precoz a la pubertad y menarquía en las niñas, osteoporosis y necrosis óseas avasculares, así como cataratas subcapsulares atribuibles al uso de glucocorticoides. Los antraciclínicos pueden causar cardiomiopatías crónicas que se relacionan con la dosis acumulada del fármaco.

El riesgo de segundas neoplasias debidas al tratamiento es bajo y persiste durante unos 10 años. Las segundas neoplasias más frecuentes son tumores del SNC (especialmente gliomas), carcinomas de tiroides y parótida (atribuibles a la irradiación craneal) y LAM (sobre todo en niños que han recibido inhibidores de la topoisomerasa II como etopósido o tenipósido). No existen evidencias de un mayor riesgo de neoplasias ni de defectos congénitos en los hijos de supervivientes de LAL.

6.7.11. Nuevos tratamientos

Existen muchos nuevos fármacos que se están investigando activamente en la LAL. Entre ellos se incluyen los análogos de los nucleósidos, inhibidores de mTOR, inhibidores del proteasoma, inhibidores de histona deacetilasa, agentes hipometilantes, inhibidores de la tirosina cinasa de Bruton (BTK), inhibidores de JAK-STAT, inhibidores de mitogen-activated protein kinase (MEK), antagonistas de CXCR4, inhibidores de poly (ADP-ribose), polymerase (PARP) e inhibidores de FLT3, entre otros (547). Sin embargo, es la inmunoterapia (ya sea basada en el uso de anticuerpos o de células T modificadas genéticamente (CART)) la estrategia que ha alcanzado un mayor nivel de desarrollo.

6.7.11.1. Inmunoterapia basada en anticuerpos

El desarrollo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos propios de la diferenciación linfoide (sobre todo de línea B, Figura 38) ha empezado a proporcionar resultados esperanzadores en diversos subtipos de LAL. A continuación, se comentan los anticuerpos que han demostrado más actividad terapéutica.

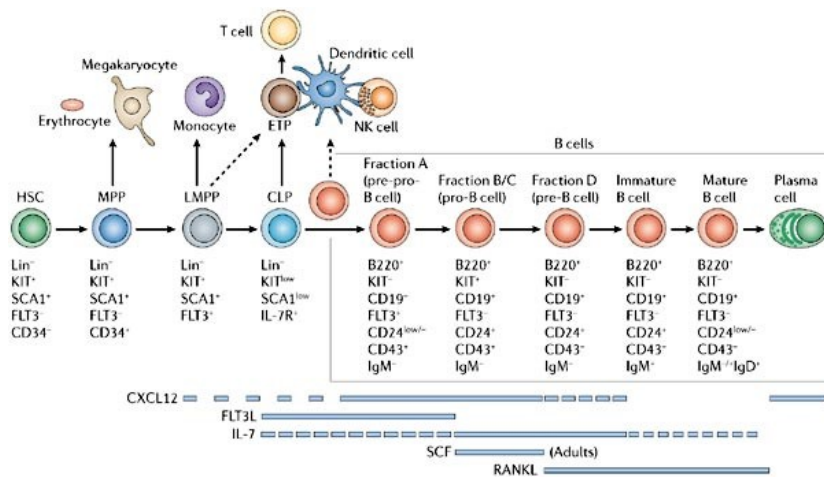


Figura 38. Expresión de antígenos en el desarrollo linfocitario B (548).

Rituximab

Rituximab es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 con un triple mecanismo de acción tras su unión al antígeno CD20: activación del complemento, citotoxicidad mediada por células NK y activación de caspasas (Figura 39).

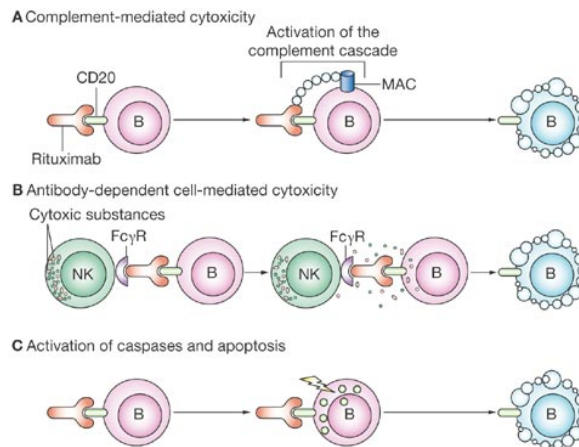


Figura 39. Mecanismos de acción del anticuerpo monoclonal anti-CD20 rituximab (549).

La adición de rituximab a los protocolos de quimioterapia de la LAL de Burkitt ha supuesto un aumento notable de la supervivencia de estos pacientes, incluso en pacientes de edad avanzada (545,546). A su vez, aproximadamente un 30%-50% de las LAL de precursores B expresan CD20 (550,551). La eficacia de rituximab en combinación con quimioterapia se ha evaluado en cohortes de pacientes adultos en recaída y al diagnóstico (552,553) mostrando una mejora de la supervivencia en adultos menores de 60 años. El único estudio prospectivo aleatorizado al respecto ha demostrado el beneficio en supervivencia libre de evento de añadir rituximab en el tratamiento de las LAL Ph-negativas, CD20+, menores de 60 años (554).

Ofatumumab

Ofatumumab es un anticuerpo anti-CD20 de segunda generación que se une a un dominio de CD20 diferente a rituximab. La actividad terapéutica de este anticuerpo parece ser superior a la de rituximab y ha mostrado actividad antileucémica en pacientes de LLC resistentes a rituximab (555). Su potencial terapéutico parece ser prometedor en LAL de precursores B CD20+.

Epratuzumab

Epratuzumab es un anticuerpo monoclonal anti-CD22 con un mecanismo de acción que implica la internalización del antígeno e inhibición de la proliferación celular. Este anticuerpo ha mostrado actividad terapéutica en forma de reducción de la ERM en niños en recaída, como puente al trasplante (556).

Blinatumomab

Blinatumomab es un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos están formados por dos partes de moléculas de inmunoglobulina. Una de ellas está diseñada para unirse al antígeno CD3 de los linfocitos T citotóxicos y la otra se diseña en función del antígeno tumoral sobre el que se quiere actuar. Este anticuerpo es muy eficaz, ya que sitúa el linfocito T citotóxico tan cerca del blasto leucémico que el primero lisa al segundo mediante lisis directa por el sistema granzimas/perforina (Figura 40). En la LAL, el anticuerpo biespecífico contra el antígeno CD19 y el CD3 es el que más se ha desarrollado y evaluado en pacientes. CD19 es un buen candidato, ya que

se expresa en más del 90% de las LAL de línea B (aunque también en la mayoría de células B no tumorales) sin expresarse en células madre hematopoyéticas, por lo que su uso no compromete la hematopoyesis sana una vez cesa el tratamiento (550).

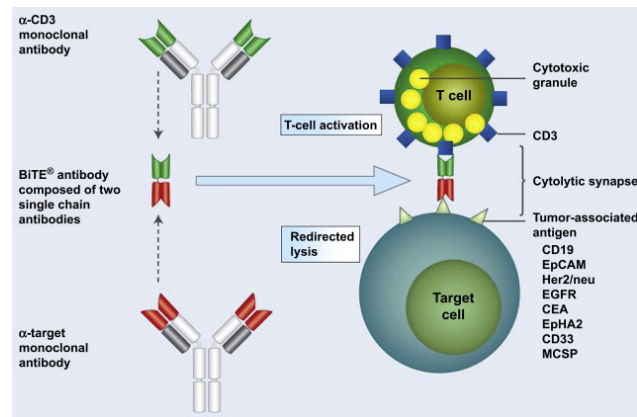


Figura 40. Estructura y mecanismo de acción de los anticuerpos monoclonales biespecíficos (557).

En los últimos años se han realizado ensayos clínicos en pacientes en recaída y en pacientes con ERM+ y se han publicado los resultados recientemente. En el ensayo multicéntrico, abierto, aleatorizado, de fase III TOWER, se incluyeron 405 pacientes adultos Ph negativos refractarios a quimioterapia de inducción, en primera recaída con una remisión completa previa menor a 12 meses, en segunda recaída o ulteriores y en cualquier recaída post-TPH (558). Se aleatorizaba a los pacientes a recibir tratamiento con blinatumomab o quimioterapia de rescate (ratio 2:1). Los pacientes del grupo de blinatumomab recibieron el anticuerpo y dexametasona para evitar el síndrome de liberación de citocinas y reacciones a la infusión del fármaco, así como profilaxis intratecal del SNC. Los pacientes del grupo de quimioterapia de rescate podían recibir uno de los cuatro tratamientos de rescate propuestos en el estudio: FLAG-IDA, esquemas basados en altas dosis de Ara-C, metotrexato o clofarabina. Las medianas de ciclos de tratamiento de blinatumomab y quimioterapia de rescate fueron 2 y 1, respectivamente. Casi la mitad de los pacientes en el grupo de quimioterapia de rescate recibieron FLAG-IDA. La tasa de remisión completa del grupo que recibió blinatumomab fue significativamente superior a la del grupo de quimioterapia de rescate (34% vs. 16%, $p < 0,001$). Con una mediana de seguimiento de un año en ambos grupos, el grupo que recibió blinatumomab mostró mejores tasas de supervivencia global más largas que los pacientes que recibieron quimioterapia (medianas de 7,7 meses vs. 4 meses, HR 0,71, $p = 0,01$) (Figura 42 A), incluso cuando se censuró el seguimiento en el momento del TPH

(6,9 vs 3,9 meses, HR 0,66, $p=0,004$). El estudio dirigido a pacientes adultos Ph+ refractarios o en recaída mostró resultados similares y cabe destacar que 4/10 pacientes con mutación T315I alcanzaron al respuesta completa (EMR-) (559). En la población pediátrica, la eficacia del fármaco está menos explorada, aunque parece mostrar resultados muy similares a los observados en adultos (560).

El estudio BLAST analizó la eficacia de blinatumomab en monoterapia en pacientes adultos de LAL-B con ERM+. Este estudio incluyó pacientes con LAL en remisión completa hematológica (<5% blastos en MO) tras por lo menos 3 líneas de tratamiento previas y con una $ERM>10^{-3}$. Los criterios de exclusión fueron: LAL con infiltración en el SNC o extramedular, haber recibido un TPH alogénico previamente y LAL Ph+ candidatas a recibir TKI. Mostró unos resultados prometedores, ya que el 78% de los pacientes (88/11) alcanzaron la remisión molecular (casi todos con un solo ciclo de tratamiento) (561,562). Los resultados de largo seguimiento de estos pacientes actualizados muestran que, con una mediana de seguimiento de casi 5 años, la mitad de ellos siguen con ERM negativa (562).

La mayoría de recaídas tras el tratamiento con blinatumomab son de LAL CD19-. Este hecho es un ejemplo más de la capacidad de adaptación de la leucemia ante la presión selectiva del tratamiento. Se cree que en el inicio del tratamiento ya existen subclones CD19-, los cuales eluden el tratamiento y dan lugar a la recaída de la enfermedad. Sin embargo, otros podrían ser adaptativos. Uno de los mecanismos para negativizar la expresión de CD19 ocurre cuando la maduración del antígeno se ve interrumpida y no se transporta ni al aparato de Golgi ni a la membrana plasmática (563). La hipoactivación de los linfocitos T tras la lisis tumoral también afecta negativamente la eficacia del tratamiento.

Inotuzumab ozogamicina

Inotuzumab ozogamicina es un anticuerpo humanizado anti-CD22 conjugado con calicheamicina, un antibiótico con una actividad citotóxica muy superior a la de cualquier agente quimioterápico. El mecanismo de acción de este anticuerpo se inicia con su unión al antígeno CD22, después el anticuerpo se internaliza en el citoplasma junto con el antígeno. Una vez dentro de la célula, el antígeno y el anticuerpo se degrada en los lisosomas y se libera la molécula de calicheamicina. Este compuesto se dirige al núcleo celular donde se une al ADN y produce roturas de la doble hebra que conducen a la apoptosis de la célula tumoral (Figura 41). El antígeno CD22 lo expresan

más del 90% de las LAL de precursores B, aunque en LAL del subtipo pro-B no todos los casos lo expresan. Al contrario que con CD19, donde prácticamente todas las células de la LAL lo expresan, hay casos de LAL en los que no todas las células del tumor son CD22+ (550).

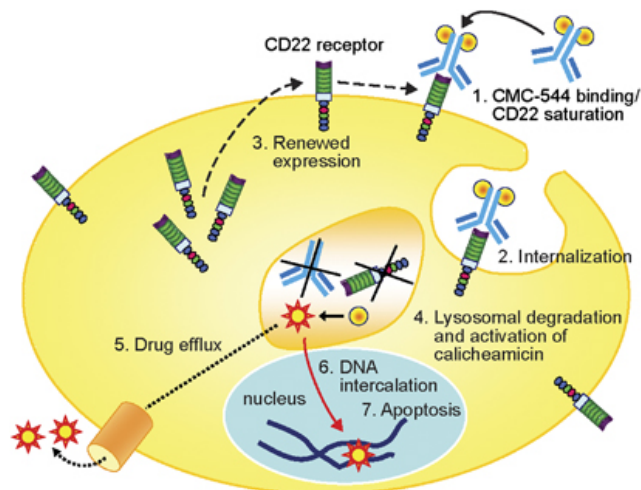


Figura 41. Mecanismo de acción de inotuzumab ozogamicina (564).

El ensayo clínico aleatorizado, multicéntrico, abierto, fase III (INO-VATE) evaluó la eficacia de inotuzumab en monoterapia frente a quimioterapia de rescate (ratio 1:1) en pacientes adultos de LAL-B CD22+ en recaída o refractaria (>5% blastos en MO) (565). El protocolo consistía en la administración de un máximo de 6 ciclos de inotuzumab frente a quimioterapia de rescate a elegir entre 3 regímenes: FLAG (fludarabina, Ara-C y GCSF), Ara-C y mitoxantrone o Ara-C a altas dosis. Un total de 259 pacientes recibieron al menos una dosis de tratamiento (139 recibieron inotuzumab y 120 quimioterapia de rescate). La tasa de remisión completa o remisión completa con recuperación hematológica incompleta fue significativamente superior en el grupo de inotuzumab (80% vs. 29%, $p < 0,001$). En el grupo de inotuzumab, un número significativamente mayor de pacientes (aproximadamente el triple) negativizó la ERM en comparación con los pacientes del grupo de quimioterapia de rescate. La duración de la remisión completa fue significativamente mayor en el grupo de pacientes que recibieron inotuzumab (4,6 vs 3,1 meses, $p = 0,03$). Sin embargo, los pacientes con citogenética de alto riesgo (MLL+ o Ph+) no se beneficiaron tanto del tratamiento con inotuzumab, ya que no mostraron unas tasas de remisión completa significativamente superiores a las del grupo de quimioterapia. La cantidad de pacientes que llegaron a recibir un TPH fue significativamente mayor en el grupo de inotuzumab (41% vs 11%, $p < 0,001$). La supervivencia libre de progresión también fue significativamente más duradera

en los pacientes que recibieron el anticuerpo (5,0 vs 1,8 meses, $p < 0.001$). La mediana de supervivencia global fue ligeramente superior en el grupo de inotuzumab (7,7 vs 6,7 meses, $p = 0,04$) y parece ser que estas diferencias se observan especialmente en el seguimiento a largo plazo (Figura 42 B). La eficacia de inotuzumab en pacientes pediátricos está en fase exploratoria (566).

El uso de anticuerpos (biespecíficos o inmunoconjugados) para el tratamiento de la LAL en recaída parece ser una muy buena opción para alcanzar de nuevo la remisión completa y consolidar esta respuesta con un TPH. Hay que tener en cuenta que estos resultados se han logrado en series de pacientes en recaída, muchos de ellos tratados intensivamente con anterioridad, con LAL francamente refractarias al tratamiento y que han recibido el anticuerpo en monoterapia. El papel que puedan jugar estos anticuerpos en combinación con quimioterapia en primera línea de tratamiento genera muchas expectativas en la comunidad científica.

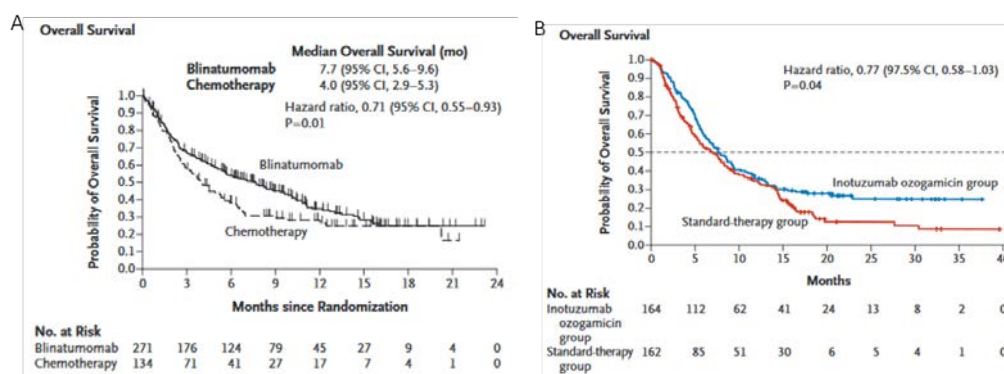


Figura 42 A y B. Supervivencia global de blinatumomab (panel A (558)) e inotuzumab (panel B (565)) en comparación con la quimioterapia de rescate en la LAL del adulto resistente o en recaída.

CARTs

Los CAR (*Chimeric Antigen Receptor*) son polipéptidos de origen sintético, formados por un dominio extracelular (cadena ligera de inmunoglobulina con el fragmento variable) dirigido contra un antígeno determinado, una región *hinge* o bisagra, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. Los CART (CAR T cell) son linfocitos T modificados genéticamente para que expresen constitutivamente un receptor de membrana (CAR) contra un antígeno determinado. La expresión constitutiva del CAR se logra mediante la infección de los linfocitos T por lentivirus o retrovirus que integran la secuencia genética para codificar el CAR en el genoma del linfocito (Figura 43). Este proceso permite dirigir a los linfocitos citotóxicos contra células que expresen ese antígeno y proliferar tras la lisis de la célula tumoral. Al igual que sucede con los

anticuerpos, apenas hay antígenos exclusivos de célula tumoral que no se expresen en células sanas (*tumor specific antigens*), hecho que hay que tener en cuenta cuando se administran tratamientos basados en la inmunoterapia.

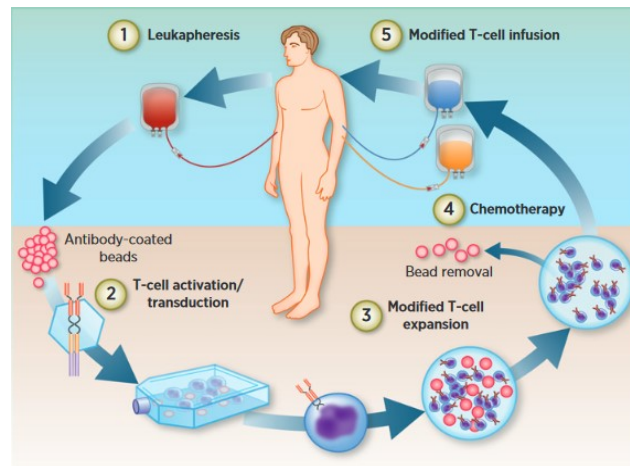


Figura 43. Producción y administración de las CAR T cells (567).

El concepto de utilizar linfocitos T modificados genéticamente para reconocer antígenos sin la necesidad del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) surgió hace más de 25 años. En el año 1989 se consiguió clonar y expresar en linfocitos T un transcrito compuesto por la región constante del TCR y fragmentos variables de la cadena ligera de las inmunoglobulinas. Los linfocitos T portadores de este primer CAR eran capaces de reconocer un antígeno de una línea celular de linfoma B, lisarla por granzimas/perforina y proliferar tras la lisis de la célula diana. Sin embargo, esta terapia con potencial preclínico mostró poca actividad antitumoral en ensayos clínicos. Desde entonces el diseño de los CAR ha centrado muchos esfuerzos en investigación. El dominio intracelular (CD3 zeta) estimulaba la proliferación de los CART, pero su persistencia era limitada y/o presentaban poca activación. Los CART de segunda generación han incorporado un dominio coestimulador (CD28 o 4-1BB) para estimular más la proliferación de los linfocitos T y aumentar su tiempo de vida (persistencia). Los CART de tercera generación tienen dos dominios coestimuladores formados por la combinación de CD27, CD28, 4-1BB, ICOS u OX40 (Figura 44). Por el momento se está evaluando cual es la mejor combinación de los fragmentos que forman el CAR, aunque parece que 4-1BB ofrece respuestas más duraderas (568–570). En paralelo aparecen nuevos componentes para el CAR como aquellos que hacen secretar diferentes interleucinas para

estimular aún más la proliferación o para no inhibir la respuesta inmune (armored CARTs o CARTs de cuarta generación).

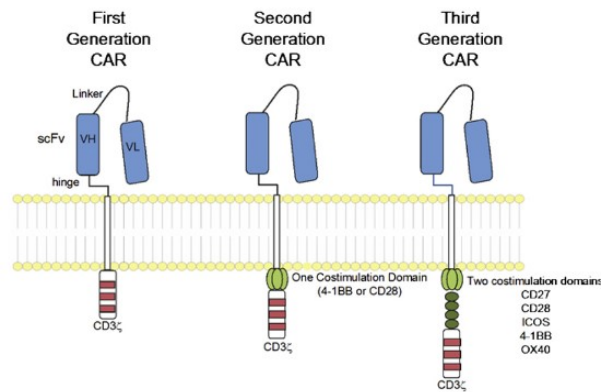


Figura 44. Generaciones de CAR T cells (571).

La investigación en el campo de los CAR está en plena ebullición y su diseño se ha optimizado tanto en los últimos 5-10 años que en la actualidad se está evaluando su eficacia en ensayos clínicos multicéntricos. En la actualidad, el CART anti-CD19 es el más desarrollado y evaluado. Varios estudios han demostrado su potente actividad antileucémica en pacientes con LAL-B, aunque también se está evaluando en otras neoplasias de célula B y más recientemente en tumores sólidos (567). Los problemas más importantes asociados al uso de CART anti CD19 son el síndrome de liberación de citocinas, la neurotoxicidad y la hipogammaglobulinemia. A pesar de su gran eficacia a corto plazo, se van observando recaídas en pacientes con LAL, dos terceras partes de las cuales son CD19-.

Una de las grandes ventajas de la infusión de CARTs, a parte de su intensa actividad antitumoral, es su carácter autólogo, que evitaría potencialmente los riesgos que conlleva la realización de un TPH alogénico. Con todo, en la mayoría de estudios actuales, la terapia con CART se considera un puente al trasplante, especialmente en adultos con LAL en recaída. Por otra parte, existe el debate sobre su eliminación una vez que se considere que su actividad ya no es necesaria. Por el momento no se ha interrumpido la actividad CART, ya que el seguimiento de los pacientes en remisión completa mantenida es muy corto. Existen varias propuestas para la eliminación de los CARTs del organismo de un paciente. Una de ellas es inhibir la expresión del CAR con RNA de interferencia. Otra consiste en incorporar la secuencia de un gen suicida en el CAR como el

sistema inducible de caspasa 9 (572). También se considera incorporar la expresión de CD20 en el CAR para eliminar los CART con anticuerpos anti-CD20 (567).

6.7.11.2. Inhibidores moleculares

El desarrollo de inhibidores de rutas metabólicas esenciales para las células neoplásicas está centrando muchos esfuerzos en investigación y ha abierto las puertas de la medicina personalizada. Los inhibidores pueden ofrecer mayor especificidad hacia las células afectando en menor grado a la hematopoyesis sana en el mejor de los casos. En este sentido, los ITK han revolucionado el tratamiento de la LAL Ph+, lo que ha permitido reducir significativamente la carga de quimioterapia y sus toxicidades asociadas, sin que ello afecte a la probabilidad de obtener remisión completa (95%-100% de los pacientes) (573). En la actualidad están activos unos 150 ensayos clínicos con inhibidores en LAL. Los nuevos ITK así como inhibidores de JAK/STAT, mTOR, FLT3, PI3K, CDK, BIRC, RAS, CREBBP, DOT1L, BCL2, FAK o de HDAC son de los más desarrollados y algunos de ellos están demostrando potentes actividades antileucémicas (85,98,115,193,406,407,418,574–584). La incorporación de estos fármacos en primera línea de tratamiento junto con la quimioterapia convencional podría mejorar la supervivencia de los pacientes y quizás reducir los efectos secundarios del tratamiento. La combinación secuencial de quimioterapia, inmunoterapia e inhibidores moleculares es posible que revolucione el tratamiento de la LAL y nos acerque más a su erradicación.

6.8. Recaídas y evolución clonal

La optimización de los protocolos terapéuticos ha conseguido mejorar las tasas de supervivencia y reducir la mortalidad relacionada con el tratamiento de manera significativa en pacientes de todas las edades. Sin embargo, las recaídas siguen siendo el factor más determinante en la mortalidad de la LAL. Como se ha comentado anteriormente, los niños presentan menor probabilidad de recaída y mejor respuesta al tratamiento de rescate que los adultos.

Históricamente se ha considerado que el proceso de carcinogénesis consistía en la adquisición sucesiva de alteraciones genéticas en una célula hasta transformarla en tumoral. La adquisición de estas alteraciones conferiría mayor capacidad proliferativa (entre otras características) resultando en la expansión de los clones más avanzados en el modelo lineal de carcinogénesis y la pérdida de los clones más ancestrales con menor capacidad proliferativa (95). En este modelo lineal, el tumor está compuesto por células genéticamente homogéneas (Figura 45).

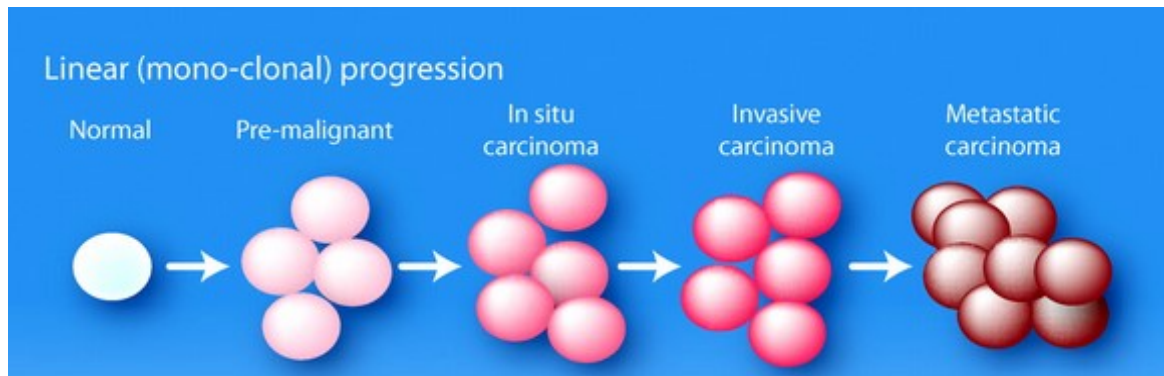


Figura 45. Modelo lineal de progresión del cáncer (585).

En el año 1976, Nowell *et al* postularon que los tumores estaban formados por diferentes clones, los cuales eran genéticamente heterogéneos y esta heterogeneidad era la responsable de la supervivencia al tratamiento. Hoy en día se ha constatado que, efectivamente, los tumores sólidos y las leucemias están formados por células genéticamente relacionadas entre sí (ya que descienden de una sola célula iniciadora del tumor) pero también distintas. La LAL es una enfermedad clonal por definición (reordenamiento clonal de IGH o TCR) pero en la práctica coexisten diferentes clones desde un punto de vista genético. Cada clon, con sus características genotípicas y fenotípicas, ha conseguido adaptarse al medio mediante la adquisición de diversas mutaciones que le han conferido una ventaja adaptativa. El resultado es un modelo filogenético ramificado en el que las LAL se sostienen por una pequeña población de células malignas con características de HSC (*leukemia stem cells*, LSC) que dan lugar a una progenie de células leucémicas que son las que constituyen la masa tumoral (586–588). Algunas de estas descendientes adquieren mutaciones que les aportan ventajas evolutivas para adaptarse al nicho hematopoyético y seguir proliferando. Este modelo ramificado sostiene que la leucemogénesis mimetiza el proceso de selección darwiniana y que la presión selectiva del tratamiento seleccionaría aquellos clones que mejor se adaptan y sobreviven a cada aproximación terapéutica (Figura 46). Esta heterogeneidad clonal (y genética) sería la responsable de la resistencia al tratamiento y la aparición de recaídas (589).

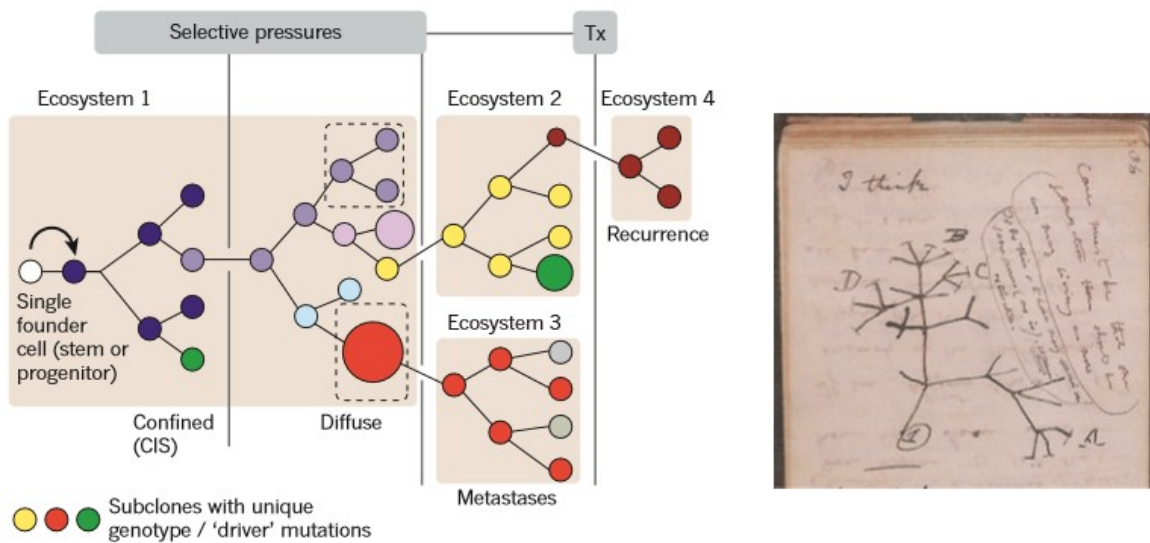


Figura 46 Modelo ramificado de la progresión del cáncer que se asemeja al modelo de evolución de las especies propuesto por Charles Darwin (589).

Esta teoría se ve apoyada por los trabajos de Greaves en gemelos univitelinos con LAL comentados anteriormente. En estos trabajos, las LAL de los gemelos tienen un perfil genético diferente en cada hermano pese a originarse en una célula común (mismo reordenamiento de ETV6-RUNX1 como *evento* preleucémico) (64). Este proceso de selección clonal ramificado también se ha observado en muestras seriadas de pacientes durante el tratamiento o comparando muestras pareadas al diagnóstico y recaída (65,66). Estos estudios han evidenciado que el clon predominante en la recaída no es el mismo que el detectado en el momento del diagnóstico en el 90% de los casos. En la mayoría de casos las muestras en recaída compartían alteraciones genéticas en común con el clon predominante al diagnóstico, pero al mismo tiempo habían adquirido nuevas alteraciones y habían perdido alteraciones presentes en el diagnóstico. Esto indica que el clon de la recaída es filogenéticamente anterior o más ancestral al clon detectado al diagnóstico, ya que la pérdida de alteraciones en recaída indica que éste clon aún no ha sufrido estas alteraciones, al contrario que el clon detectado al diagnóstico, el cual está más evolucionado en la patogenia de la enfermedad. También en la mayoría de casos, el clon responsable de la recaída ya está presente en el momento del diagnóstico en forma de clon minoritario (590). La quimioterapia habría seleccionado al subclon resistente frente al mayoritario al diagnóstico, el cual es sensible al tratamiento de primera línea en el 90%-100% de los casos. Sin embargo, la aparición de clones resistentes a la primera línea de tratamiento sucede en un 20% de las LAL pediátricas y en más de la mitad de los adultos. Estos estudios también han demostrado que no existe una firma génica recurrente responsable de la recaída. En su lugar, las

muestras en recaída muestran una constelación de alteraciones genéticas muy variada, con cierta recurrencia en genes de rutas metabólicas que regulan la diferenciación linfoide, el avance del ciclo celular, la respuesta a fármacos, la apoptosis o eventos epigenéticos como la modificación del código de las histonas, entre otros (65,66,586).

La heterogeneidad clonal está implicada en la resistencia al tratamiento y en la aparición de recaídas. En cuanto a su valor pronóstico, cuanta más heterogeneidad clonal al diagnóstico, más probabilidades de que exista un clon resistente al tratamiento, tal como se ha demostrado en algunos estudios (591,592). Por tanto, el grado de heterogeneidad clonal al diagnóstico también puede ser un factor pronóstico de la evolución de la enfermedad. Se están realizando muchos esfuerzos en identificar cuáles son las alteraciones genéticas y epigenéticas responsables de la progresión de la LAL para diseñar fármacos que neutralicen sus efectos.

7. HIPÓTESIS

1. La LAL de línea B es muy heterogénea a nivel genético.
2. Las alteraciones de genes implicados en la diferenciación linfoide, regulación del ciclo celular y regulación de la apoptosis pueden tener valor pronóstico.
3. La LAL B madura podría tener una base genética diferente de la de las LAL de precursores B.
4. El patrón de alteraciones genéticas de la LAL de precursores B en recaída podría ser más complejo que el presente en el diagnóstico. Analizar muestras en recaída podría ayudar a conocer el origen celular de la recidiva y a identificar firmas génicas específicas de recaída.

8. OBJETIVOS

1. Conocer, mediante análisis de alteraciones en el número de copias (CNA), las ganancias y pérdidas de ADN en pacientes con LAL de precursores B y la LAL B madura y comparar el patrón de dichas alteraciones en ambos subtipos de LAL.
2. Determinar el impacto pronóstico de las CNA en el momento del diagnóstico en pacientes con LAL de precursores B y LAL B madura.
3. Analizar y comparar el patrón de evolución clonal en los pacientes con LAL de precursores B en recaída y tratar de identificar firmas génicas específicas de recaída.

9. MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes y tratamiento:

En el primer artículo se analizaron muestras de médula ósea o sangre periférica con >30% blastos de pacientes adolescentes y adultos con LAL de precursores B extraídas en el momento del diagnóstico. Los pacientes se trataron homogéneamente en diferentes protocolos del grupo PETHEMA (Figura 47 A). El diagnóstico de estos pacientes se realizó en Laboratorio de Hematología del ICO-Hospital Germans Trias i Pujol, así como en los diferentes hospitales que colaboraron en este estudio. El 87% de los pacientes se incluyó en protocolos de alto riesgo mientras que el 13% se trató con protocolos de riesgo intermedio (Figura 47 B).

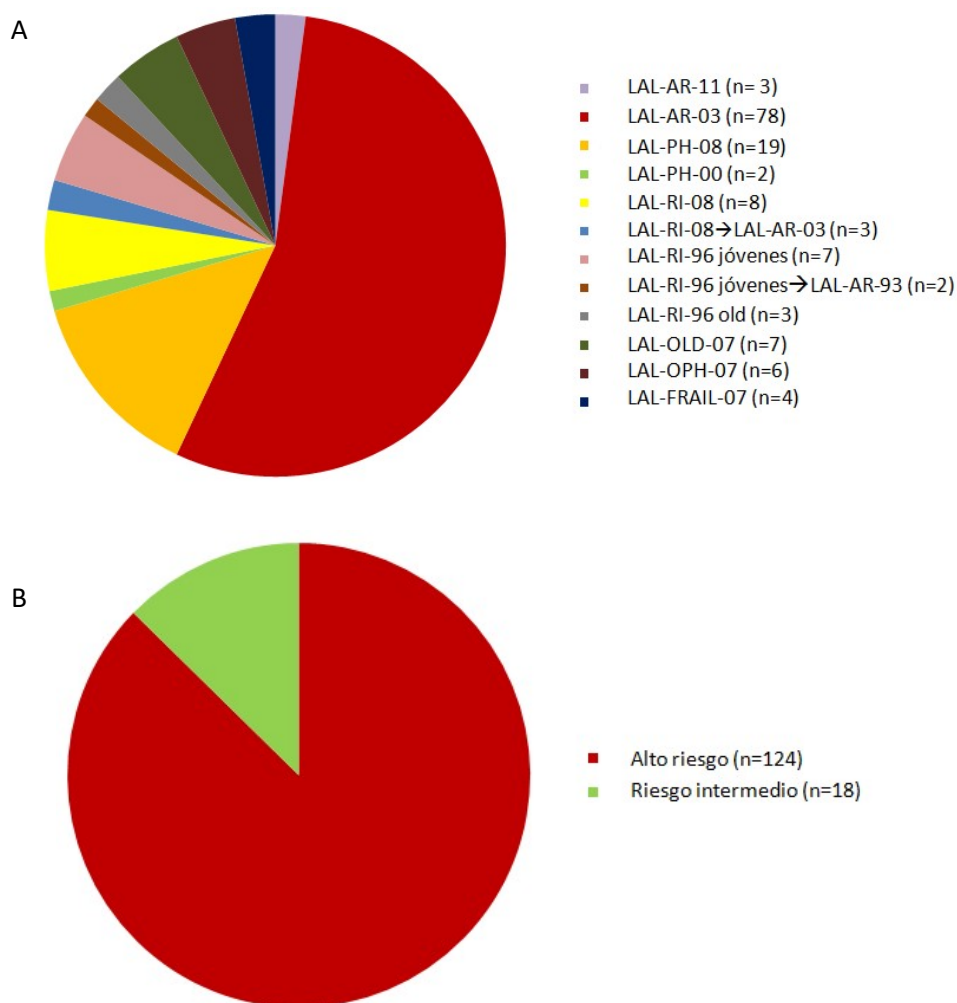


Figura 47. Protocolos asistenciales del grupo PETHEMA en los que se incluyeron los pacientes (A) y clasificación de los pacientes según su riesgo (B).

Los criterios de asignación en protocolos de alto riesgo fueron: edad >30 años, número de leucocitos $>30 \times 10^9/L$, presencia de reordenamiento BCR-ABL1 o reordenamiento de MLL, o respuesta lenta al tratamiento con >10% de blastos en médula ósea en el día 14 de la fase de

inducción a la remisión. Los pacientes con LAL de riesgo intermedio se trataron con protocolos similares a los de LAL pediátrica (593) mientras que los pacientes de alto riesgo recibieron quimioterapia seguida o no de un TPH (5,594). Desde el año 2002, los pacientes con LAL Ph+ se trataron con quimioterapia e imatinib seguido de TPH en pacientes menores de 55 años (537).

En el segundo artículo, se analizaron muestras de médula ósea con >30% blastos de pacientes con leucemia de Burkitt en el momento del diagnóstico (LAL3). El diagnóstico de estos pacientes se realizó en Laboratorio de Hematología del ICO-Hospital Germans Trias i Pujol, así como en los diferentes hospitales que colaboraron en este estudio. Todos los pacientes se trataron con el protocolo BURKIMAB08 (545).

En el tercer artículo, se analizaron muestras de médula ósea o sangre periférica con >30% de blastos en el diagnóstico y en la recaída de algunos de los pacientes previamente analizados en el primer artículo. Por tanto, todos los pacientes se trataron inicialmente con protocolos del Grupo PETHEMA. Sin embargo, el tratamiento en recaída fue más heterogéneo, ya que el 35% de los pacientes recibió el esquema FLAG-IDA y el 30% se incluyó en ensayos clínicos basados en inmunoterapia con anticuerpos monoclonales.

Técnicas de laboratorio:

a) MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

La técnica de MLPA (MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands) permite la detección semicuantitativa de ganancias o pérdidas de ADN de hasta 60 regiones del genoma mediante una reacción de PCR multiplex. Esta técnica se basa en el uso de sondas específicas que hibridan en el ADN en secuencias de 60 pares de bases de las regiones a estudio. A diferencia de las PCR convencionales, en MLPA lo que se amplifica son las sondas y no el ADN. Cada sonda está compuesta por 2 subunidades y tiene una longitud única de entre 130 y 500 nucleótidos necesaria para distinguir cada amplicon tras la PCR multiplex (Figura 48). Cada sonda contiene una secuencia de nucleótidos común en todas las sondas, que va a ser el lugar de unión del *primer* de la PCR. Tras la desnaturalización del ADN, se añaden estas sondas, las cuales se unen al ADN monocatenario por complementariedad de bases.

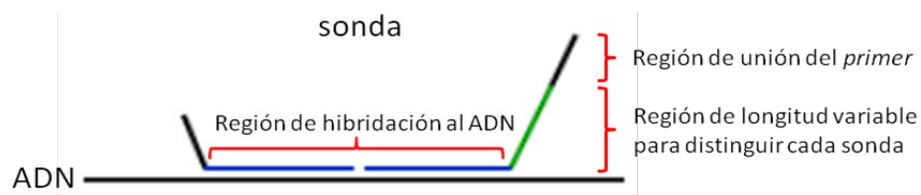


Figura 48. Estructura de las sondas de MLPA (595).

Posteriormente las 2 subunidades de la sonda se unen mediante una enzima ligasa. En algunas sondas, el punto de ligación coincide con el de alguna mutación puntual ya descrita en la literatura. En caso de mutación, la hibridación de la sonda no es completa y no se produce ni la ligación ni la amplificación de ésta. Tras la ligación, la adición del *primer* universal permite la amplificación simultánea de todas las sondas por PCR.

Este *primer* está marcado con un fluorocromo que permite la detección de los amplicones mediante análisis de fragmentos o *genescan* en un secuenciador automático convencional (Figura 49).

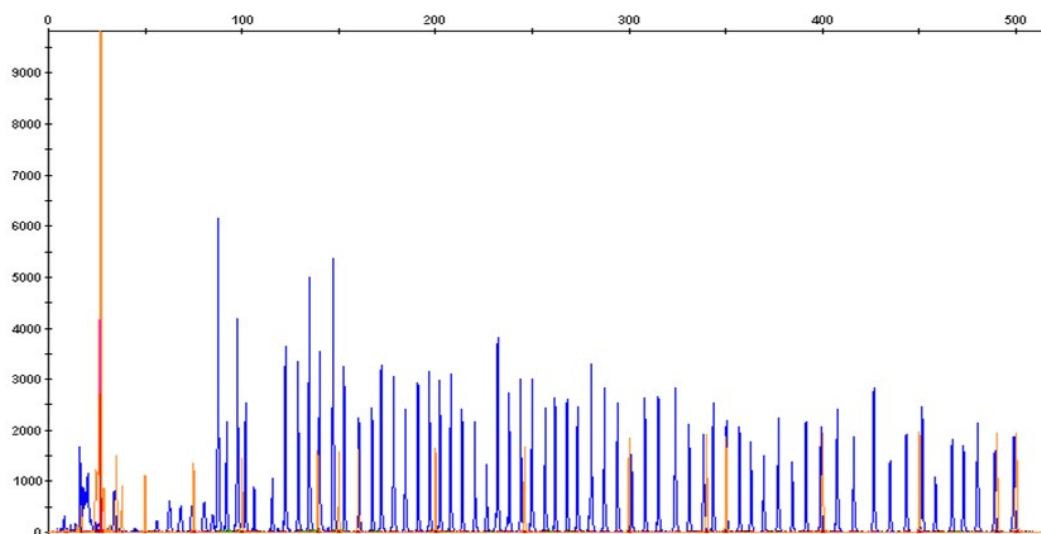


Figura 49. Imagen obtenida del secuenciador del laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Hematología del ICO-Hospital Germans Trias i Pujol. Cada pico representa la cantidad de sonda de cada región estudiada.

El área de cada pico (correspondiente a cada amplicón) ofrece una cuantificación relativa de las copias de ADN de cada región presentes en la muestra. En todas las reacciones de MLPA se incluyen sondas que hibridan en zonas muy estables del genoma y, por tanto, tienen dotación diploide (sondas de referencia). Estas sondas se incluyen para normalizar los valores de las sondas de cada muestra. Primeramente, se realiza una normalización del valor de las sondas que

investigan la presencia de CNA (o sondas problema), respecto al valor de las áreas de las sondas de referencia de cada muestra (normalización intra-muestra). Posteriormente se compara el valor normalizado de cada sonda problema con el valor de todas las sondas de los controles sanos, tanto sondas problema como sondas de referencia, las cuales se supone que tendrán dotación diploide o normal (normalización inter-muestra). En cada reacción de MLPA es preciso incluir ADN de al menos 3 controles sanos para este fin. El valor del área de cada sonda de estos 3 controles no tumorales se compara con el obtenido de las sondas de los pacientes. Tras la normalización de los valores de cada sonda, el cociente *área de la muestra del paciente/área de la media de los controles sanos* ofrece un valor indicativo (DQ, *dosage quotient*) del estado de cada región del ADN analizada (Figura 50 y Figura 51).

Dosage Quotient Distribution	Copy Number Status
DQ = 0	0 copies (homozygous deletion)
0.40 < DQ < 0.65	2⇒1 copy (heterozygous deletion)
0.80 < DQ < 1.20	NORMAL (identical to reference samples)
1.30 < DQ < 1.65	2⇒3 copies (heterozygous duplication)
1.75 < DQ < 2.15	2⇒4 copies (or 1⇒2 copies)
All other values	Ambiguous result

Figura 50. Valores que determinan la presencia de CNA (595).

El fabricante considera los resultados estadísticamente significativos según los puntos de corte 0.7 y 1.3. Es decir, los $DQ < 0.7$ son informativos de delección mientras que los $DQ > 1.3$ son informativos de duplicación.

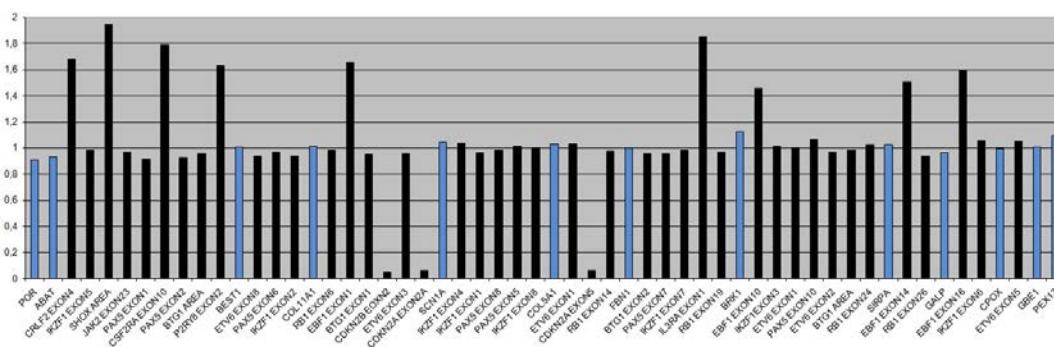


Figura 51. Imagen obtenida en el laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Hematología del ICO-HGTiP que muestra los valores normalizados de una paciente con delección homocigota de CDKN2A/B y duplicaciones de los genes en X/YPAR1 y EBF1.

Para analizar la presencia de CNA en muestras de LAL-B y LAL-B madura se usaron los kits P335 y P202 de la casa comercial MRC Holland. El kit P335 contiene sondas para la detección de CNA de los genes IKZF1, EBF1, PAX5, CDKN2A/B, BTG1, ETV6, RB1 y genes de la región X/PAR1 (CRLF2, CSF2RA, IL3RA y P2RY8). El kit P202 contiene sondas para detectar CNA en los genes IKZF1, IKZF2, IKZF3, CDKN2A/B, hsa-miR-31 y genes de la región 14q32.33 (IGHD, MTA1 y KIAA0284).

Esta técnica permite obtener información acerca de las ganancias y pérdidas con una alta resolución (a nivel de exón) en varias regiones del genoma, en una sola reacción y a un precio asequible (~20 euros/muestra). Sin embargo, la sensibilidad de esta técnica es limitada en casos de mosaicismo, como sería una muestra tumoral en la que no todas las células de la muestra son malignas. El fabricante recomienda que exista un porcentaje del 40%-50% de células tumorales en las muestras a estudio. Cabe destacar que algunos autores han detectado CNA en neoplasias hematológicas en muestras con una infiltración tumoral menor a la recomendada por el fabricante (31,596–598). Posteriormente, el fabricante ha contrastado dichos datos y argumenta que esta técnica es capaz de detectar con fiabilidad CNA en muestras con una infiltración tumoral del 30% (599).

b) SNP arrays (*Single Nucleotide Polymorphism arrays*)

Los SNP arrays permiten analizar la presencia de ganancias y pérdidas de ADN (CNA) así como pérdidas de heterocigosidad (CN-LOH) en todo el genoma en una sola determinación. La detección de CNA y CN-LOH se da gracias a la presencia de numerosas sondas complementarias al ADN que cubren todo el genoma. A diferencia de los CGH (Comparative Genomic Hybridization), los SNP arrays también contienen sondas que detectan SNP que sirven para detectar las CN-LOH. El SNP array que se ha usado en esta tesis es el Cytoscan HD de Affymetrix (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA). Este microarray genómico contiene 2,6 millones de sondas, 750.000 de ellas sondas de SNPs.

El primer paso para llevar a cabo la técnica de SNP array es el análisis de la calidad e integridad del ADN. Para ello se analiza la calidad de la muestra mediante espectrofotometría (Nanodrop ND-2000) y se analiza la integridad mediante un gel de agarosa al 1%. Los fragmentos de ADN deben ser superiores a 500pb.

Esta técnica se basa en los siguientes procedimientos (Figura 52):

- Digestión: el ADN se digiere mediante un enzima de restricción (NspI).
- Ligación: es una reacción enzimática en la que se incorporan los adaptadores a los fragmentos de ADN.

- Reacción de amplificación mediante PCR: se amplifican las muestras con un *primer* único que se une a los adaptadores. Mediante un gel de agarosa al 2% se analiza el perfil del producto de PCR, éste debe ser entre 150pb y 2.000pb.
- Purificación del producto de PCR: los amplicones se purifican mediante bolas magnéticas que se unen al ADN y lo separan de los productos remanentes de la PCR (*primers*, dNTPs, etc). Posteriormente se cuantifica el producto de PCR mediante espectrofotometría y deben obtenerse lecturas de alrededor de 300ng/μL.
- Fragmentación: el producto de PCR se fragmenta (mediante una reacción enzimática) para su posterior marcaje. Los fragmentos obtenidos se analizan en un gel de agarosa de alta resolución (3-4%) y deben estar comprendidos entre 25 y 125pb.
- Marcaje: el producto de la fragmentación se marca con biotina para su posterior tinción.
- Hibridación: la muestra marcada se desnaturaliza y se inserta dentro del microarray (chip). En este paso los fragmentos se unen a las sondas fijadas en el chip en un horno de hibridación durante 16-18h.
- Lavados y tinción: el microarray se inserta en la estación fluídica donde se llevará a cabo el lavado. Inmediatamente después tiene lugar la tinción mediante una molécula fluorescente (estreptavidina-ficoeritrina) que se une a la biotina. La tinción incluye un paso de amplificación de la señal mediante un anticuerpo anti-estreptavidina y un anticuerpo anti IgG conjugado con biotina.
- Escaneo: el microarray se inserta en un escáner que mediante un láser detecta las señales de fluorescencia de cada fragmento de ADN. El patrón de distribución de la señal se recoge en los ficheros DAT y CEL. Estos ficheros permitirán generar el fichero CYCHP, con el cual se llevará a cabo el análisis mediante el programa Chromosome Analysis Suite (ChAS) proporcionado por el fabricante.

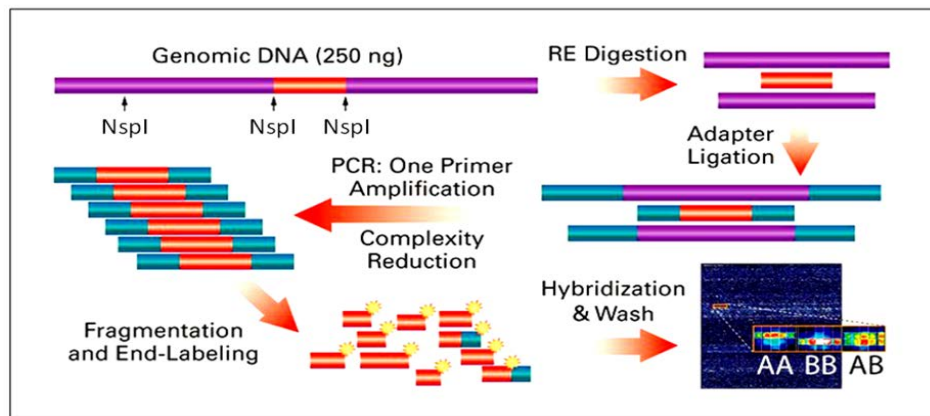


Figura 52. Principales procedimientos de la técnica de SNP arrays (ThermoFisher).

Este programa permite la visualización y anotación de los resultados de una manera sencilla e intuitiva (Figura 53).

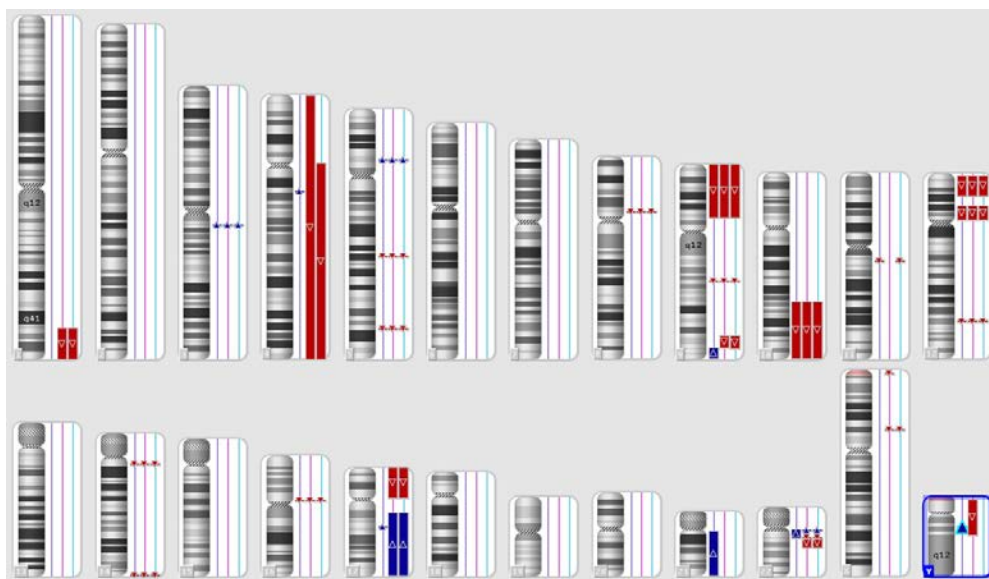


Figura 53. Visualización de las ganancias (azul) y pérdidas (rojo) de un paciente de LAL-B de nuestra serie mediante el programa ChAS.

Además aporta el valor semicuantitativo de la proporción de células de la muestra que contienen una determinada CNA. Este valor es útil para discernir qué CNA aumentan o disminuyen su proporción durante la progresión de la leucemia (Figura 54).

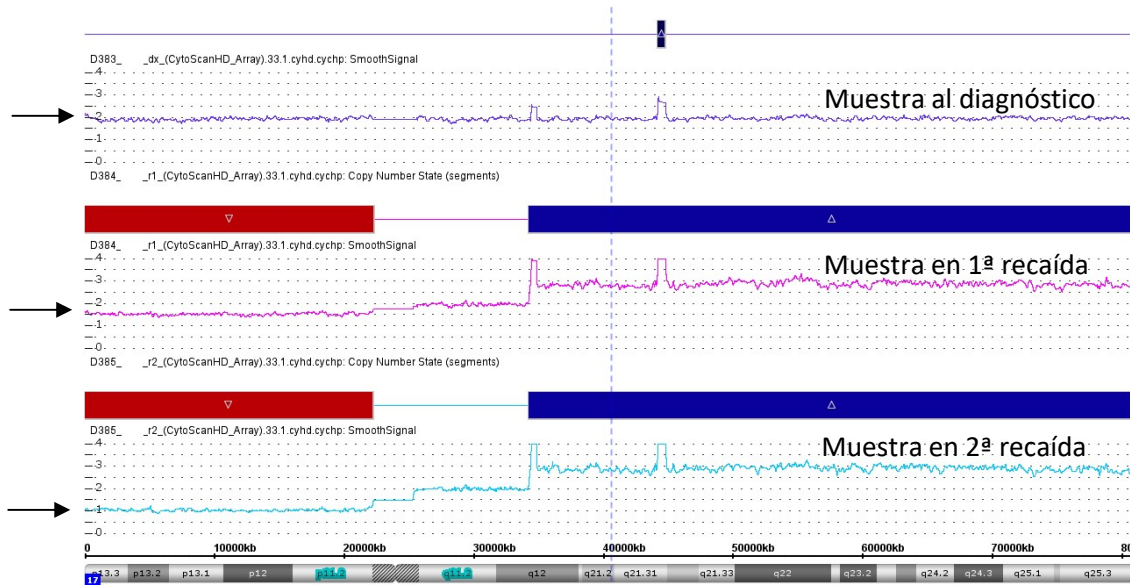


Figura 54. Presencia de una deleción del brazo 17p (TP53) y una duplicación de casi todo el brazo 17q en un paciente de LAL-B de nuestra serie refractario a 3 líneas de tratamiento y 2 TPH. Nótese como aumenta la cantidad de células con deleción de 17p de la 1a a la 2a recaída, siendo un cromosoma normal (dotación diploide) al diagnóstico.

Las principales ventajas de esta técnica son la cantidad de información que aporta a un precio razonable (200-450 euros), la elevada resolución (dependiente del número de sondas del chip), la detección de alteraciones en muestras con cariotipo normal o sin crecimiento, la detección de CNA no visibles en el cariotipo (<10 Mb) (Figura 55), la capacidad de identificar cromosomas marcadores y material adherido, y la capacidad de detectar CN-LOH.

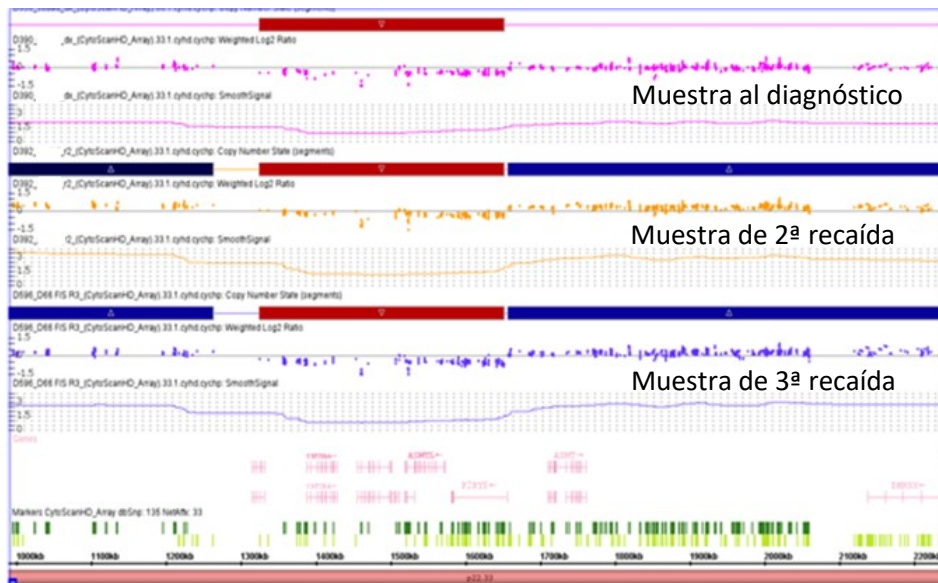


Figura 55. Deleción intersticial en X/Y PAR1 que genera el gen de fusión P2RY8-CRLF2 detectada en una paciente de nuestra serierefractaria a 3 líneas de tratamiento y 2 TPH.

Al igual que MLPA, una de las limitaciones de esta técnica se hace evidente en muestras con baja infiltración tumoral, aunque la sensibilidad de los SNP arrays (15%-20%) es superior a la de MLPA. Otra limitación que comparte con MLPA es que los valores de número de copias son un promedio de los valores de CNA de las células que contiene la muestra, no permite la detección de CNA a nivel de célula individual como la FISH.

Análisis estadístico:

En el primer artículo se trató de identificar CNA con valor pronóstico o asociadas a características clínico-biológicas. Para tal fin se incluyeron las variables edad, género, número de leucocitos al diagnóstico y porcentaje de blastos en médula ósea como variables continuas; y afectación del SNC, subtipo inmunológico, subtipo citogenético, grupo de riesgo y resultados del tratamiento como variables categóricas. La remisión completa (RC) se definió como la ausencia de enfermedad extramedular, $>1 \times 10^9/L$ neutrófilos, $>100 \times 10^9/L$ plaquetas y $<5\%$ de blastos en médula ósea. La incidencia acumulada de recaída (CIR) se calculó desde la fecha de obtención de la RC hasta la fecha de la recaída. Los pacientes en los que no se sabía si habían recaído se censuró el seguimiento en la fecha de la última visita. La supervivencia global se midió desde la fecha de inclusión en el protocolo de tratamiento hasta la fecha de *exitus* o última visita. Las asociaciones de CNA y la comparación de sus proporciones entre grupos de pacientes se calcularon mediante los test de chi cuadrado, test exacto de Fisher, test de Kruskal-Wallis H y el test de mediana. El test de la ji al cuadrado y el test exacto de Fisher se usaron para comparar, de manera univariante, las tasas de remisión completa y los métodos de Kaplan-Meier y el log-rank test para calcular la incidencia acumulada de recaída (CIR) y la supervivencia global (SG) para cada CNA. Estos tests también se realizaron censurando el seguimiento de los pacientes en el momento del trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH). La mortalidad relacionada con recaída y la mortalidad no relacionada con recaída se analizó con el test de eventos competitivos de Gray. Las CNA y las variables biológicas edad, número de leucocitos al diagnóstico, subtipo inmunológico, subtipo citogenético, número de CNA y tratamiento con p valores inferiores a 0,1 en los análisis univariantes, se incluyeron en el análisis multivariante. El modelo de regresión logística binaria se usó para identificar los factores predictivos para la obtención de la RC, mientras que los análisis multivariantes para la CIR y la SG se calcularon con el modelo de regresión de Cox o modelo de riesgos proporcionales. Los resultados se consideraron significativos cuando $p < 0,05$.

Para el segundo artículo y tercer artículo se usó la misma metodología estadística mencionada anteriormente. En el tercer artículo se usó el test de McNemar para comparar las proporciones de CNA en muestras pareadas de diagnóstico y recaída. El análisis de Gene Ontology de las CNA en primera recaída se usó para identificar procesos celulares significativamente recurrentes en los pacientes en recaída. Este análisis se realizó con el paquete de programas ChIPpeakAnno del proyecto Bioconductor añadiendo el test de Benjamini Hochberg con una p ajustada de $p < 0.01$ (600).

10. RESULTADOS

10.1. Artículo titulado: “Prognostic Significance of Copy Number Alterations in Adolescent and Adult Patients With Precursor B Acute Lymphoblastic Leukemia Enrolled in PETHEMA Protocols”

Las translocaciones cromosómicas confieren valor pronóstico en pacientes con LAL de todas las edades. Sin embargo, el impacto pronóstico de las alteraciones secundarias no está tan claro. Varios estudios en series de pacientes pediátricos sugieren que algunas alteraciones en el número de copias (CNA) (p.ej. deleciones de IKZF1) tienen valor predictivo de la evolución de la enfermedad. En pacientes adultos existen pocos trabajos al respecto y, al igual que ocurre con las LAL pediátricas, se han publicado resultados contradictorios.

La identificación de alteraciones genéticas con valor pronóstico contrastado abre la puerta a una estratificación de los pacientes por grupos de riesgo más precisa, realista e individualizada. Además, puede sentar las bases para desarrollar futuras aproximaciones terapéuticas que pueden mejorar la supervivencia de los pacientes. Con esta intención, se analizaron 190 muestras al diagnóstico de LAL de precursores B (LAL-B) de pacientes adultos tratados homogéneamente según los protocolos asistenciales del grupo PETHEMA. Las muestras de médula ósea o sangre periférica procedían de 12 hospitales españoles, así como de la colección de muestras del ICO-Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona.

Mediante *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA), se analizó la frecuencia de varias de las CNA más recurrentes en LAL-B (IKZF1, IKZF2, IKZF3, CDKN2A/B, PAX5, EBF1, BTG1, RB1, ETV6, región X/Y PAR1 [CRLF2, CSF2RA, IL3RA, P2RY8] y región 14q32.33 [IGHD, MTA1, KIAA0284]) en los 190 pacientes. Sin embargo, se excluyeron 48 pacientes por falta de datos de seguimiento, por ser LAL-T, LAL B madura, LA de fenotipo mixto, linfoma linfoblástico, o por violaciones del protocolo de tratamiento.

La serie de 142 pacientes fue representativa del total de pacientes con LAL-B tratados en los protocolos del Grupo PETHEMA, aunque mostró una tendencia a estar enriquecida en pacientes de alto riesgo. Las deleciones de CDKN2A/B fueron las alteraciones más frecuentes, seguidas de las deleciones de IKZF1, las cuales fueron significativamente más frecuentes en las LAL con cromosoma *Philadelphia* (Ph). La mayoría de las deleciones de IKZF1 se presentaron en heterocigosis y afectaron a determinados exones del gen. Varias de estas deleciones parciales o intragénicas generan isoformas dominantes negativas, las cuales fueron significativamente más frecuentes en pacientes con LAL Ph+. La incidencia de deleciones de este gen aumentaba con la

edad y era mayor en pacientes con hiperleucocitosis en el momento del diagnóstico. Los pacientes con delección de IKZF1 tenían significativamente más CNA adicionales que los pacientes sin delección y en muchos casos presentaban deleciones de EBF1 o PAX5. Los pacientes con delección de CDKN2A/B también presentaron un número significativamente mayor de CNA adicionales que los pacientes sin delección.

Con una mediana de seguimiento de 3,7 años, la tasa de remisión completa de la serie fue del 85%, la incidencia acumulada de recaída (CIR) a los 5 años del 46% [35-57%] y la supervivencia global a los 5 años del 43% [34%-52%]. En los análisis univariantes, los pacientes con delección de EBF1 tenían menor probabilidad de alcanzar la remisión completa (RC) que los pacientes sin delección (el 56% de los pacientes con delección de EBF1 alcanzaron la RC, frente al 89% de los pacientes sin delección [$p=0,003$]). Este hecho se observó tanto en la serie global como en la cohorte de pacientes con LAL Ph negativa. Los pacientes con delección de IKZF1 también presentaron una resistencia al tratamiento significativamente mayor en la cohorte con LAL Ph negativa.

En cuanto a la probabilidad de recaída, las deleciones de IKZF1 se asociaron con una mayor CIR tanto en la serie global (CIR a los 5 años IKZF1 WT 47% vs. IKZF1 DEL 70%, $p=0,019$) como en la cohorte con LAL Ph negativa (CIR a los 5 años IKZF1 WT 47% vs. IKZF1 DEL 71%, $p=0,036$). Un hecho significativo fue que no todos los pacientes con delección de IKZF1 tenían una mayor probabilidad de recaída. Los pacientes con delección del gen entero tenían una CIR comparable con la de los pacientes IKZF1 WT (IKZF1 DEL gen entero 31% vs. IKZF1 WT 47%) mientras que los pacientes con deleciones parciales eran los que realmente tenían mayor probabilidad de recaída (79%). Los pacientes con delección única de IKZF1 presentaron una tendencia a recaer menos que los pacientes con delección de IKZF1 y otras alteraciones adicionales (CIR a los 5 años IKZF1 DEL única 20% vs. IKZF1 DEL asociada a otras CNA 79%, $p=0,070$). Los pacientes con delección parcial de IKZF1 y más de 3 CNA tenían mayor probabilidad de CIR que los pacientes con delección parcial de IKZF1 y 3 o menos CNA (CIR a los 5 años IKZF1 DEL parcial y >3 CNA 89% vs. IKZF1 DEL parcial y ≤ 3 CNA 71%, $p=0,025$). Por el contrario, dentro de los pacientes con más de 3 CNA, aquellos con delección parcial de IKZF1 tenían mayor probabilidad de recaída que los que no tenían delección de IKZF1 (CIR a los 5 años >3 CNA y DEL parcial IKZF1 89% vs. >3 CNA IKZF1 WT 67%, $p=0,003$). Finalmente, las deleciones de este gen también influyeron negativamente en la supervivencia global (SG), tanto en la serie global (SG a los 5 años IKZF1 WT 50% vs. IKZF1 DEL 29%, $p=0,023$) como en los pacientes con LAL Ph negativa (SG a los 5 años IKZF1 WT 49% vs IKZF1 DEL 29%, $p=0,030$). Al contrario que para CIR, no se observaron diferencias en la SG según si las deleciones

de este gen eran parciales o del gen entero. Estos resultados no variaron significativamente tras censurar el seguimiento de los pacientes en el momento del trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH). Este pronóstico adverso está relacionado con la presencia de recaídas, ya que no se observaron diferencias significativas en cuanto a la mortalidad no relacionada con recaída entre los pacientes con y sin delección de IKZF1.

Las delecciones de CDKN2A/B también fueron un marcador de mal pronóstico tanto para la CIR como para la SG en la serie global, y en ambos grupos de LAL, Ph+ y Ph negativa. En cuanto a la CIR, los pacientes con delección de estos genes tenían una probabilidad de CIR a los 5 años del 68% frente al 46% de los pacientes sin delección ($p=0,010$) en la serie global. En la cohorte LAL Ph negativa, la CIR de los pacientes con delección fue del 65% frente al 46% de los pacientes sin delección ($p=0,040$) mientras que en la cohorte con LAL Ph+ todos los pacientes con delección recayeron frente al 42% de los pacientes sin delección ($p=0,071$). La SG de los pacientes con delección fue significativamente menor que la de los pacientes sin delección tanto en la serie global como en los subgrupos de LAL Ph+ y Ph negativa. En la serie global, la SG a los 5 años de los pacientes con delección fue del 25% frente al 57% de los pacientes sin delección ($p=0,001$). En la serie Ph negativa, las SG a los 5 años fueron de 26% y 56% respectivamente ($p=0,008$), mientras que en pacientes Ph+ las SG fueron del 14% y 54% respectivamente, ($p=0,025$). Se obtuvieron resultados similares tras censurar el seguimiento en el momento del TPH. La mortalidad no relacionada con recaída fue comparable entre ambos grupos. No se observaron diferencias ni en la SG ni en la CIR respecto al carácter heterocigoto u homocigoto de las delecciones.

El número de CNA, indicativo del grado de inestabilidad genómica, también fue un marcador capaz de discriminar el pronóstico de los pacientes. Los pacientes con más de 3 CNA tenían una CIR a los 5 años superior a la de los pacientes con 3 o menos CNA (76% vs. 46%, $p=0,008$) en la serie global y en el subgrupo con LAL Ph negativa (72% vs. 47%, $p=0,058$). Los pacientes con más de 3 CNA tenían menor probabilidad de SG a los 5 años que aquellos que tenían 3 o menos CNA, tanto en la serie global (24% vs. 52%, $p=0,003$) como en la cohorte con LAL Ph negativa (26% vs. 51%, $p=0,016$).

Finalmente se realizó un análisis multivariable para identificar cuáles de estas CNA tenían valor pronóstico independiente de otras variables como la edad, número de leucocitos, inmunofenotipo, cariotipo, número de CNA y tratamiento. La edad avanzada y las delecciones de EBF1 se asociaron a mayor resistencia al tratamiento, tanto en la serie global como en la cohorte con LAL Ph negativa. De hecho, los pacientes sin delección de EBF1 tenían una probabilidad de

alcanzar la RC 7,4 veces ($1/OR = 0,135$) mayor que los pacientes con delección. Un recuento de leucocitos superior a $30 \times 10^9/L$ junto con las delecciones de IKZF1 fueron factores asociados a mayor propensión a sufrir una recaída en la serie global. La edad avanzada y las delecciones de CDKN2A/B fueron factores predictivos de menor probabilidad de SG, tanto en la serie global como en los pacientes sin reordenamiento BCR-ABL1.

Cancer. 2015 Nov 1;121(21):3809-17. PMID: 26194343. DOI:10.1002/cncr.29579

Prognostic significance of copy number alterations in adolescent and adult patients with precursor B acute lymphoblastic leukemia enrolled in PETHEMA protocols.

Ribera J¹, Morgades M¹, Zamora L¹, Montesinos P², Gómez-Seguí I², Pratcorona M³, Sarrà J⁴, Guàrdia R⁵, Nomdedeu J⁶, Tormo M⁷, Martínez-Lopez J⁸, Hernández-Rivas JM⁹, González-Campos J¹⁰, Barba P¹¹, Escoda L¹², Genescà E¹, Solé F¹, Millá F¹, Feliu E¹, Ribera JM¹; Spanish PETHEMA Group and the Spanish Society of Hematology.

1. Clinical Hematology Department, Catalan Institute of Oncology at Germans Trias i Pujol Hospital, Jose Carreras Leukemia Research Institute, Autonomous University of Barcelona, Badalona, Spain.

2. Hematology Department, La Fe Hospital, Valencia, Spain.

3. Hematology Department, Hospital Clinic, August Pi i Sunyer Institute for Biomedical Research, Barcelona, Spain.

4. Hematology Department, Catalan Institute of Oncology at Duran i Reynals Hospital, Hospitalet de Llobregat, Spain.

5. Hematology Department, Catalan Institute of Oncology at Josep Trueta Hospital, Girona, Spain.

6. Hematology Department, Hospital de Sant Pau, Barcelona, Spain.

7. Hematology Department, Hospital Clínico, Valencia, Spain.

8. Hematology Department, Doce de Octubre Hospital, Madrid, Spain.

9. Hematology Department, Institute of Biomedical Investigation of Salamanca, Institute of Molecular and Cellular Biology of Cancer, Center of Investigation of Cancer, Spanish National Research Council at University of Salamanca, Hospital Clínico Universitario, Salamanca, Spain.

10. Hematology Department, Virgen del Rocío Hospital, Seville, Spain.

11. Hematology Department, Vall d'Hebron Hospital, Barcelona, Spain.

12. Hematology Department, Joan XXIII University Hospital, Tarragona, Spain.

10.2. Artículo titulado: “Alteraciones en el número de copias en pacientes adultos con leucemia linfoblástica aguda B madura, tratados con inmunoterapia específica”

En el año 1997, la World Health Organization (WHO) definió la leucemia aguda linfoblástica con morfología L3 como la manifestación leucémica del linfoma de Burkitt cuando éste infiltra la médula ósea (MO). Uno de los factores pronóstico adversos en el linfoma de Burkitt es la infiltración de la MO. Se ha analizado la presencia de alteraciones secundarias en muestras de linfoma, pero existen muy pocos trabajos que analicen estas alteraciones en muestras de médula ósea de pacientes con LAL B madura.

Mediante MLPA, se analizó la presencia de alteraciones en el número de copias (CNA) de genes típicamente desregulados en LAL de precursores B en 25 muestras de MO de pacientes con LAL B madura en el momento del diagnóstico. El objetivo de este trabajo fue analizar los perfiles genéticos de la LAL B madura para constatar si la infiltración leucémica de la MO confiere alguna característica genética distintiva. Para ello se comparó el perfil de CNA de la LAL B madura con el de las LAL de precursores B (ver trabajo anterior).

Los 25 pacientes analizados fueron tratados con el protocolo BURKIMAB-08 del Grupo PETHEMA. Todos tenían reordenamiento del gen C-MYC por cariotipo o por FISH, la mayoría de ellos con IGH (t(8;14)(q24;q32)). Veintiún pacientes alcanzaron la remisión completa, 2 fallecieron en inducción por infección, 2 recibieron terapia paliativa y el restante fue refractario. La supervivencia global y supervivencia libre de progresión a los 3 años fueron del 47% y 55%, respectivamente.

A excepción de IKZF3, todos los genes analizados presentaron CNA. Sin embargo, las frecuencias de estas CNA fueron diferentes a las observadas en la LAL de precursores B. Las deleciones de la región 14q32.33 (IGHD, MTA1 y KIAA0284) fueron las más recurrentes (40%) y su frecuencia fue claramente superior a la registrada en las LAL de precursores B del primer artículo (16%). También se observaron deleciones de genes de diferenciación linfocítica (IKZF1, EBF1, PAX5 y IKZF2, 4%-8%) y de genes reguladores del ciclo celular (CDKN2A/B y RB1, 8%-12%), aunque con menor frecuencia que las de las LAL de precursores B. No se identificó ningún patrón de CNA con valor predictivo en cuanto a infiltración del sistema nervioso central, duración de la remisión completa o supervivencia global.

Med Clin (Barc). 2016 Dec 2;147(11):488-491.

PMID: 28126143. DOI: 10.1016/j.medcli.2016.07.035

Copy number alterations in adult patients with mature B acute lymphoblastic leukemia treated with specific immunochemotherapy.

Ribera J¹, Zamora L¹, García O¹, Hernández-Rivas JM², Genescà E³, Ribera JM¹.

1. Clinical Hematology Department, ICO-Hospital Germans Trias i Pujol, Josep Carreras Leukaemia Research Institute (IJC), Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Barcelona, España.

2. Hematology Department, Hospital Universitario de Salamanca, IBSAL, IBMCC, Centre for Cancer Research Universidad de Salamanca-CSIC, Salamanca, España.

3. Clinical Hematology Department, ICO-Hospital Germans Trias i Pujol, Josep Carreras Leukaemia Research Institute (IJC), Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Barcelona, España.

Electronic address: egenesca@carrerasresearch.org.

10.3. Artículo titulado: “Copy number profiling of adult relapsed B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia reveals potential leukemia progression mechanisms”

Las recaídas son un hecho frecuente en la LAL del adulto y tienen un pronóstico muy desfavorable (supervivencia global post-recaída del 10%). Varios estudios en LAL pediátrica han evidenciado que no existe un patrón de alteraciones genéticas recurrente o característico de las LAL en recaída. Sin embargo, se han identificado algunas alteraciones con más incidencia en muestras en recaída que en muestras al diagnóstico, lo que sugiere que podrían jugar un papel activo en la progresión de la enfermedad. El perfil genético de las LAL del adulto en recaída está poco explorado en comparación con el de los niños.

El objetivo de este trabajo fue analizar los patrones de evolución clonal e identificar alteraciones genéticas con posible implicación en la progresión de la LAL de precursores B (LAL-B) del adulto. Se disponía de muestras de médula ósea o de sangre periférica de 31 pacientes en primera recaída. También se disponía de muestra al diagnóstico de 21 de estos 31 pacientes. Se analizó el perfil de alteraciones en el número de copias de estas muestras mediante MLPA y SNP arrays.

En primer lugar, se analizaron, mediante MLPA, las 31 muestras en primera recaída. Con una mediana de seguimiento de 12,4 meses, la mediana de supervivencia global (SG) de la serie fue de 8 meses. Las deleciones de CDKN2A/B, IKZF1 y PAX5, así como las duplicaciones de la región X/Y PAR1 fueron las CNA más frecuentes. No se identificó ninguna CNA con valor pronóstico. Sin embargo, el número de CNA por muestra tuvo valor predictivo, ya que los pacientes con más de 3 CNA tenían peor pronóstico que los pacientes con 3 o menos CNA (SG >3 CNA 4,2 meses vs. SG ≤3 CNA 9,7 meses, $p=0,042$). Cuando se analizaron las CNA en muestras pareadas de diagnóstico y recaída de 21 de estos pacientes, se observó una tendencia a adquirir deleciones bialélicas de CDKN2A/B en la recaída. Así, de 8 pacientes que presentaban deleciones heterocigotas al diagnóstico, 7 de ellos las presentaron en homocigosis en la recaída (test de McNemar, $p=0,070$).

Se disponía de suficiente ADN de 19 de estas 21 muestras pareadas de diagnóstico y recaída para el análisis por SNP arrays. Se obtuvieron resultados fiables de:

- muestras pareadas diagnóstico y 1ª recaída de 10 pacientes (de un paciente también se disponía de muestra en 2ª recaída).
- muestra pareada de diagnóstico y 2ª recaída de 1 paciente.
- muestra pareada de diagnóstico, 2ª recaída y 3ª recaída de 1 paciente.

- muestras en 1ª y 2ª recaída de 2 pacientes.
- muestras al diagnóstico de 4 pacientes.
- muestra en 1ª recaída de 1 paciente.

Se detectaron 554 CNA (409 deleciones -DEL, 125 duplicaciones -DUP, 20 pérdidas de heterocigosidad -CN-LOH) en las 35 muestras de los 19 pacientes. Se observó un incremento significativo en el número de CNA durante la progresión de la leucemia. Al diagnóstico, la mediana de CNA por paciente fue de 12,3 (9,6 DEL, 2,3 DUP y 0,4 CN-LOH), en la primera recaída de 17,8 (12,6 DEL, 4,2 DUP y 1 CN-LOH) y en la segunda recaída de 21,0 (14,6 DEL, 6,4 DUP y 0.0 CN-LOH) (test de McNemar, $p=0,007$). En todas las muestras pareadas entre diagnóstico y primera recaída ($n=10$) se evidenció un origen clonal común, ya que todas ellas presentaban CNA comunes. En 6 casos, la muestra de la recidiva tenía CNA en común con la del diagnóstico, pero también había adquirido y perdido otras CNA (evolución clonal a partir de un clon ancestral al del diagnóstico). En 4 casos, el clon de la recaída procedía de un clon más evolucionado que el del diagnóstico, ya que compartía todas las CNA con el clon del diagnóstico, pero había adquirido nuevas CNA. Finalmente, 1 paciente mostró resistencia primaria al tratamiento, ya que el clon responsable de la recaída presentaba exactamente las mismas CNA que el clon detectado en el diagnóstico.

Las CNA más frecuentes en muestras de recaída en los pacientes con muestra pareada de diagnóstico y 1ª recaída fueron las deleciones de CDKN2A/B (10/10, 7 de ellas en homocigosis), MTAP (10/10), PAX5 (7/10), MLLT3 (6/10), PTPRD (5/10), IKZF1 (4/10), HOXA11 (3/10), KMT2E (3/10), PRDM12 (3/10), ETV6 (3/10) y VPB1 (3/10); y las duplicaciones de 17q (4/10), X/Y PAR1 (CRLF2 4/10 e IL3RA 5/10), 1q24.2-q41 (3/10), 8q21.3-q24.3 (3/10) y +21 (3/10), entre otras. Los análisis de *gene ontology* en muestras de 1ª recaída de estos pacientes identificaron un enriquecimiento significativo de deleciones en genes implicados en las vías de diferenciación y activación de los linfocitos B, entre otros.

Analizando las muestras en recaída ($n=15$), no se identificó un patrón recurrente de CNA, aunque existía cierta recurrencia en algunas regiones del genoma. Se detectaron duplicaciones y deleciones en genes con un papel contrastado en la leucemogénesis (CD34, FOXO3, IKZF1, BAALC, MYC, PAX5, CDKN2A/B, RAG2, ATM, ETV6, RB1, TP53, ABCC3, RUNX1, ERG, hsa-miR-155, VPB1, CRLF2 y IL3RA, entre otros) en al menos 3/15 (20%) de los pacientes. Dado el pequeño tamaño de la muestra, no se identificaron cambios significativos en la frecuencia de CNA entre el diagnóstico y la recaída.

Finalmente, las CNA más frecuentemente adquiridas *de novo* en recaída en pacientes con muestra al diagnóstico y 1ª recaída o 2ª recaída (n=12) fueron duplicaciones que afectaban a genes involucrados en la proliferación celular, homeostasis de las HSC o resistencia al tratamiento (p.ej. FLT3, PHF10 y ABCC3), y deleciones de genes con función epigenética (KDM6A) o miembros del complejo cohesina (STAG2).

Este trabajo ha sido enviado a revista para publicación.

11. DISCUSIÓN

La evidencia científica indica que las LAL son muy heterogéneas genéticamente, hasta el punto de que se podría afirmar que no existe una LAL genéticamente igual a otra. Esta puede ser una de las razones clave de la variabilidad en el grado de respuesta al tratamiento. En este sentido, la comunidad internacional trata de clasificar las LAL en función de sus lesiones genéticas y fenotípicas para administrar tratamientos cada vez más personalizados en función de las características específicas de cada LAL.

El avance del conocimiento ha ido en paralelo con los avances tecnológicos. En el año 1958 se reportó el primer cariotipo de un paciente con LAL (601). El estudio del cariotipo por bandas G contribuyó decisivamente en la identificación de aberraciones cromosómicas en pacientes de LAL. En el año 1970 se identificó por primera vez un caso de LAL con cromosoma *Philadelphia* (602). A finales de los años 1970 y principios de los 1980 se evidenció que las LAL eran heterogéneas en cuanto al cariotipo y se intuía que éste podría tener valor predictivo de la evolución de la enfermedad (120,603,604). En la actualidad nadie duda del valor pronóstico del cariotipo en la LAL y éste es un parámetro que tienen en cuenta todos los protocolos terapéuticos para asignar el tratamiento. Las técnicas basadas en hibridación de sondas o anticuerpos, PCR y secuenciación también contribuyen a mejorar la caracterización de las alteraciones genéticas con implicación pronóstica a nivel de gen individual (605–607). Estos avances técnicos, junto con la optimización de los esquemas terapéuticos, han contribuido decisivamente a la mejoría de las tasas de supervivencia de los pacientes con esta neoplasia.

Más recientemente, las tecnologías basadas en matrices (*arrays*) y secuenciación de nueva generación han identificado nuevas mutaciones, CNA, pérdidas de heterocigosidad y alteraciones a nivel epigenético que podrían jugar un papel activo y decisivo en la evolución de la LAL. Hasta la fecha, se ha generado muchísima información que ayuda a comprender la patogenia de la LAL y que, seguramente, tendrá impacto en el tratamiento de los pacientes en un futuro no muy lejano. Parece existir un sinnúmero de combinaciones de alteraciones genéticas capaces de desarrollar y dirigir el comportamiento de las LAL. Existen varios factores pronóstico “candidatos” en LAL a nivel de gen individual, pero por el momento se tienen poco en cuenta en la toma de decisiones terapéuticas, al contrario que el cariotipo. Es posible que la falta de consistencia en el significado pronóstico de estos genes en algunos estudios dificulte su incorporación a los algoritmos de asignación de pacientes por grupos de riesgo.

Dado que las leucemias se originan por la adquisición de al menos 2 eventos oncogénicos y que las alteraciones a nivel de cariotipo (translocaciones y aneuploidías) son el primer evento en la

leucemogénesis, no cabe duda de que las alteraciones a nivel de gen individual (segundo evento oncogénico) también tienen que influir en la evolución de la enfermedad y, por tanto, deben tener valor pronóstico. La evaluación de dicho impacto pronóstico debe realizarse en cohortes de pacientes tratados homogéneamente para evitar el sesgo inducido por el tratamiento.

El segundo artículo de esta Tesis Doctoral se centró en analizar la frecuencia y significado pronóstico de CNA en pacientes adultos con LAL B madura o leucemia de Burkitt (LAL3). Este subtipo de "LAL" es el que presenta mejores tasas de supervivencia en la población adulta. Dado este buen pronóstico, es probable que las LAL B maduras tengan una firma génica diferente de las LAL de precursores B. La genética de los clones de linfoma de Burkitt que infiltran la médula ósea está muy poco explorada, a diferencia de los casos de linfoma de Burkitt sin infiltración medular, que están mejor caracterizados.

La supervivencia global a los 5 años de la serie fue del 55%, en línea con los resultados publicados en la cohorte total de pacientes tratados con el esquema BURKIMAB-08 del Grupo PETHEMA (545). Las deleciones de CDKN2A/B (2/3 de ellas en homocigosis) y de RB1 se detectaron en este estudio con una frecuencia similar a la descrita por el grupo de la Universidad de Salamanca en una serie de 40 linfomas de Burkitt, 19 de los cuales eran leucemias de Burkitt. Curiosamente, en aquel estudio todos los casos de deleción de RB1 y tres cuartas partes de los casos de deleción de CDKN2A/B se dieron en muestras de leucemia de Burkitt (608). La deleción de estos genes es característica de linfomas agresivos, como el subtipo de célula B activada del linfoma difuso de células grandes B o el síndrome de Richter. Esto sugiere que la desregulación del ciclo celular debida a la pérdida de estos genes podría conferir el alto grado de proliferación y diseminación que caracteriza a estos linfomas y al linfoma de Burkitt que infiltra la médula ósea. El hecho más llamativo de nuestra serie fue la elevada incidencia de deleciones de la región 14q32.33 (40%). Esta región contiene varios genes entre los que destacan MTA1, KIAA0284 (CEP170B) e IGHD. En la mayor parte de los casos, las deleciones solo afectaban al gen IGHD. Existe la posibilidad de que esta elevada tasa de deleciones sea el reflejo de la recombinación de los fragmentos VDJ y la hipermutación no oncogénica de este gen, aunque estas deleciones no oncogénicas suelen darse en la región V_h del locus de IGH (609). También cabe la posibilidad de que estas deleciones se produzcan como consecuencia del reordenamiento del gen c-MYC con IGH. Sin embargo, también es posible que las deleciones de IGH se produjeran en el alelo no translocado, tal y como ocurre en algunas entidades como el linfoma cutáneo primario de célula grande, en los que no se observan reordenamientos de IGH (610). Dada la poca cantidad de sondas de MLPA existentes para esta región, tampoco se puede excluir la posibilidad de que la incidencia de deleciones en

otros genes de esta región sea más elevada. Las deleciones de MTA1 se han descrito en tumores de ovario, mama y páncreas (entre otros), en los que la sobreexpresión de MTA1 se asocia con una mayor probabilidad de metástasis (611–613). También cabe mencionar que las deleciones de MTA1 y KIAA0284 se han descrito en un 24% de LAL de precursores B pediátricas y se identificaron como un factor de mal pronóstico (238). En el contexto de los linfomas de Burkitt, Hernández-Rivas *et al* detectaron una frecuencia de deleciones de la región 14q32.33 inferior a la de este estudio (10% de las LAL3). Otros genes en esta región o muy próximos a esta región son XRCC3, implicado en la reparación del ADN, y TRAF3, un gen recurrentemente delecionado en linfoma difuso de célula B y linfoma de Hodgkin (614,615). En este sentido hemos realizado un array enriquecido con sondas en el brazo 14q para determinar la región comúnmente delecionada e identificar los genes afectados en estos pacientes. En definitiva, nuestros resultados parecen indicar que la definición de LAL B madura es un artificio, ya que molecularmente se asemeja más a los linfomas de Burkitt que a las LAL de precursores B. Si bien es cierto que esta entidad presenta CNA en genes típicamente desregulados en la LAL de precursores B, las frecuencias de estas CNA no son comparables con las observadas en esta última entidad. Es probable que la menor frecuencia de CNA con significado pronóstico adverso presentes en la LAL B madura explique, al menos en parte, el pronóstico más favorable de esta entidad en la población adulta. Por otra parte, estas diferencias en el pronóstico también pueden deberse a que la LAL B madura presenta una muy buena respuesta al tratamiento con anticuerpos antiCD20. Al contrario de lo que ocurre en la LAL B madura, en la que la expresión de CD20 es universal, solo el 30%-50% de las LAL de precursores B expresa CD20 (616).

A diferencia de la LAL B madura, la LAL de precursores B del adulto presenta una mayor tasa de recaídas, que ensombrece el pronóstico de los pacientes. Las aproximaciones terapéuticas actuales consiguen curar a menos de la mitad de los enfermos. Una mejor estratificación de los pacientes por grupos de riesgo puede contribuir a mejorar su supervivencia, por lo que es preciso seguir estudiando el papel que desempeñan las alteraciones genéticas en la patogénesis de la leucemia.

En este sentido, el primer trabajo de esta tesis consistió en analizar la frecuencia y significado pronóstico de CNA en genes recurrentemente alterados en LAL de precursores B (LAL-B). Estas CNA se habían identificado previamente en estudios de SNP arrays, principalmente en series de pacientes pediátricos, y algunas de ellas habían demostrado tener significado pronóstico (76,237). Sin embargo, no todos los estudios efectuados en LAL pediátrica han reproducido estos resultados. En la LAL-B del adulto existen muchos menos trabajos que analicen el impacto de

estas CNA y, al igual que ocurre con los niños, no existe un consenso claro sobre la importancia que tienen en el pronóstico de los pacientes (77,162,271,617–620). La población estudiada en el primer trabajo de esta Tesis Doctoral incluyó 142 pacientes adolescentes y adultos diagnosticados de LAL-B incluidos en los protocolos asistenciales del Grupo PETHEMA. La frecuencia de deleciones del gen IKZF1 en nuestra cohorte fue similar a la descrita por el grupo francés GRAALL (*Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia*), mientras que fue ligeramente distinta de las de los grupos inglés UKALL e italiano GIMEMA (*Gruppo Italiano Malattie EMatologiche dell'Adulto*). Hay que tener en cuenta que nuestra cohorte estaba formada mayoritariamente por pacientes con LAL Ph negativa y con criterios de alto riesgo. La serie italiana reportó una mayor frecuencia de deleciones de IKZF1, ya que estaba formada mayoritariamente por pacientes con LAL Ph+ y con una mediana de edad superior a la nuestra (las deleciones de IKZF1 son más frecuentes en las LAL Ph+ y en pacientes de edad avanzada). Por el contrario, la serie de pacientes con LAL Ph negativos del grupo británico tenía una mediana de edad más joven y con mayor proporción de pacientes de riesgo intermedio que la nuestra, por lo que no es de extrañar que la frecuencia de deleciones de este gen fuera menor que la del presente estudio.

Centrándose en el valor pronóstico de las CNA analizadas, las deleciones de EBF1 fueron un marcador de resistencia al tratamiento, ya que los pacientes con deleciones de este gen tenían menor probabilidad de alcanzar la remisión completa. En LAL pediátrica, el grupo de Saint Jude había identificado las deleciones de este gen como un factor predictivo de recaídas en una cohorte exploratoria, aunque no pudo reproducir estos resultados en la cohorte de validación (76). Posteriormente, el grupo de la Universidad de Nuevo México observó la presencia de deleciones de EBF1 en un grupo de pacientes con muy mal pronóstico, muy probablemente LAL Ph *like* (224). Por su parte, den Boer *et al* identificaron la presencia de deleciones de EBF1 exclusivamente en el subgrupo de LAL Ph *like* y las relacionaron con resistencia a L-asparaginasa y daunorubicina (75). La LAL Ph *like* se caracteriza por la presencia de deleciones en varios genes de diferenciación linfoide, especialmente IKZF1, EBF1 y PAX5 (231). Curiosamente, en el presente estudio detectamos una asociación significativa entre la presencia de deleciones de IKZF1 y EBF1. Además, la mitad de los casos con deleción de EBF1 presentaban deleciones concomitantes de PAX5. La presencia de múltiples lesiones en genes de diferenciación linfoide podría detener la diferenciación de los linfoblastos en estadios muy próximos al de la HSC y estas células podrían conservar algunas características de HSC, entre ellas la resistencia al tratamiento. En la LAL-B del adulto, Moorman *et al* identificaron las deleciones de EBF1 como un marcador de mal pronóstico en LAL Ph negativas en análisis univariantes (162). Posteriormente, el grupo UKALL publicó una

clasificación basada en el valor pronóstico del cariotipo combinado con el de varias CNA, en la que consideraba las deleciones de este gen como factores de mal pronóstico junto con las deleciones de IKZF1, CDKN2A/B, X/Y PAR1 o RB1 (366). Un artículo publicado recientemente sostiene que las deleciones de EBF1 son un marcador de mal pronóstico para la supervivencia libre de enfermedad (620).

Las deleciones del gen IKZF1 merecen especial atención, ya que su significado pronóstico ha motivado una gran cantidad de estudios y, pese a ello, no existe un consenso claro acerca de su impacto en la supervivencia de los pacientes de cualquier edad. En nuestro estudio, las deleciones de este gen fueron un marcador de propensión a recaída en la serie global pero no en el subgrupo de pacientes con LAL Ph negativa. El grupo italiano GIMEMA ha descrito que las deleciones de IKZF1 son un marcador de mal pronóstico en pacientes adultos con LAL Ph+ (77). En pacientes con LAL Ph negativa, el grupo francés GRAALL ha relacionado la presencia de deleciones de IKZF1 con mayor incidencia acumulada de recaídas, mientras que el grupo inglés UKALL no ha encontrado significado pronóstico en estas alteraciones (162,271). Existen metanálisis en alrededor de 1000 pacientes adultos y en casi 5000 pacientes pediátricos con LAL-B que sugieren que las deleciones de este gen son un marcador de mal pronóstico (276,621). El grupo italiano de LAL pediátrica AIEOP (*Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica*) sugiere que las deleciones de IKZF1 son un marcador de inestabilidad genómica y que esta inestabilidad es la responsable del pronóstico desfavorable de los pacientes con deleciones de este gen (277). En nuestro estudio también observamos que los pacientes con deleciones de IKZF1 presentaban mayor cantidad de CNA adicionales y que éstos tenían peor pronóstico que los pacientes con deleción aislada del gen. Sin embargo, dentro del grupo de pacientes con más de 3 CNA, aquellos con deleción de IKZF1 presentaban peor pronóstico que los pacientes sin deleción, lo que sugiere que la desregulación de IKZF1 *per se* podría comportar mal pronóstico. Por otra parte, algunos autores sugieren que el valor pronóstico de las deleciones de IKZF1 está supeditado a otras alteraciones de mal pronóstico como por ejemplo la presencia del cromosoma *Philadelphia*. La isoforma dominante negativa Ik6 es la más habitual en pacientes con LAL Ph+, tal y como también hemos observado en este estudio (77,622). Las isoformas dominantes negativas son las que conllevan mayor capacidad oncogénica y peor pronóstico en modelos animales, ya que inhiben la función de las proteínas codificadas por el alelo no delecionado y la actividad normal de otros miembros de la familia IKZF (259,264). Algunos autores sugieren que este escenario también es reproducible en la LAL humana (622–624). Aunque la isoforma Ik6 podría comportar peor pronóstico que otras isoformas, un estudio internacional que evaluó el impacto pronóstico de diferentes isoformas de

IKZF1 en LAL-B pediátrica no mostró diferencias en el pronóstico en función de la isoforma generada por la delección (278). Otra posibilidad para explicar estas diferencias en el impacto pronóstico de las delecciones de IKZF1 en función de la presencia o no del cromosoma *Philadelphia*, sería que las isoformas generadas por las delecciones de IKZF1 en pacientes con LAL Ph+ interactúan con otras vías desreguladas en la LAL Ph+ y esta interacción confiere un fenotipo más agresivo que aquellas interacciones en pacientes con LAL Ph negativa. El estudio del grupo francés y el nuestro sugieren que son las delecciones que generan isoformas parciales (entre ellas la Ik6) las que confieren mal pronóstico, mientras que los pacientes portadores de delecciones que involucran a todo el gen tendrían el mismo pronóstico que los pacientes sin delección (271). Es posible que los pacientes con delecciones parciales tengan mayor expresión de isoformas dominantes negativas que impidan la correcta función de las proteínas codificadas por el alelo WT. Por el contrario, en los pacientes con delección del gen entero en heterocigosis, el alelo no delecionado podría compensar el efecto de la delección del otro alelo sin verse perjudicado por las isoformas dominantes negativas, resultando en una menor desregulación de la transcripción mediada por IKZF1 y otros miembros de la familia IKZF. En este sentido, hemos realizado un estudio mediante RNAseq para detectar el perfil de expresión génica de los pacientes con delecciones de IKZF1 incluyendo pacientes con diferentes tipos funcionales de delección. Actualmente, se están analizando los resultados obtenidos tras el análisis bioinformático de los datos crudos de la secuenciación. Otro aspecto a tener muy en cuenta al evaluar el significado pronóstico de las alteraciones de éste o cualquier gen es la presencia de otras alteraciones concomitantes con significado pronóstico. Un ejemplo son las delecciones del gen ERG, que son un marcador de buen pronóstico incluso en casos de LAL con delección de IKZF1 (225,226). Aunque la frecuencia de las delecciones de ERG es baja y no explica la disparidad de resultados entre los diversos grupos de trabajo en cuanto al significado pronóstico de las delecciones de IKZF1, es posible que existan otras alteraciones no identificadas todavía que puedan modular su impacto pronóstico. Finalmente, hay que tener presente que la gran mayoría de los estudios que han evaluado el significado pronóstico de las delecciones de este gen son retrospectivos y con tratamientos no siempre homogéneos. Una excepción es el ensayo clínico realizado por el grupo francés de LAL pediátrica EORTC-CLG 58951, en el que se aleatorizaba a los pacientes de riesgo intermedio con delecciones de IKZF1 a recibir o no ciclos adicionales de reinducción con vincristina y esteroides durante el mantenimiento. Los pacientes con delecciones de IKZF1 que recibieron terapia de mantenimiento adicional mostraron mejor supervivencia libre de enfermedad que los pacientes con delecciones que no la recibieron, incluso fueron comparables con la de los pacientes sin delección (272). Otro estudio del grupo francés argumenta que los pacientes con delecciones

parciales tienen mayor probabilidad de supervivencia si reciben un TPH alogénico (625). Pese al debate acerca del impacto pronóstico de estas alteraciones, el grupo holandés de LAL pediátrica DCOG también ha incorporado un año adicional de mantenimiento para aquellos pacientes de riesgo intermedio con deleciones de IKZF1 en su protocolo actual DCOG-11. Estos son ejemplos claros de cómo los datos de laboratorio se traducen en mejoras en el tratamiento, con impacto en la supervivencia de los pacientes. Sin embargo, el verdadero significado pronóstico de ésta y otras alteraciones genéticas debe acabar de definirse en el seno de más estudios prospectivos.

Los genes CDKN2A y 2B fueron los más recurrentemente alterados en esta serie y en la mayoría de series de LAL-B del adulto (162,626). El impacto pronóstico de las deleciones de estos genes es controvertido tanto en series de pacientes pediátricos como en adultos, aunque es posible que tenga más influencia en la LAL del adulto. La consolidación con un TPH en pacientes con deleción ofrece más opciones curativas que la quimioterapia sin TPH (627). Dado que este gen ha centrado muchas investigaciones en el pasado, es probable que las diferencias en la metodología para detectar las deleciones de estos genes estén detrás de estas discrepancias. En nuestro estudio, las pérdidas de CDKN2A/B se asociaron con una menor probabilidad de supervivencia global, tanto en la serie global como en pacientes con LAL Ph negativa. Esta menor supervivencia podría ser atribuible a una mayor incidencia de recaídas, ya que las deleciones de estos genes fueron un marcador de mayor CIR en el análisis univariante. Además, la mortalidad no relacionada con recaída de los pacientes con o sin deleciones fue similar. No se detectaron diferencias en el pronóstico entre pacientes con deleciones heterocigotas u homocigotas, al igual que en el estudio del grupo inglés (162). La haploinsuficiencia o la inactivación del alelo no delecionado mediante mecanismos epigenéticos podrían equiparar la cantidad de expresión de estos genes resultando en un mismo fenotipo. Sin embargo, un estudio reciente sugiere que la infraexpresión de este gen sólo se da en casos de deleción homocigota (362). Este hecho apoyaría los estudios que solo atribuyen valor pronóstico a las deleciones bialélicas del gen (362,369). Estos hechos, junto con los resultados que se obtuvieron en el tercer artículo de esta tesis, inducen a pensar que quizás los pacientes con deleciones de CDKN2A/B presentan, en realidad, una mezcla de clones con diferente dotación alélica en el momento del diagnóstico.

En este primer estudio se trató de identificar marcadores con valor pronóstico en pacientes adultos con LAL de precursores B en el momento del diagnóstico. Dada la elevada tasa de recaídas que presenta la LAL-B del adulto, resulta evidente que estos enfermos necesitan con urgencia tratamientos alternativos a los actuales. Y más aún cuando la aparición de recaídas es prácticamente sinónimo de progresión fatal de la enfermedad, ya que solo el 10% de los

pacientes en recaída sobrevive a la terapia de rescate. Por tanto, es imprescindible identificar cuáles son las alteraciones genéticas que comportan resistencia al tratamiento y conducen a la recaída. Teniendo en cuenta estas premisas, se propuso analizar el perfil genético de la LAL-B del adulto en recaída en el tercer artículo de esta tesis.

En primer lugar, se obtuvieron muestras de 31 pacientes en 1ª recaída y se analizaron las mismas alteraciones genéticas que evaluamos en las muestras al diagnóstico mediante MLPA. No se observaron diferencias significativas en la frecuencia de las CNA respecto al diagnóstico, probablemente porque la serie del diagnóstico estaba compuesta por pacientes de alto riesgo con una elevada frecuencia de CNA de mal pronóstico y, por tanto, potencialmente recidivantes. En este sentido, las deleciones de IKZF1 y CDKN2A/B fueron las CNA más recurrentes en recaída. Un hecho llamativo fue el aumento de la proporción de deleciones homocigotas de CDKN2A/B en recaída respecto al diagnóstico. Debido al pequeño tamaño de la serie y al mal pronóstico que tienen todos los pacientes en recaída (mediana de supervivencia global de 8 meses en esta serie), no fuimos capaces de identificar ninguna CNA con valor predictivo post-recidiva. Sin embargo, el número de CNA por paciente se asoció a un pronóstico diferente. Todos los pacientes con más de 3 CNA murieron antes del primer año y medio post-recaída mientras que 5 pacientes con 3 o menos CNA estaban vivos en el momento del estudio. Es probable que el peor pronóstico de los pacientes con mayor número de CNA se deba a que estas LAL disponen de más mecanismos para contrarrestar o eludir el efecto del tratamiento y, probablemente, presenten mayor heterogeneidad clonal.

Dado el pequeño tamaño muestral y la incapacidad de identificar ninguna CNA con valor pronóstico, se decidió tratar de identificar alteraciones genéticas con posible implicación en la progresión de la enfermedad a nivel de todo el genoma. Si se comparan muestras pareadas de diagnóstico y recaída de los mismos pacientes, es posible detectar qué alteraciones se mantienen entre diagnóstico y recaída y cuales se adquieren *de novo* durante la progresión de la leucemia. Estas alteraciones adicionales muy probablemente confieren una ventaja para sobrevivir al tratamiento y mantener el fenotipo leucémico (alteraciones *driver*). Por el contrario, las alteraciones que desaparecen en recaída son las sensibles al tratamiento y no son imprescindibles para la supervivencia del clon recidivante (alteraciones *passenger*). Con este raciocinio, se analizaron muestras pareadas entre diagnóstico y recaída de 19 de estos 31 pacientes mediante SNP arrays. Estas muestras se habían analizado previamente con MLPA, por lo que pudimos comparar el rendimiento de ambas técnicas. Se obtuvieron resultados concordantes en un 80% de las CNA comparadas. Los resultados discordantes se dieron en muestras con una infiltración

tumoral próxima al límite de detección de la MLPA. Los SNP arrays tienen una sensibilidad del 15%-20% frente al 30%-40% de la MLPA. Quizás por este motivo la frecuencia de deleciones de IKZF1 o EBF1 (2 marcadores de resistencia al tratamiento identificados en el primer estudio) fueron ligeramente inferiores en la recaída respecto al diagnóstico en el análisis con MLPA. Precisamente los casos en que estas CNA desaparecieron en la recaída pertenecían a muestras con baja infiltración tumoral en la muestra de recaída. Por el contrario, los SNP arrays fueron capaces de detectar la permanencia de estas CNA entre diagnóstico y recaída en todos los casos. Ambas técnicas coincidieron en la detección de una tendencia a adquirir deleciones de CDKN2A/B en homocigosis durante la progresión de la leucemia. Un 83% de las deleciones de CDKN2A/B en recaída eran bialélicas frente al 31% detectado en el momento del diagnóstico (test de McNemar $p=0,070$). Este hecho, junto con la elevada frecuencia de deleciones en recaída, sugiere que la desregulación por completo de este gen es necesaria para la progresión de la leucemia en una proporción significativa de casos. También induce a pensar que los pacientes que presentan deleción de estos genes en el diagnóstico son, en realidad, portadores de clones minoritarios con deleción homocigota. La presencia de clones de mayor tamaño con CDKN2A/B WT o en heterocigosis podría enmascarar la presencia de estos subclones homocigotos, los cuales serían capaces de sobrevivir a la terapia y se expandirían hasta constituir el clon mayoritario en la recaída.

Los SNP arrays también permitieron identificar un aumento significativo del número de CNA por paciente durante la progresión de la leucemia. Las medianas de número de CNA aumentaron desde 12,3 en el momento del diagnóstico, hasta 17,8 en la primera recaída y 21 en la segunda recaída (test de McNemar $p=0,007$). Esto indica que, a mayor cantidad de alteraciones, mayor capacidad adaptativa a la presión selectiva ejercida por la quimioterapia. Los clones con mayor número de vías de señalización desreguladas tienen más opciones de evadir o contrarrestar la inhibición de las vías sobre las que actúa la quimioterapia.

Además de analizar qué alteraciones aparecen y desaparecen durante la progresión de la leucemia e intuir cuáles de ellas son relevantes para la resistencia al tratamiento, la comparación de muestras pareadas entre diagnóstico y recaída también permitió identificar los patrones de evolución clonal y compararlos con los reportados en niños con LAL. En más de la mitad de los pacientes, el clon responsable de la recaída procedía de un clon ancestral al detectado en el diagnóstico. Una tercera parte de los pacientes presentó una evolución clonal a partir del clon detectado en el diagnóstico, mientras que una paciente presentó el mismo clon que en el diagnóstico. Por el momento, se desconoce si el tipo de evolución clonal influye en la respuesta al

tratamiento de rescate. La duración de la remisión completa antes de presentar la recaída es un factor pronóstico para la supervivencia global tras la recidiva (11). Pese a que la paciente que presentó el mismo clon en el diagnóstico y la recaída fue la que presentó la menor duración de la remisión completa (4 meses), no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en las medianas de duración de la remisión completa en función del tipo de evolución clonal. Estos resultados son comparables con los publicados en pacientes pediátricos, lo que sugiere que los patrones de evolución clonal son similares en todas las edades, aunque la frecuencia de las CNA puede diferir en función de la edad, lo que podría explicar las diferencias en la supervivencia post-recaída entre niños y adultos (66).

Como se ha comentado anteriormente, las LAL en recaída presentan una gran cantidad de CNA. Además, el grado de heterogeneidad de éstas es muy alto, por lo que no existe una firma recurrente de CNA en recaída. Este análisis sugiere que no hay una LAL exactamente igual a otra tanto en el diagnóstico como en la recaída y que existen numerosas combinaciones de alteraciones genéticas con capacidad leucemogénica. Sin embargo, ciertas vías metabólicas estaban afectadas por CNA en más de un 20% de los pacientes en el momento de la recaída. Además de CDKN2A/B, otras CNA afectaron a genes que regulan el avance del ciclo celular (p.ej. RB1 y CDKN1B). Los pacientes con delección homocigota de CDKN2A/B no expresan este gen supresor de tumores y serían candidatos a recibir tratamientos alternativos con inhibidores de CDK. Los pacientes con delecciones concomitantes de CDKN2A/B y RB1 tendrían una desregulación del ciclo celular todavía mayor que los pacientes con delección de CDKN2A/B. Esta desregulación conlleva la sobreexpresión de factores proliferativos E2F los cuales, a su vez, estimulan la expresión del gen C-MYC. Además de inhibidores de CDK, estos pacientes serían tributarios de recibir inhibidores del bromodominio BET de los genes C-MYC, IL7R y E2F para reprimir su expresión (405). Otras delecciones frecuentes afectaron a genes que promueven la diferenciación linfocítica (p.ej. IKZF1, PAX5, RAG2, BLNK, VPREB1). Dado que es más fácil inhibir farmacológicamente la sobreexpresión de un gen que su infraexpresión, el tratamiento dirigido a paliar el efecto de las delecciones constituye un desafío terapéutico. Existen dos estrategias para contrarrestar la desregulación de los genes infraexpresados: promover la expresión del alelo no delecionado en las delecciones heterocigotas o inhibir ciertas vías de señalización reguladas por estos genes (vías *downstream*). Por ejemplo, los retinoides parecen estimular la expresión de IKZF1, mientras que los inhibidores de las cinasas FAK parecen reducir la adhesión a la estroma medular, la proliferación aberrante así como el carácter de HSC que tienen las células con delección de este gen (267,628). Dado el papel represor que tiene BLNK sobre la vía JAK/STAT, los

pacientes con delección de este gen podrían responder favorablemente a inhibidores de JAK y mTOR (313). Las vías apoptóticas también presentaron diversas CNA, entre las que destacaban las deleciones de TP53, ATM, FOXO3 y BTG1 o las duplicaciones de genes antiapoptóticos como BIRC5 y XIAP (BIRC4), entre otras. La inhibición de BIRC5 y XIAP podría ser una estrategia prometedora para estos pacientes (579,629).

En cuanto a la adquisición de CNA exclusivamente en recaída, las duplicaciones más frecuentes afectaron a genes implicados en la proliferación celular (p.ej. FLT3, PIK3R1, STAT5B, STAT5A, STAT3, CRLF2, IL3RA), regulación de la homeostasis de las HSC (p.ej. PHF10, PDCD2) y resistencia a fármacos (p.ej. ABCC3, MSH3, HMGB1). Los inhibidores de JAK/STAT y los inhibidores de mTOR y PI3K podrían ser efectivos en pacientes con duplicaciones de genes implicados en esta vía (STAT3, STAT5A, STAT5B, PIK3R1, CRLF2 y IL3RA), mientras que los pacientes que tienen duplicación de FLT3 es probable que sobreexpresen el gen y puedan beneficiarse de la terapia con inhibidores de FLT3 (99,193). Las duplicaciones de genes que regulan la función de las HSC y les confieren mayor capacidad autorregenerativa son especialmente delicadas desde el punto terapéutico, ya que su inhibición podría afectar a la hematopoyesis sana. Una posible estrategia sería analizar los perfiles de expresión de las células con estas alteraciones y compararlas con las de las HSC sanas para encontrar rutas metabólicas desreguladas solo en las células leucémicas. Es decir, si una alteración es difícil de tratar sin afectar a la hematopoyesis sana o no se dispone de una terapia efectiva contra esa alteración, la identificación de alteraciones concomitantes en las células tumorales puede ofrecer otras aproximaciones terapéuticas. Este mismo concepto también sería aplicable en los casos con presencia de CNA con carácter quimiorresistente. En estos casos también sería recomendable sustituir u omitir el fármaco contra el que se genera resistencia con el fin de evitar toxicidades innecesarias. Las deleciones o las mutaciones inactivadoras de KDM6A conllevan la modificación del código de las histonas dando lugar a una excesiva metilación de la lisina K27 y a la represión de la expresión de genes proapoptóticos (630). La terapia dirigida contra los agentes que causan esta metilación aberrante, como los genes del complejo PRC2 (EZH2, SUZ12 y EED), induce apoptosis gracias a la reactivación de la expresión de genes proapoptóticos (631). Finalmente, las deleciones de STAG2 conllevan la infraexpresión de genes de diferenciación linfoide como BLNK, LAX1 y CD86. Tal y como se ha comentado anteriormente, el uso de inhibidores de JAK podría ser efectivo para mimetizar el efecto que tiene BLNK sobre esta vía.

En este trabajo se han identificado numerosas CNA potencialmente implicadas en la resistencia al tratamiento y la progresión de la LAL de precursores B en la población adulta. Es importante

recalcar que actualmente existen diversos ensayos clínicos que están evaluando la eficacia de inhibidores contra estas vías desreguladas, algunos de ellos con resultados prometedores. Un dato intrigante es el papel que pueden jugar los genes con función epigenética en la progresión de esta enfermedad (p.ej. modificadores del código de las histonas), ya que las deleciones y mutaciones de estos genes parecen ser más habituales en LAL en recaída que al diagnóstico (413,458,471). Es posible que, al actuar a nivel de todo el genoma, la alteración de estos genes desregule la expresión de una mayor cantidad de genes que, por ejemplo, un factor de transcripción. Además, la alteración de algunos genes modificadores de la cromatina parece conferir a la célula leucémica un fenotipo similar al de célula *stem*, hecho que podría favorecer la resistencia al tratamiento (473).

Teniendo en cuenta los resultados de los trabajos de esta Tesis Doctoral, una conclusión evidente es que la LAL es una neoplasia extremadamente heterogénea a nivel genético. Este hecho sugiere que es necesaria una caracterización genética profunda en el diagnóstico en cuanto a cantidad de genes estudiados y en cuanto a la sensibilidad de las técnicas utilizadas, y una monitorización de la ERM durante el tratamiento con herramientas lo más sensibles posible y capaces de detectar toda la heterogeneidad clonal que define a esta neoplasia. Debido a esta gran heterogeneidad genética, es preciso seguir clasificando esta leucemia según sus alteraciones genéticas y fenotípicas. Los algoritmos que se usan en la actualidad para categorizar a los pacientes por grupos de riesgo y asignar tratamiento han contribuido a mejorar la supervivencia de los pacientes. Sin embargo, es necesario incorporar nuevos marcadores con significado pronóstico para continuar incrementando las tasas de supervivencia. La incorporación de estos nuevos marcadores puede ser larga debido a la complejidad genética de esta neoplasia. La elevada cantidad de alteraciones genéticas concomitantes en las células leucémicas (algunas de ellas con valor pronóstico opuesto), las posibles interacciones entre ellas y el papel que desempeñan los genes en más de una ruta metabólica, auguran un escenario confuso que requiere un abordaje amplio y meticuloso tanto a nivel de laboratorio como a nivel asistencial. Partiendo de la premisa de que cada LAL es única genética y fenotípicamente, seguir avanzando por la senda de la medicina personalizada parece ser la aproximación más razonable para la erradicación de esta enfermedad. Para ello es imprescindible el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos específicamente contra las dianas genéticas identificadas. Resulta esperanzador constatar la mejoría de la supervivencia que se ha conseguido hasta la actualidad, y más teniendo en cuenta que esta mejora se ha fundamentado (especialmente en la LAL infantil) en la optimización de protocolos terapéuticos basados en fármacos de la era pre-genómica. En la era de la genómica y

en los albores de la medicina personalizada, se hace muy difícil no pensar que cada vez estamos más cerca de la curación de todas las LAL minimizando a la vez los efectos secundarios del tratamiento.

12. CONCLUSIONES

Relativas al objetivo 1

Conocer, mediante análisis de alteraciones en el número de copias (CNA), las ganancias y pérdidas de ADN en pacientes con LAL de precursores B y la LAL B madura y comparar el patrón de dichas alteraciones en ambos subtipos de LAL.

1. En la LAL de precursores B, las CNA más frecuentes fueron las deleciones de los genes CDKN2A/B, IKZF1 y PAX5. En cambio, en la LAL B madura las CNA más frecuentes afectaron a los genes de la región 14q32.33. Ello indicaría un patrón diferente de alteraciones génicas en ambas LAL de línea B.

Relativas al objetivo 2

Determinar el impacto pronóstico de las CNA en el momento del diagnóstico en pacientes con LAL de precursores B y LAL B madura.

1. Ninguna de las CNA analizadas tuvo impacto pronóstico en la LAL B madura.
2. En la LAL de precursores B, la deleción del gen EBF1, junto con la edad avanzada, influyeron desfavorablemente en la probabilidad de obtener la remisión completa tanto en la serie global como en pacientes con LAL Ph negativa.
3. La deleción de IKZF1, junto con una cifra elevada de leucocitos al diagnóstico, parece aumentar la probabilidad de recaída en la serie global de pacientes con LAL de precursores B.
4. La edad avanzada y las deleciones de CDKN2A/B fueron factores predictivos de menor probabilidad de supervivencia global tanto en la serie global como en los pacientes sin reordenamiento BCR-ABL1.
5. Por todo lo anterior, se debería incluir el estudio génico de, como mínimo, estas alteraciones en la estratificación pronóstica de los pacientes con LAL de precursores B.

Relativas al Objetivo 3

Analizar y comparar el patrón de evolución clonal en los pacientes con LAL de precursores B en recaída y tratar de identificar firmas génicas específicas de recaída.

1. Las LAL en recaída son más complejas genéticamente que al diagnóstico.
2. Todas las leucemias en recaída muestran un origen clonal común con la leucemia detectada en el momento del diagnóstico, aunque en la mayoría de casos se originan a partir de un clon ancestral al clon inicial.
3. No existe una firma génica recurrente en recaída. Sin embargo, las deleciones homocigotas de CDKN2A/B pueden jugar un papel activo en la progresión de la LAL de precursores B.
4. Existe un incremento significativo del número de CNA durante la progresión de la LAL, lo que refleja un aumento del grado de heterogeneidad clonal.
5. Los pacientes en recaída presentan desregulación de múltiples vías metabólicas, entre ellas las que afectan a resistencia a fármacos, diferenciación linfocítica, regulación del ciclo celular, apoptosis y homeostasis de las células progenitoras hematopoyéticas. Todo ello podría explicar su mayor resistencia al tratamiento.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Rieger MA, Schroeder T. Hematopoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(12):1–17.
2. Jagannathan-Bogdan M, Zon LI. Hematopoiesis. *Development.* 2013;140(12):2463–7.
3. National Cancer Institute. <https://seer.cancer.gov>.
4. Pui CH, Pei D, Campana D, Cheng C, Sandlund JT, Bowman WP, et al. A revised definition for cure of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2014 Dec 30;28(12):2336–43.
5. Ribera JM, Oriol A, Morgades M, Montesinos P, Sarra J, Gonzalez-Campos J, et al. Treatment of high-risk Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia in adolescents and adults according to early cytologic response and minimal residual disease after consolidation assessed by flow cytometry: Final results of the PETHEMA. *J Clin Oncol.* 2014;32(15):1595–604.
6. Nguyen K, Devidas M, Cheng S-C, La M, Raetz EA, Carroll WL, et al. Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Leukemia.* 2008 Dec 25;22(12):2142–50.
7. Irving JAE, Enshaei A, Parker CA, Sutton R, Kuiper RP, Erhorn A, et al. Integration of genetic and clinical risk factors improves prognostication in relapsed childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2016;128(7):911–22.
8. Reismüller B, Attarbaschi A, Peters C, Dworzak MN, Pötschger U, Urban C, et al. Long-term outcome of initially homogeneously treated and relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia in Austria - A population-based report of the Austrian Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) Study Group. *Br J Haematol.* 2009;144(4):559–70.
9. van den Berg H, de Groot-Kruseman HA, Damen-Korbijn CM, de Bont ESJ., Schouten-van Meeteren AYN, Hoogerbrugge PM. Outcome after first relapse in children with acute lymphoblastic leukemia: A report based on the Dutch Childhood Oncology Group (DCOG) relapse all 98 protocol. *Pediatr Blood Cancer.* 2011 Aug;57(2):210–6.
10. Fielding AK, Richards SM, Chopra R, Lazarus HM, Litzow MR, Buck G, et al. Outcome of 609 adults after relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL); an MRC UKALL12/ECOG 2993 study. *Blood.* 2007;109(3):944–50.
11. Oriol A, Vives S, Hernández-Rivas JM, Tormo M, Heras I, Rivas C, et al. Outcome after relapse of acute lymphoblastic leukemia in adult patients included in four consecutive risk-adapted trials by the PETHEMA study group. *Haematologica.* 2010;95(4):589–96.
12. O'Brien S, Thomas D, Ravandi F, Faderl S, Cortes J, Borthakur G, et al. Outcome of adults with acute lymphocytic leukemia after second salvage therapy. *Cancer.* 2008;113(11):3186–91.
13. Tavernier E, Boiron J-M, Huguet F, Bradstock K, Vey N, Kovacovics T, et al. Outcome of treatment after first relapse in adults with acute lymphoblastic leukemia initially treated by the LALA-94 trial. *Leukemia.* 2007;21(9):1907–14.
14. Gökbüget N, Stanze D, Beck J, Diedrich H, Horst HA, Hüttmann A, et al. Outcome of relapsed adult lymphoblastic leukemia depends on response to salvage chemotherapy, prognostic factors, and performance of stem cell transplantation. *Blood.* 2012;120(10):2032–41.
15. Gokbuget N, Dombret H, Ribera J-M, Fielding AK, Advani A, Bassan R, et al. International reference analysis of outcomes in adults with B-precursor Ph-negative relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2016;101(12):1524–33.
16. Jabbour E, Short NJ, Jorgensen JL, Yilmaz M, Ravandi F, Wang SA, et al. Differential impact of minimal residual disease negativity according to the salvage status in patients with relapsed/refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer.* 2016;1–9.
17. Kozłowski P, Åström M, Ahlberg L, Bernell P, Hulegårdh E, Hägglund H, et al. High curability via intensive reinduction chemotherapy and stem cell transplantation in young adults with relapsed acute lymphoblastic leukemia in Sweden 2003-2007. *Haematologica.* 2012;97(9):1414–21.
18. Hunger, Stephen P MCG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N Engl J Med.* 2015;373(16):1541–52.
19. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.* 2013;381(9881):1943–55.
20. Perez-Andreu V, Roberts KG, Harvey RC, Yang W, Cheng C, Pei D, et al. Inherited GATA3 variants are associated with Ph-like childhood acute lymphoblastic leukemia and risk of relapse. *Nat Genet.* 2013;45(12):1494–8.
21. Vijayakrishnan J, Henrion M, Moorman A V, Fiege B, Kumar R, Inacio da Silva Filho M, et al. The 9p21.3 risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia is explained by a rare high-impact variant in CDKN2A. *Sci Rep.* 2015;5(August):15065.
22. Sherborne AL, Hosking FJ, Prasad RB, Kumar R, Koehler R, Vijayakrishnan J, et al. Variation in CDKN2A at 9p21.3 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk. *Nat Genet.* 2010;42(6):492–4.
23. Shah S, Schrader KA, Waanders E, Timms AE, Vijai J, Miething C, et al. A recurrent germline PAX5 mutation confers susceptibility to pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2013;45(10):1226–31.
24. Kratz CP, Stanulla M, Cavé H. Genetic predisposition to acute lymphoblastic leukemia: Overview on behalf of the I-BFM ALL Host Genetic Variation Working Group. *Eur J Med Genet.* 2016;59(3):111–5.
25. Prasad RB, Hosking FJ, Vijayakrishnan J, Papaemmanuil E, Koehler R, Greaves M, et al. Brief report Verification of the susceptibility loci on 7p12 . 2 , 10q21 . 2 , and 14q11 . 2 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Child A Glob J Child Res.* 2010;115(9):1765–7.
26. Skibola CF, Slager SL, Berndt SI, Lightfoot T, Sampson JN, Morton LM, et al. Medical history, lifestyle, family history, and occupational risk factors for adult acute lymphocytic leukemia: The InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma subtypes project. *J Natl Cancer Inst - Monogr.* 2014;(48):125–9.
27. Kinlen L. Infections and immune factors in cancer: the role of epidemiology. *Oncogene.* 2004;23(38):6341–8.
28. Greaves M. Infection theory Greaves *Nat Rev Cancer* 2006. 2006.
29. Ford a M, Bennett C a, Price CM, Bruin MC, Van Wering ER, Greaves M. Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(8):4584–8.
30. Greaves MF, Maia AT, Wiemels JL, Ford AM. Leukemia in twins: Lessons in natural history. *Blood.* 2003;102(7):2321–33.
31. Bateman CM, Alpar D, Ford a M, Colman SM, Wren D, Morgan M, et al. Evolutionary trajectories of hyperdiploid ALL in monozygotic twins. *Leukemia.* 2014;29(1):58–65.
32. Martin-Lorenzo A, Hauer J, Vicente-Dueñas C, Auer F, Gonzalez-Herrero I, Garcia-Ramirez I, et al. Infection exposure is a causal factor in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia as a result of Pax5-inherited susceptibility. *Cancer Discov.* 2015;5(12):1328–43.

33. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose S a., Bakhoum SF, et al. Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *N Engl J Med.* 2014;371(26):2477–87.
34. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman P V, Mar BG, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med.* 2014;371(26):2488–98.
35. Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendl MC, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med.* 2014;20(12):1472–8.
36. Pui C-H, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet (London, England).* 2008 Mar 22;371(9617):1030–43.
37. Chiarini F, Lonetti A, Evangelisti C, Buontempo F, Orsini E, Evangelisti C, et al. Advances in understanding the acute lymphoblastic leukemia bone marrow microenvironment: From biology to therapeutic targeting. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2016;1863(3):449–63.
38. Jose-Eneriz E, Agirre X, Rodriguez-Otero P, Prosper F. Epigenetic regulation of cell signaling pathways in acute lymphoblastic leukemia. *Epigenomics.* 2013;5(1750–192; 1750–192; 5):525–38.
39. Diaz de la Guardia R, Lopez-Millan B, Lavoie JR, Bueno C, Castaño J, Gómez-Casares M, et al. Detailed Characterization of Mesenchymal Stem/Stromal Cells from a Large Cohort of AML Patients Demonstrates a Definitive Link to Treatment Outcomes. *Stem Cell Reports.* 2017;8:1–14.
40. Wang S, He G. 2016 Revision to the WHO classification of acute lymphoblastic leukemia. *J Transl Intern Med.* 2016;4(4):147–9.
41. Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, Behm FG, Raimondi SC, Pei D, et al. Early T-Cell Precursor Leukemia: A Subtype of Very High-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia Identified in Two Independent Cohorts. *The Lancet.* 2010;10(2):147–56.
42. Jain N, Lamb AE, O'Brien S, Ravandi F, Konopleva M, Jabbour E, et al. Early T-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma (Etp-All/Lbl) in Adolescents and Adults: a High-Risk Subtype. 2016;127(15):1863–70.
43. Bond J, Marchand T, Touzart a., Cieslak a., Trinquand a., Sutton L, et al. An early thymic precursor phenotype predicts outcome exclusively in HOXA-overexpressing adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: a group for research in adult acute lymphoblastic leukemia study. *Haematologica.* 2016;101(6):732–40.
44. Patrick K, Wade R, Goulden N, Mitchell C, Moorman A V., Rowntree C, et al. Outcome for children and young people with Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia treated on a contemporary protocol, UKALL 2003. *Br J Haematol.* 2014;166(3):421–4.
45. Holmfeldt L, Wei L, Diaz-Flores E, Walsh M, Zhang J, Ding L, et al. The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2013;45(3):242–52.
46. Mühlbacher V, Zenger M, Schnittger S, Weissmann S, Kunze F, Kohlmann A, et al. 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, Chromosom Cancer.* 2014 Jun;53(6):524–36.
47. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *Br J Haematol.* 1976 Aug;33(4):451–8.
48. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, et al. The Morphological Classification of Acute Lymphoblastic Leukaemia: Concordance among Observers and Clinical Correlations. *Br J Haematol.* 1981 Apr;47(4):553–61.
49. HANN IM, EVANS DIK, PALMER MK, JONES PJM, HAWORTH C. The prognostic significance of morphological features in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Clin Lab Haematol.* 2008 Jun 28;1(3):215–26.
50. Lilleyman JS, Hann IM, Stevens RF, Eden OB, Richards SM. French American British (FAB) morphological classification of childhood lymphoblastic leukaemia and its clinical importance. *J Clin Pathol.* 1986;39(9):998–1002.
51. Foa R, Vitale A. Acute lymphoblastic leukemia. In: *Hematology in progress.* Mattioli 1885; 2015.
52. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia.* 1995 Oct;9(10):1783–6.
53. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia.* 2012;26:1908–75.
54. Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, van der Sluijs-Gelling AJ, Gaipa G, Bartels M, et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2017 Jan 19;129(3):347–57.
55. Uckun FM, Sather H, Gaynon P, Arthur D, Nachman J, Sensel M, et al. Prognostic significance of the CD10+CD19+CD34+ B-progenitor immunophenotype in children with acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. *Leuk Lymphoma.* 1997;27(5–6):445–57.
56. Long J, Liu S, Li K, Zhou X, Zhang P, Zou L. High proportion of CD34+/CD38-cells is positively correlated with poor prognosis in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2014;55(3):611–7.
57. Thomas X, Archimbaud E, Charrin C, Magaud JP, Fiere D. CD34 expression is associated with major adverse prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 1995 Feb;9(2):249–53.
58. Deaglio S, Mehta K, Malavasi F. Human CD38: A (r)evolutionary story of enzymes and receptors. *Leuk Res.* 2001;25(1):1–12.
59. Keyhani A, Huh YO, Jendiroba D, Pagliaro L, Cortez J, Pierce S, et al. Increased CD38 expression is associated with favorable prognosis in adult acute leukemia. *Leuk Res.* 2000;24(2):153–9.
60. Kong Y, Xu L-P, Liu Y-R, Qin Y-Z, Sun Y-Q, Wang Y, et al. Presence of CD34(+)/CD38(-)/CD58(-) leukemia-propagating cells at diagnosis identifies patients at high risk of relapse with Ph chromosome-positive ALL after allo-hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2014;(11):1–6.
61. Moorman A V., Ensor HM, Richards SM, Chilton L, Schwab C, Kinsey SE, et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: Results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(5):429–38.
62. Moorman A V., Harrison CJ, Buck GAN, Richards SM, Secker-Walker LM, Martineau M, et al. 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.* 2007;109(8):3189–97.
63. Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, Eden OB, Addison GM, Masera G, et al. Prenatal origin of acute lymphoblastic

- leukaemia in children. *Lancet*. 1999;354(9189):1499–503.
64. Bateman CM, Colman SM, Chaplin T, Young BD, Eden TO, Bhakta M, et al. Acquisition of genome-wide copy number alterations in monozygotic twins with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010;115(17):3553–8.
 65. Ma X, Edmonson M, Yergeau D, Muzny DM, Hampton OA, Rusch M, et al. Rise and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric B-acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun*. 2015;6:6604.
 66. Mullighan CG, Phillips LA, Su X, Ma J, Miller CB, Shurtleff SA, et al. Genomic Analysis of the Clonal Origins of Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia. *Science*. 2008 Nov 28;322(5906):1377–80.
 67. Moorman A V. The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Rev*. 2012;26(3):123–35.
 68. Cilloni D, Saglio G. Molecular Pathways: BCR-ABL. *Clin Cancer Res*. 2012 Feb 15;18(4):930–7.
 69. Feldhahn N, Klein F, Mooster JL, Hadweh P, Sprangers M, Wartenberg M, et al. Mimicry of a constitutively active pre-B cell receptor in acute lymphoblastic leukemia cells. *J Exp Med*. 2005;201(11):1837–52.
 70. Ma H, Mallampati S, Lu Y, Sun B, Wang E, Leng X, et al. The Sox4/Tcf711 axis promotes progression of BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2014;99(10):1591–8.
 71. Chiaretti S, Li X, Gentleman R, Vitale A, Wang KS, Mandelli F, et al. Gene expression profiles of B-lineage adult acute lymphocytic leukemia reveal genetic patterns that identify lineage derivation and distinct mechanisms of transformation. *Clin Cancer Res*. 2005 Oct 15;11(20):7209–19.
 72. Messina M, Chiaretti S, Tavaloro S, Peragine N, Vitale A, Elia L, et al. Protein kinase gene expression profiling and in vitro functional experiments identify novel potential therapeutic targets in adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2010;116(14):3426–37.
 73. Waanders E, Scheijen B, van der Meer LT, van Reijmersdal S V., van Emst L, Kroeze Y, et al. The origin and nature of tightly clustered BTG1 deletions in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia support a model of multiclonal evolution. *PLoS Genet*. 2012;8(2).
 74. Schwab CJ, Chilton L, Morrison H, Jones L, Al-Shehhi H, Erhorn A, et al. Genes commonly deleted in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: Association with cytogenetics and clinical features. *Haematologica*. 2013;98(7):1081–8.
 75. Den Boer ML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, Cheok MH, Buijs-Gladdines JG, Peters ST, et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol*. 2009;10(2):125–34.
 76. Mullighan C, Su X, Zhang J, Radtke I, Letha P, Christopher M, et al. Deletion of IKZF1 and Prognosis in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2009;360(5):470–80.
 77. Martinelli G, Iacobucci I, Storzazzi CT, Vignetti M, Paoloni F, Cilloni D, et al. 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. *J Clin Oncol*. 2009;27(31):5202–7.
 78. Moorman A V., Robinson H, Schwab C, Richards SM, Hancock J, Mitchell CD, et al. 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. *J Clin Oncol*. 2013;31(27):3389–96.
 79. Schultz KR, Bowman WP, Aledo A, Slayton WB, Sather H, Devidas M, et al. Improved early event-free survival with imatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: a children's oncology group study. *J Clin Oncol*. 2009 Nov 1;27(31):5175–81.
 80. Ravandi F, O'Brien SM, Cortes JE, Thomas DM, Garris R, Faderl S, et al. Long-term follow-up of a phase 2 study of chemotherapy plus dasatinib for the initial treatment of patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2015;121(23):4158–64.
 81. Jabbour E, Kantarjian H, Ravandi F, Thomas D, Huang X, Faderl S, et al. First report of a phase II prospective study of combination of hyper-CVAD with ponatinib in frontline therapy of patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Lancet Oncol*. 2015;16(16):1547–55.
 82. Ribera JM, García O, Montesinos P, Brunet S, Abella E, Barrios M, et al. Treatment of young patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia using increased dose of imatinib and deintensified chemotherapy before allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2012;159(1):78–81.
 83. Byun JM, Koh Y, Shin D-Y, Kim I, Yoon S-S, Lee J-O, et al. BCR-ABL translocation as a favorable prognostic factor in elderly patients with acute lymphoblastic leukemia in the era of potent tyrosine kinase inhibitors. *Haematologica*. 2017 May;102(5):e187–90.
 84. Joshi I, Yoshida T, Jena N, Qi X, Zhang J, Van Etten R a, et al. Loss of Ikaros DNA-binding function confers integrin-dependent survival on pre-B cells and progression to acute lymphoblastic leukemia. *Nat Immunol*. 2014;15(3):294–304.
 85. Churchman ML, Evans K, Richmond J, Robbins A, Jones L, Shapiro IM, et al. Synergism of FAK and tyrosine kinase inhibition in Ph+ B-ALL. *JCI Insight*. 2016;1(4):1–13.
 86. Kolch W, Pitt A. Functional proteomics to dissect tyrosine kinase signalling pathways in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010 Sep;10(9):618–29.
 87. Jude CD, Climer L, Xu D, Artinger E, Fisher JK, Ernst P. Unique and Independent Roles for MLL in Adult Hematopoietic Stem Cells and Progenitors. *Cell Stem Cell*. 2007;1(3):324–37.
 88. Meyer C, Hofmann J, Burmeister T, Gröger D, Park TS, Emerenciano M, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia*. 2013;27(11):2165–76.
 89. Stumpel DJPM, Schneider P, Roon EHJ Van, Boer JM, De P, Valsecchi MG, et al. -rearranged infant acute lymphoblastic leukemia , influences clinical outcome , and provides therapeutic options Specific promoter methylation identifies different subgroups of MLL -rearranged infant acute lymphoblastic leukemia , influences clinical outc. 2011;114(27):5490–8.
 90. Schafer E, Irizarry R, Negi S, Mcintyre E, Small D, Figueroa ME, et al. Promoter hypermethylation in MLL -r infant acute lymphoblastic leukemia : biology and therapeutic targeting. *Blood*. 2010;115(23):4798–809.
 91. Stumpel DJPM, Schneider P, Van Roon EHJ, Pieters R, Stam RW. Absence of global hypomethylation in promoter hypermethylated Mixed Lineage Leukaemia-rearranged infant acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer*. 2013;49(1):175–84.

92. Sanjuan-pla A, Bueno C, Prieto C, Acha P, Stam RW, Marschalek R. Revisiting the biology of infant t(4;11)/MLL-AF4 B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2015;126(25):2676–86.
93. Bardini M, Galbiati M, Lettieri A, Bungaro S, Gorletta TA, Biondi A, et al. Implementation of array based whole-genome high-resolution technologies confirms the absence of secondary copy-number alterations in MLL-AF4-positive infant ALL patients. *Leukemia*. 2011;25(1):175–8.
94. Andersson AK, Ma J, Wang J, Chen X, Gedman AL, Dang J, et al. The landscape of somatic mutations in infant MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemias. *Nat Genet*. 2015;47(4):330–7.
95. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57–70.
96. Trentin L, Giordan M, Dingermann T, Basso G, Te Kronnie G, Marschalek R. Two independent gene signatures in pediatric t(4;11) acute lymphoblastic leukemia patients. *Eur J Haematol*. 2009;83(5):406–19.
97. Stam RW, Schneider P, Hagelstein JAP, Linden MH Van Der, Dominique J, Stumpel PM, et al. Gene expression profiling – based dissection of MLL translocated and MLL germline acute lymphoblastic leukemia in infants Gene expression profiling – based dissection of MLL translocated and MLL germline acute lymphoblastic leukemia in infants. 2014;115(14):2835–44.
98. Armstrong S a, Kung AL, Mabon ME, Silverman LB, Stam RW, Den Boer ML, et al. Inhibition of FLT3 in MLL. *Cancer Cell*. 2003;3(2):173–83.
99. Chillón MC, Gómez-Casares MT, López-Jorge CE, Rodríguez-Medina C, Molines a, Sarasquete ME, et al. Prognostic significance of FLT3 mutational status and expression levels in MLL-AF4+ and MLL-germline acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2012;(May):2360–6.
100. Yeoh E-J, Ross ME, Shurtleff SA, Williams WK, Patel D, Mahfouz R, et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell*. 2002;1(2):133–43.
101. Kang H, Wilson CS, Harvey RC, Chen I, Murphy MH, Atlas SR, et al. Gene expression profiles predictive of outcome and age in infant acute lymphoblastic leukemia : a Children ' s Oncology Group study. *Blood*. 2012;119(8):1872–81.
102. Gaussmann a, Wenger T, Eberle I, Bursen a, Bracharz S, Herr I, et al. Combined effects of the two reciprocal t(4;11) fusion proteins MLL.AF4 and AF4.MLL confer resistance to apoptosis, cell cycling capacity and growth transformation. *Oncogene*. 2007;26(23):3352–63.
103. Wilkinson AC, Ballabio E, Geng H, North P, Tapia M, Kerry J, et al. RUNX1 Is a Key Target in t(4;11) Leukemias that Contributes to Gene Activation through an AF4-MLL Complex Interaction. *Cell Rep*. 2013;3(1):116–27.
104. Raimondi SC, Frestedt JL, Pui CH, Downing JR, Head DR, Kersey JH, et al. Acute lymphoblastic leukemias with deletion of 11q23 or a novel inversion (11)(p13q23) lack MLL gene rearrangements and have favorable clinical features. *Blood*. 1995;86(5):1881–6.
105. Amare Kadam PS, Raje GC, Pais AP, Banavali S. Coexistence of ETV6/RUNX1 and MLL aberrations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia discloses a small subclass of BCP-ALL. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008;182(1):27–32.
106. Romana SP, Le Coniat M, Berger R. t(12;21): a new recurrent translocation in acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 1994 Mar;9(3):186–91.
107. Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, Schrauder A, Möricke A, Aricò M, et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia : results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study CME article Molecular response to treatment redefine. *Blood*. 2010;115(16):3206–14.
108. Bowman WP, Sandlund JT, Kaste SC, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Ph D, et al. Treating Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia without Cranial Irradiation. *N Engl J Med*. 2009;360(26):2730–41.
109. Rubnitz JE, Wichlan D, Devidas M, Shuster J, Linda SB, Kurtzberg J, et al. Prospective analysis of TEL gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia: A children's oncology group study. *J Clin Oncol*. 2008;26(13):2186–91.
110. Loh ML, Goldwasser MA, Silverman LB, Poon W, Vattikuti S, Cardoso A, et al. Prospective analysis of TEL / AML1 -positive patients treated on Dana-Farber Cancer Institute Consortium Protocol 95-01. 2006;107(11):4508–13.
111. Al-obaidi MSJ, Martineau M, Bennett CF, Franklin IM, Goldstone AH, Harewood L, et al. ETV6 / AML1 fusion by FISH in adult acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2002;669–74.
112. Ross M, Zhou X. Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood*. 2003;102(8):2951–9.
113. Ghazavi F, Clappier E, Lammens T, Suci S, Caye A, Zegrari S, et al. CD200/BTLA deletions in pediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia treated according to the EORTC-CLG 58951 protocol. *Haematologica*. 2015;100(10):1311–9.
114. Olsson L, Castor A, Behrendtz M, Biloglav A, Forestier E, Paulsson K, et al. 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*. 2014 Feb 4;28(2):302–10.
115. Mullighan CG, Zhang J, Kasper LH, Lerach S, Payne-Turner D, Phillips LA, et al. CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2011 Mar 10;471(7337):235–9.
116. Whitehead VM, Vuchich MJ, Lauer SJ, Mahoney D, Carroll AJ, Shuster JJ, et al. Accumulation of high levels of methotrexate polyglutamates in lymphoblasts from children with hyperdiploid (greater than 50 chromosomes) B-lineage acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *Blood*. 1992;80(5):1316–23.
117. Kaspers GJ, Smets L a, Pieters R, Van Zantwijk CH, Van Wering ER, Veerman a J. Favorable prognosis of hyperdiploid common acute lymphoblastic leukemia may be explained by sensitivity to antimetabolites and other drugs: results of an in vitro study. *Blood*. 1995;85:751–6.
118. Paulsson K, Forestier E, Lilljebjörn H, Heldrup J, Behrendtz M, Young BD, et al. Genetic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(50):21719–24.
119. Heerema NA, Raimondi SC, Anderson JR, Biegel J, Camitta BM, Cooley LD, et al. Specific extra chromosomes occur in a modal number dependent pattern in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genes, Chromosome Cancer*. 2007 Jul;46(7):684–93.
120. Secker-Walker LM, Lawler SD, Hardisty RM. Prognostic implications of chromosomal findings in acute lymphoblastic leukaemia at diagnosis. *Br Med J*. 1978 Dec 2;2(6151):1529–30.
121. Pui CH, Campana D, Pei D, Bowman WP, Sandlund JT, Kaste SC, et al. Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *N Engl J Med*. 2009;360(26):2730–41.
122. Forestier E, Johansson B, Gustafsson G, Borgström G, Kerndrup G, Johansson J, et al. Prognostic impact of karyotypic

- findings in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a Nordic series comparing two treatment periods. For the Nordic Society of Paediatric Haematology and Oncology (NOPHO) Leukaemia Cytogenetic Study Group. *Br J Haematol*. 2000 Jul;110(1):147–53.
123. Sutcliffe MJ, Shuster JJ, Sather HN, Camitta BM, Pullen J, Schultz KR, et al. High concordance from independent studies by the Children's Cancer Group (CCG) and Pediatric Oncology Group (POG) associating favorable prognosis with combined trisomies 4, 10, and 17 in children with NCI Standard-Risk B-precursor Acute Lymphoblastic Leuk. *Leukemia*. 2005;19(5):734–40.
 124. Wiemels JL, Kang M, Chang JS, Zheng L, Kouyoumji C, Zhang L, et al. Backtracking RAS mutations in high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cells, Mol Dis*. 2010;45(3):186–91.
 125. Charrin C, Thomas X, Ffrench M, Le QH, Andrieux J, Mozziconacci MJ, et al. 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*. 2004;104(8):2444–51.
 126. Baumgarten E, Wegner RD, Fengler R, Ludwig WD, Schulte-Overberg U, Domeyer C, et al. Calla-positive acute leukaemia with t(5q;14q) translocation and hypereosinophilia—a unique entity? *Acta Haematol*. 1989;82(2):85–90.
 127. Shalit M, Sekhsaria S, Malech HL. Modulation of growth and differentiation of eosinophils from human peripheral blood CD34+ cells by IL5 and other growth factors. *Cell Immunol*. 1995 Jan;160(1):50–7.
 128. Hunger SP. Chromosomal translocations involving the E2A gene in acute lymphoblastic leukemia: clinical features and molecular pathogenesis. *Blood*. 1996 Feb 15;87(4):1211–24.
 129. Privitera E, Kamps MP, Hayashi Y, Inaba T, Shapiro LH, Raimondi SC, et al. Different molecular consequences of the 1;19 chromosomal translocation in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1992 Apr 1;79(7):1781–8.
 130. Barber KE, Harrison CJ, Broadfield ZJ, Stewart ARM, Wright SL, Martineau M, et al. Molecular cytogenetic characterization of TCF3 (E2A)/19p13.3 rearrangements in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007 May;46(5):478–86.
 131. Mancini M, Scappaticci D, Cimino G, Nanni M, Derme V, Tafuri A, et al. A comprehensive genetic classification of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of the GIMEMA 0496 protocol. *Blood*. 2005 May 1;105(9):3434–41
 132. Moorman A V, Chilton L, Wilkinson J, Ensor HM, Bown N, Proctor SJ. A population-based cytogenetic study of adults with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010;115(2):206–14.
 133. Vey N, Thomas X, Picard C, Kovascovic T, Charin C, Cayuela JM, et al. Allogeneic stem cell transplantation improves the outcome of adults with t(1;19)/E2A-PBX1 and t(4;11)/MLL-AF4 positive B-cell acute lymphoblastic leukemia: results of the prospective multicenter LALA-94 study. *Leukemia*. 2006;20(12):2155–61.
 134. Mancini M, Scappaticci D, Cimino G, Nanni M, Derme V, Elia L, et al. A comprehensive genetic classification of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of the GIMEMA 0496 protocol. *Blood*. 2005 May 1;105(9):3434–41.
 135. Harrison CJ, Moorman A V, Broadfield ZJ, Cheung KL, Harris RL, Reza Jalali G, et al. Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2004 Jun;125(5):552–9.
 136. Nachman JB, Heerema N a, Sather H, Camitta B, Forestier E, Harrison CJ, et al. Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2007;110(4):1112–5.
 137. Sunil SK, Prakash PN, Hariharan S, Vinod G, Preethi RT, Geetha N. Adult acute lymphoblastic leukemia with near haploidy, hyperdiploidy and Ph positive lines: a rare entity with poor prognosis. *Leuk Lymphoma*. 2006 Mar;47(3):561–3.
 138. Kimura M, Yufu Y, Kawano R, Goto T, Takatsuki H, Uike N. [Adult acute lymphoblastic leukemia presenting a near haploid karyotype]. *Rinsho Ketsueki*. 2000 Sep;41(9):764–7.
 139. Granada, I., Sancho, J.-M., Oriol, A. E., In A. The prognostic significance of complex karyotype in Philadelphia chromosome-negative (Ph) acute lymphoblastic leukemia (ALL) in adults is related with risk group. *Blood*. 2007;ASH Annual Meeting Abstracts, 110, 3501.
 140. Issa GC, Kantarjian HM, Yin CC, Qiao W, Ravandi F, Thomas D, et al. Prognostic impact of pretreatment cytogenetics in adult Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia in the era of minimal residual disease. *Cancer*. 2016;459–67.
 141. Motlló C, Ribera JM, Morgades M, Granada I, Montesinos P, González-Campos J, et al. Prognostic significance of complex karyotype and monosomal karyotype in adult patients with acute lymphoblastic leukemia treated with risk-adapted protocols. *Cancer*. 2014;120(24):3958–64.
 142. Khoral P, Atenafu EG, Craddock KJ, Schimmer A, Chang H. Prognostic Effect of Complex Karyotype, Monosomal Karyotype, and Chromosome 17 Abnormalities in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2017;17(4):215–9.
 143. Li Y, Schwab C, Ryan SL, Papaemmanuil E, Robinson HM, Jacobs P, et al. Constitutional and somatic rearrangement of chromosome 21 in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2014;508(7494):98–102.
 144. Harewood L, Robinson H, Harris R, Al-Obaidi MJ, Jalali GR, Martineau M, et al. Amplification of AML1 on a duplicated chromosome 21 in acute lymphoblastic leukemia: a study of 20 cases. *Leukemia*. 2003;17(3):547–53.
 145. Robinson HM, Harrison CJ, Moorman A V, Chudoba I, Strefford JC. Intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21) may arise from a breakage-fusion-bridge cycle. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007 Apr;46(4):318–26.
 146. Strefford JC, van Delft FW, Robinson HM, Worley H, Yiannikouris O, Selzer R, et al. Complex genomic alterations and gene expression in acute lymphoblastic leukemia with intrachromosomal amplification of chromosome 21. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(21):8167–72.
 147. Rand V, Parker H, Russell LJ, Schwab C, Ensor H, Irving J, et al. Genomic characterization implicates iAMP21 as a likely primary genetic event in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011;117(25):6848–55.
 148. Harrison CJ, Haas O, Harbott J, Biondi A, Stanulla M, Trka J, et al. Detection of prognostically relevant genetic abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: Recommendations from the Biology and Diagnosis Committee of the International Berlin-Frankfurt-Münster study group. *Br J Haematol*. 2010;151(2):132–42.
 149. Johnson RC, Weinberg OK, Cascio MJ, Dahl G V, Mitton BA, Silverman LB, et al. Cytogenetic Variation of B-Lymphoblastic Leukemia With Intrachromosomal Amplification of Chromosome 21 (iAMP21): A Multi-Institutional Series Review. *Am J Clin Pathol*. 2015 Jul;144(1):103–12.
 150. Heerema NA, Carroll AJ, Devidas M, Loh ML, Borowitz MJ, Gastier-Foster JM, et al. Intrachromosomal amplification of chromosome 21 is associated with inferior outcomes in children with acute lymphoblastic leukemia treated in contemporary

- standard-risk children's oncology group studies: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol.* 2013;31(27):3397–402.
151. Attarbaschi A, Mann G, Panzer-Grümayer R, Röttgers S, Steiner M, König M, et al. Minimal residual disease values discriminate between low and high relapse risk in children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia and an intrachromosomal amplification of chromosome 21: The Austrian and German Acute Lymphoblastic Leukemia Berl. *J Clin Oncol.* 2008;26(18):3046–50.
 152. Harrison CJ, Moorman A V, Schwab C, Carroll AJ, Raetz EA, Devidas M, et al. An international study of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): cytogenetic characterization and outcome. *Leukemia.* 2014 May 29;28(5):1015–21.
 153. Dyer MJS, Akasaka T, Capasso M, Dusanj P, Lee YF, Karran EL, et al. Immunoglobulin heavy chain locus chromosomal translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: Rare clinical curios or potent genetic drivers? *Blood.* 2010;115(8):1490–9.
 154. Chapiro E, Russell L, Radford-weiss I, Bastard C, Lessard M, Struski S, et al. Overexpression of CEBPA resulting from the translocation t(14;19)(q32;q13) of human precursor B acute lymphoblastic leukemia. 2006;108(10):3560–3.
 155. Akasaka T, Balasas T, Russell LJ, Sugimoto K, Majid A, Walewska R, et al. Five members of the CEBP transcription factor family are targeted by recurrent IGH translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). *Blood.* 2007;109(8):3451–61.
 156. Chapiro E, Russell LJ, Struski S, Cavé H, Radford-Weiss I, Valle VD, et al. A new recurrent translocation t(11;14)(q24;q32) involving IGH@ and miR-125b-1 in B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2010;24:1362–4.
 157. Russell LJ, Akasaka T, Majid A, Sugimoto KJ, Karran EL, Nagel I, et al. t(6;14)(p22;q32): A new recurrent IGH@ translocation involving ID4 in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). *Blood.* 2008;111(1):387–91.
 158. Russell LJ, De Castro DG, Griffiths M, Telford N, Bernard O, Panzer-Grümayer R, et al. A novel translocation, t (14; 19)(q32; p13), involving IGH@ and the cytokine receptor for erythropoietin. *Leukemia.* 2008;23(3):614–617.
 159. Yasuda T, Tsuzuki S, Kawazu M, Hayakawa F, Kojima S, Ueno T, et al. Recurrent DUX4 fusions in B cell acute lymphoblastic leukemia of adolescents and young adults. *Nat Genet.* 2016;48(5):1–8.
 160. Roberts KG, Morin RD, Zhang J, Hirst M, Zhao Y, Su X, et al. Genetic Alterations Activating Kinase and Cytokine Receptor Signaling in High-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell.* 2012 Aug;22(2):153–66.
 161. Roberts KG, Li Y, Payne-Turner D, Harvey RC, Yang Y-L, Pei D, et al. Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2014;371(11):1005–15.
 162. Moorman A V., Schwab C, Ensor HM, Russell LJ, Morrison H, Jones L, et al. IGH@ translocations, CRLF2 deregulation, and microdeletions in adolescents and adults with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 2012;30(25):3100–8.
 163. Russell LJ, Enshaei A, Jones L, Erhorn A, Masic D, Bentley H, et al. 1453-1462 IGH@ translocations are prevalent in teenagers and young adults with acute lymphoblastic leukemia and are associated with a poor outcome. *J Clin Oncol.* 2014;32(14):1453–62.
 164. Schmah J, Fedders B, Panzer-Grümayer R, Fischer S, Zimmermann M, Dagdan E, et al. Molecular characterization of acute lymphoblastic leukemia with high CRLF2 gene expression in childhood. *Pediatr Blood Cancer.* 2017;(February):e26539.
 165. Herold T, Schneider S, Metzeler K, Neumann M, Hartmann L, Roberts KG, et al. Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia in adults have frequent IGH-CRLF2 and JAK2 mutations, persistence of minimal residual disease and poor prognosis. *Haematologica.* 2016;102(1):130–8.
 166. Russell LJ, Capasso M, Vater I, Akasaka T, Bernard OA, Calasanz MJ, et al. Deregulated expression of cytokine receptor gene, CRLF2, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2009 Sep 24;114(13):2688–98.
 167. Yoda A, Yoda Y, Chiaretti S, Bar-Natan M, Mani K, Rödig SJ, et al. Functional screening identifies CRLF2 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(1):252–7.
 168. Mullighan CG, Collins-Underwood JR, Phillips L a a, Loudin MG, Liu W, Zhang J, et al. Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2009;41(11):1243–6.
 169. Yano M, Imamura T, Asai D, Moriya-Saito A, Suenobu S, Hasegawa D, et al. An overall characterization of pediatric acute lymphoblastic leukemia with CRLF2 overexpression. *Genes Chromosom Cancer.* 2014 Oct;53(10):815–23.
 170. Chen I, Harvey RC, Mullighan CG, Gastier-Foster J, Wharton W, Kang H, et al. Outcome modeling with CRLF2, IKZF1, JAK, and minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood.* 2012 Apr 12;119(15):3512–22.
 171. Cario G, Zimmermann M, Romey R, Gesk S, Vater I, Harbott J. Brief report Presence of the P2RY8-CRLF2 rearrangement is associated with a poor prognosis in non – high-risk precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in children treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. *Child A Glob J Child Res.* 2010;115(26):5393–7.
 172. Harvey RC, Mullighan CG, Chen IM, Wharton W, Mikhail FM, Carroll AJ, et al. Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases, alteration of IKZF1, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2010;115(26):5312–21.
 173. Palmi C, Savino AM, Silvestri D, Bronzini I, Cario G, Paganin M, et al. CRLF2 over-expression is a poor prognostic marker in children with high risk T-cell acute lymphoblastic leukemia. 2016;7(37).
 174. Hertzberg L, Vendramini E, Ganmore I, Cazzaniga G, Schmitz M, Chalker J, et al. Down syndrome acute lymphoblastic leukemia, a highly heterogeneous disease in which aberrant expression of CRLF2 is associated with mutated JAK2: A report from the International BFM Study Group. *Blood.* 2010;115(5):1006–17.
 175. Jeffries SJ, Jones L, Harrison CJ, Russell LJ. IGH@ translocations co-exist with other primary rearrangements in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2014;99(8):1334–42.
 176. Jia M, Wang ZJ, Zhao HZ, Shen HP, Cheng YP, Luo Z Bin, et al. Prognostic significance of cytokine receptor-like factor 2 alterations in acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *World J Pediatr.* 2015;11(2):126–33.
 177. Palmi C, Vendramini E, Silvestri D, Longinotti G, Frison D, Cario G, et al. Poor prognosis for P2RY8-CRLF2 fusion but not for CRLF2 over-expression in children with intermediate risk B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2012;26(10):2245–53.

178. Dou H, Chen X, Huang Y, Su Y, Lu L, Yu J, et al. Prognostic significance of P2RY8-CRLF2 and CRLF2 overexpression may vary across risk subgroups of childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2017 Feb;56(2):135–46.
179. Krawczyk J, Haslam K, Lynam P, Kelly J, Storey L, O'Marcaigh A, et al. No prognostic impact of P2RY8-CRLF2 fusion in intermediate cytogenetic risk childhood B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2013;160(4):555–6.
180. Morak M, Attarbaschi A, Fischer S, Nassimbeni C, Grausenburger R, Bastelberger S, et al. Small sizes and indolent evolutionary dynamics challenge the potential role of P2RY8-CRLF2-harboring clones as main relapse-driving force in childhood ALL. *Blood*. 2012;120(26):5134–42.
181. Van Der Veer A, Waanders E, Pieters R, Willemse ME, Van Reijmersdal S V., Russell LJ, et al. Independent prognostic value of BCR-ABL1-like signature and IKZF1 deletion, but not high CRLF2 expression, in children with B-cell precursor ALL. *Blood*. 2013;122(15):2622–9.
182. Buitenkamp TD, Izraeli S, Zimmermann M, Forestier E, Heerema NA, van den Heuvel-Eibrink MM, et al. Acute lymphoblastic leukemia in children with Down syndrome: a retrospective analysis from the Ponte di Legno study group. *Blood*. 2014 Jan 2;123(1):70–7.
183. Ensor HM, Schwab C, Russell LJ, Richards SM, Morrison H, Masic D, et al. Demographic, clinical, and outcome features of children with acute lymphoblastic leukemia and CRLF2 deregulation: results from theMRCALL97 clinical trial. *Blood*. 2011;117(7):2129–36.
184. Attarbaschi A, Morak M, Cario G, Cazzaniga G, Ensor HM, te Kronnie T, et al. Treatment outcome of CRLF2 -rearranged childhood acute lymphoblastic leukaemia: A comparative analysis of the AIEOP-BFM and UK NCRI-CCLG study groups. *Br J Haematol*. 2012;158(6):772–7.
185. Dörge P, Meissner B, Zimmermann M, Möricke A, Schrauder A, Bouquin JP, et al. IKZF1 deletion is an independent predictor of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. *Haematologica*. 2013;98(3):428–32.
186. Chiaretti S, Brugnoletti F, Messina M, Paoloni F, Fedullo AL, Piciocchi A, et al. CRLF2 overexpression identifies an unfavourable subgroup of adult B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia lacking recurrent genetic abnormalities. *Leuk Res*. 2016;41:36–42.
187. Fang Q, Zhao X, Li Q, Li Y, Liu K, Tang K, et al. IKZF1 alterations and expression of CRLF2 predict prognosis in adult Chinese patients with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2016;8194(May):1–11.
188. Ge Z, Gu Y, Zhao G, Li J, Chen B, Han Q, et al. High CRLF2 expression associates with IKZF1 dysfunction in adult acute lymphoblastic leukemia without CRLF2 rearrangement. *Oncotarget*. 2016 Aug 2;7(31):49722–32.
189. Cario G, Zimmermann M, Romey R, Gesk S, Vater I, Harbott J, et al. Presence of the P2RY8-CRLF2 rearrangement is associated with a poor prognosis in non-high-risk precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in children treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. *Blood*. 2010 Jul 1;115(26):5393–7.
190. Tasian SK, Loh ML. Understanding the biology of CRLF2-overexpressing acute lymphoblastic leukemia. *Crit Rev Oncog*. 2011;16(1–2):13–24.
191. Tasian SK, Doral MY, Borowitz MJ, Wood BL, Chen I, Harvey RC, et al. Aberrant STAT5 and PI3K / mTOR pathway signaling occurs in human CRLF2 -rearranged B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2012;2(July):833–43.
192. Maude SL, Tasian SK, Vincent T, Hall JW, Sheen C, Roberts KG, et al. Targeting JAK1/2 and mTOR in murine xenograft models of Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2012 Oct 25;120(17):3510–8.
193. Tasian SK, Teachey DT, Li Y, Shen F, Harvey RC, Chen I-M, et al. Potent efficacy of combined PI3K/mTOR and JAK or ABL inhibition in murine xenograft models of Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2017 Jan 12;129(2):177–87.
194. Fazio G, Daniele G, Cazzaniga V, Impera L, Severgnini M, Iacobucci I, et al. Three novel fusion transcripts of the paired box 5 gene in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2015 Jan 1;100(1):e14–7.
195. Stasevich I, Ingloft S, Austin N, Chatters S, Chalker J, Addy D, et al. PAX5 alterations in genetically unclassified childhood Precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2015;171(2):263–72.
196. Familiades J, Bousquet M, Lafage-Pochitaloff M, Béné M-C, Beldjord K, De Vos J, et al. PAX5 mutations occur frequently in adult B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia and PAX5 haploinsufficiency is associated with BCR-ABL1 and TCF3-PBX1 fusion genes: a GRAALL study. *Leukemia*. 2009;23(11):1989–98.
197. Strehl S, König M, Dworzak MN, Kalwak K, Haas O a. PAX5/ETV6 fusion defines cytogenetic entity dic(9;12)(p13;p13). *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK* [Internet]. 2003;17(6):1121–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12764378>
198. Nebral K, Denk D, Attarbaschi A, König M, Mann G, Haas O a, et al. Incidence and diversity of PAX5 fusion genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2009;23(1):134–43.
199. An Q, Wright SL, Konn ZJ, Matheson E, Minto L, Moorman A V, et al. Variable breakpoints target PAX5 in patients with dicentric chromosomes: a model for the basis of unbalanced translocations in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(44):17050–4.
200. Iacobucci I, Lonetti A, Paoloni F, Papayannidis C, Ferrari A, Storlazzi CT, et al. The PAX5 gene is frequently rearranged in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia but is not associated with outcome. a report on behalf of the GIMEMA acute leukemia working party. *Haematologica*. 2010;95(10):1683–90.
201. Coyaud E, Struski S, Prade N, Familiades J, Eichner R, Quelen C, et al. Wide diversity of PAX5 alterations in B-ALL: A Groupe Francophone de Cytogenetique Hematologique study. *Blood*. 2010;115(15):3089–97.
202. Dang J, Wei L, De Ridder J, Su X, Rust AG, Roberts KG, et al. PAX5 is a tumor suppressor in mouse mutagenesis models of acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2015;125(23):3609–17.
203. Fortschegger K, Anderl S, Denk D, Strehl S. Functional heterogeneity of PAX5 chimeras reveals insight for leukemia development. *Mol Cancer Res*. 2014 Apr;12(4):595–606.
204. Schinnerl D, Fortschegger K, Kauer M, Marchante JRM, Kofler R, Den Boer ML, et al. The role of the Janus-faced transcription factor PAX5-JAK2 in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2015 Feb 19;125(8):1282–91.
205. Sakamoto K, Imamura T, Kanayama T, Yano M, Asai D, Deguchi T, et al. Ph-like acute lymphoblastic leukemia with a novel PAX5-KIDINS220 fusion transcript. *Genes Chromosomes Cancer*. 2017 Apr;56(4):278–84.
206. Cazzaniga V, Bugarin C, Bardini M, Giordan M, te Kronnie G, Basso G, et al. LCK over-expression drives STAT5 oncogenic

- signaling in PAX5 translocated BCP-ALL patients. *Oncotarget*. 2015;6(3):1569–81.
207. Prima V, Hunger SP. Cooperative transformation by MEF2D/DAZAP1 and DAZAP1/MEF2D fusion proteins generated by the variant t(1;19) in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2007;21(12):2470–5.
208. Yuki Y, Imoto I, Imaizumi M, Hibi S, Kaneko Y, Amagasa T, et al. Identification of a novel fusion gene in a pre-B acute lymphoblastic leukemia with t(1;19)(q23;p13). *Cancer Sci*. 2004;95(6):503–7.
209. Liu Y-F, Wang B-Y, Zhang W-N, Huang J-Y, Li B-S, Zhang M, et al. Genomic Profiling of Adult and Pediatric B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *EBioMedicine*. 2016;8:173–83.
210. Suzuki K, Okuno Y, Kawashima N, Muramatsu H, Okuno T, Wang X, et al. MEF2D-BCL9 fusion gene is associated with high-risk acute B-cell precursor lymphoblastic leukemia in adolescents. *J Clin Oncol*. 2016;34(28):3451–9.
211. Gu Z, Churchman M, Roberts K, Li Y, Liu Y, Harvey RC, et al. Genomic analyses identify recurrent MEF2D fusions in acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun*. 2016;7:13331.
212. Martini A, Starza R La, Janssen H, Corveleyn A, Somers R, Aventin A, et al. Advances in Brief Recurrent Rearrangement of the Ewing 's Sarcoma Gene , EWSR1 , or Its Homologue , TAF15 , with the Transcription Factor CIZ / NMP4 in Acute Leukemia. *Cancer*. 2002;1:5408–12.
213. La Starza R, Aventin A, Crescenzi B, Gorello P, Specchia G, Cuneo A, et al. CIZ gene rearrangements in acute leukemia: report of a diagnostic FISH assay and clinical features of nine patients. *Leukemia*. 2005;19:1696–9.
214. Gocho Y, Kiyokawa N, Ichikawa H, Nakabayashi K, Osumi T, Ishibashi T, et al. A novel recurrent EP300–ZNF384 gene fusion in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2015 Dec 6;29(12):2445–8.
215. Hirabayashi S, Ohki K, Nakabayashi K, Ichikawa H, Momozawa Y, Okamura K, et al. ZNF384-related fusion genes consist of a subgroup with a characteristic immunophenotype in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2016;102(1).
216. Yaguchi A, Ishibashi T, Terada K, Ueno-Yokohata H, Saito Y, Fujimura J, et al. EP300-ZNF384 fusion gene product up-regulates GATA3 gene expression and induces hematopoietic stem cell gene expression signature in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells. *Int J Hematol*. 2017 Apr 4. doi: 10.1007/s12185-017-2220-6.
217. Shago M, Abila O, Hitzler J, Weitzman S, Abdelhaleem M. Frequency and outcome of pediatric acute lymphoblastic leukemia with ZNF384 gene rearrangements including a novel translocation resulting in an ARID1B/ZNF384 gene fusion. *Pediatr Blood Cancer*. 2016;(April):1–7.
218. Qian M, Zhang H, Kham SK-Y, Liu S, Jiang C, Zhao X, et al. Whole-transcriptome sequencing identifies a distinct subtype of acute lymphoblastic leukemia with predominant genomic abnormalities of EP300 and CREBBP. *Genome Res*. 2017 Feb;27(2):185–95.
219. Zeng W, De Greef JC, Chen YY, Chien R, Kong X, Gregson HC, et al. Specific loss of histone H3 lysine 9 trimethylation and HP1/cohesin binding at D4Z4 repeats is associated with facioscapulohumeral dystrophy (FSHD). *PLoS Genet*. 2009;5(7).
220. Zhang J, McCastlain K, Yoshihara H, Xu B, Chang Y, Churchman ML, et al. Deregulation of DUX4 and ERG in acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2016;48(12):1481–9.
221. Kowaljaw V, Marcowycz A, Anseau E, Conde CB, Sauvage S, Mattéotti C, et al. The DUX4 gene at the FSHD1A locus encodes a pro-apoptotic protein. *Neuromuscul Disord*. 2007 Aug;17(8):611–23.
222. Corona ED, Jacquelin D, Gatica L, Rosa AL. Multiple Protein Domains Contribute to Nuclear Import and Cell Toxicity of DUX4, a Candidate Pathogenic Protein for Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. *PLoS One*. 2013;8(10):1–11.
223. Lilljebjörn H, Henningsson R, Hyrenius-Wittsten A, Olsson L, Orsmark-Pietras C, von Palffy S, et al. Identification of ETV6-RUNX1-like and DUX4-rearranged subtypes in paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun*. 2016;7:11790.
224. Harvey RC, Mullighan CG, Wang X, Dobbin KK, Davidson GS, Bedrick EJ, et al. 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*. 2010 Dec 2;116(23):4874–84.
225. Clappier E, Auclerc MF, Rapion J, Bakkus M, Caye A, Khemiri a, et al. 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*. 2014;28(1):70–7.
226. Zaliouva M, Zimmermannova O, Dörge P, Eckert C, Mörcke A, Zimmermann M, et al. ERG deletion is associated with CD2 and attenuates the negative impact of IKZF1 deletion in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2014 Jan;28(1):182–5.
227. Vendramini E, Giordan M, Giarin E, Michielotto B, Fazio G, Cazzaniga G, et al. High expression of miR-125b-2 and SNORD116 noncoding RNA clusters characterize ERG-related B cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*. 2017 Mar 21. doi: 10.18632/oncotarget.16392.
228. Iacobucci I, Mullighan CG. Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol*. 2017 Mar 20;35(9):975–83.
229. Jain N, Roberts KG, Jabbour E, Patel K, Eterovic AK, Chen K, et al. Ph-like acute lymphoblastic leukemia: a high-risk subtype in adults. *Blood*. 2017 Feb 2;129(5):572–81.
230. Roberts KG, Gu Z, Payne-Turner D, McCastlain K, Harvey RC, Chen I-M, et al. High Frequency and Poor Outcome of Philadelphia Chromosome-Like Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. *J Clin Oncol*. 2017 Feb;35(4):394–401.
231. Roberts KG, Pei D, Campana D, Payne-Turner D, Li Y, Cheng C, et al. Outcomes of children with BCR-ABL1-like acute lymphoblastic leukemia treated with risk-directed therapy based on the levels of minimal residual disease. *J Clin Oncol*. 2014;32(27):3012–20.
232. Reshmi SC, Harvey RC, Roberts KG, Stonerock E, Smith A, Jenkins H, et al. Targetable kinase gene fusions in high risk B-ALL: a study from the Children's Oncology Group. *Blood*. 2017 Apr 13. pii: blood-2016-12-758979.
233. Roberts KG, Mullighan CG. Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: insights and treatment implications. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015 Jun;12(6):344–57.
234. Tasian SK, Hunger SP. Genomic characterization of paediatric acute lymphoblastic leukaemia: an opportunity for precision medicine therapeutics. *Br J Haematol*. 2016;1–16.
235. Boer JM, Marchante JRM, Evans WE, Horstmann MA, Escherich G, Pieters R, et al. BCR-ABL1-like cases in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a comparison between DCOG/Erasmus MC and COG/St. Jude signatures. *Haematologica*. 2015

- Sep;100(9):e354-7.
236. Harvey RC, Kang H, Kathryn GR, Chen I-ML, Atlas SR, Bedrick EJ, et al. Development and Validation Of a Highly Sensitive and Specific Gene Expression Classifier To Prospectively Screen and Identify B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) Patients With a Philadelphia Chromosome-Like (“Ph-like” or “BCR-ABL1-Like”) Signature. *Blood*. 2013;122:826.
 237. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2007 Apr 12;446(7137):758–64.
 238. Forero-Castro M, Robledo C, Benito R, Abeigar M, Martin A, Africa A, Arefi M, et al. Genome-wide DNA copy number analysis of acute lymphoblastic leukemia identifies new genetic markers associated with clinical outcome. *PLoS One*. 2016;11(2):1–20.
 239. Messina M, Chiaretti S, Wang J, Fedullo AL, Peragine N, Gianfelici V, et al. Prognostic and therapeutic role of targetable lesions in B-lineage acute lymphoblastic leukemia without recurrent fusion genes. *Oncotarget*. 2016;7(12):13886–901.
 240. Salmoiraghi S, Montalvo MLG, Ubiali G, Tosi M, Peruta B, Zanghi P, et al. Mutations of TP53 gene in adult acute lymphoblastic leukemia at diagnosis do not affect the achievement of hematologic response but correlate with early relapse and very poor survival. *Haematologica*. 2016 Jun 1;101(6):e245–8.
 241. Stengel A, Schnittger S, Weissmann S, Kuznia S, Kern W, Kohlmann A, et al. TP53 mutations occur in 15.7% of ALL and are associated with MYC-rearrangement, low hypodiploidy, and a poor prognosis. *Blood*. 2014 Jul 10;124(2):251–8.
 242. Hof J, Krentz S, van Schewick C, Körner G, Shalpour S, Rhein P, et al. Mutations and deletions of the TP53 gene predict nonresponse to treatment and poor outcome in first relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2011 Aug 10;29(23):3185–93.
 243. John LB, Ward AC. The Ikaros gene family: transcriptional regulators of hematopoiesis and immunity. *Mol Immunol*. 2011 May;48(9–10):1272–8.
 244. Ng SY-M, Yoshida T, Zhang J, Georgopoulos K. Genome-wide Lineage-Specific Transcriptional Networks Underscore Ikaros-Dependent Lymphoid Priming in Hematopoietic Stem Cells. *Immunity*. 2009 Apr;30(4):493–507.
 245. Zhang J, Jackson AF, Naito T, Dose M, Seavitt J, Liu F, et al. Harnessing of the nucleosome-remodeling-deacetylase complex controls lymphocyte development and prevents leukemogenesis. *Nat Immunol*. 2011;13(1):86–94.
 246. Heizmann B, Kastner P, Chan S. Ikaros is absolutely required for pre-B cell differentiation by attenuating IL-7 signals. *J Exp Med*. 2013;210(13):2823–32.
 247. Bottardi S, Mavoungou L, Pak H, Daou S, Bourgoin V, Lakehal YA, et al. The IKAROS Interaction with a Complex Including Chromatin Remodeling and Transcription Elongation Activities Is Required for Hematopoiesis. *PLoS Genet*. 2014;10(12).
 248. Witkowski MT, Hu Y, Roberts KG, Boer JM, McKenzie MD, Liu GJ, et al. Conserved IKAROS-regulated genes associated with B-progenitor acute lymphoblastic leukemia outcome. *J Exp Med*. 2017 Mar 6;214(3):773–791.
 249. Georgopoulos K. Acute lymphoblastic leukemia--on the wings of IKAROS. *N Engl J Med*. 2009;360(5):524–6.
 250. Klampfl T, Harutyunyan A, Berg T, Gisslinger B, Schalling M, Bagiński K, et al. Genome integrity of myeloproliferative neoplasms in chronic phase and during disease progression. *Blood*. 2011;118(1):167–76.
 251. Beer PA, Knapp DJHF, Miller PH, Kannan N, Sloma I, Heel K, et al. Disruption of IKAROS activity in primitive chronic-phase CML cells mimics myeloid disease progression. Vol. 125, *Blood*. 2015. 504-515 p.
 252. Lavallée V, Gendron P, Lemieux S, D’Angelo G, Hébert J, Sauvageau G. EVI1 -rearranged acute myeloid leukemias are characterized by distinct molecular alterations. *Blood*. 2015;125(1):140–4.
 253. Kuehn HS, Boisson B, Cunningham-Rundles C, Reichenbach J, Stray-Pedersen A, Gelfand EW, et al. Loss of B Cells in Patients with Heterozygous Mutations in IKAROS. *N Engl J Med*. 2016;374(11):1032–43.
 254. Oliveira VC, Moretti NS, Augusto L da S, Schenkman S, Mariano M, Popi AF. Ikaros could be a key factor in the maintenance of “B-side” of B-1 cells. *Immunobiology*. 2015;220(11):1232–9.
 255. Reynaud D, Demarco IA, Reddy KL, Schjerven H, Bertolino E, Chen Z, et al. Regulation of B cell fate commitment and immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements by Ikaros. *Nat Immunol*. 2008;9(8):927–36.
 256. Kathrein KL, Lorenz R, Innes AM, Griffiths E, Winandy S. Ikaros Induces Quiescence and T-Cell Differentiation in a Leukemia Cell Line. *Mol Cell Biol*. 2005;25(5):1645–54.
 257. Trageser D, Iacobucci I, Nahar R, Duy C, von Levetzow G, Klemm L, et al. Pre-B cell receptor-mediated cell cycle arrest in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia requires IKAROS function. *J Exp Med*. 2009;206(8):1739–53.
 258. Schwickert TA, Tagoh H, Gültekin S, Dakic A, Axelsson E, Minnich M, et al. Stage-specific control of early B cell development by the transcription factor Ikaros. *Nat Immunol*. 2014;15(3):283–93.
 259. Winandy S, Wu P, Georgopoulos K. A Dominant Mutation in the Ikaros Gene Leads To Rapid Development of Leukemia and Lymphoma. *Cell*. 1995;83(2):289–99.
 260. Nichogiannopoulou A, Trevisan M, Neben S, Friedrich C, Georgopoulos K. Defects in hemopoietic stem cell activity in Ikaros mutant mice. *J Exp Med*. 1999;190(9):1201–14.
 261. Beer PA, Knapp DJHF, Kannan N, Miller PH, Babovic S, Bulaeva E, et al. A dominant-negative isoform of IKAROS expands primitive normal human hematopoietic cells. *Stem Cell Reports*. 2014;3(5):841–57.
 262. Molnár a, Georgopoulos K. The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol*. 1994;14(12):8292–303.
 263. Sun L, Liu A, Georgopoulos K. Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. *EMBO J*. 1996 Oct 1;15(19):5358–69.
 264. Georgopoulos K. Haematopoietic Cell-Fate Decisions, Chromatin Regulation and Ikaros. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(3):162–74.
 265. Yoshida T, Georgopoulos K. Ikaros fingers on lymphocyte differentiation. *Int J Hematol*. 2014;100(3):220–9.
 266. Schjerven H, McLaughlin J, Arenzana TL, Friezse S, Cheng D, Wadsworth SE, et al. Selective regulation of lymphopoiesis and leukemogenesis by individual zinc fingers of Ikaros. *Nat Immunol*. 2013;14(10):1073–83.
 267. Churchman ML, Low J, Qu C, Paietta EM, Kasper LH, Chang Y, et al. Efficacy of Retinoids in IKZF1-Mutated BCR-ABL1 Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. 2015;28(3):343–56.
 268. Marke R, Haviga J, Cloos J, Demkes M, Poelmans G, Yuniati L, et al. Tumor suppressor IKZF1 mediates glucocorticoid resistance in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2015;(December):1–13.
 269. Imamura T, Yano M, Asai D, Moriya-Saito A, Suenobu S-I, Hasegawa D, et al. IKZF1 deletion is enriched in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia patients showing prednisolone resistance. *Leukemia*. 2016;30(8):1–2.

270. Safavi S, Hansson M, Karlsson K, Biloglav A, Johansson B, Paulsson K. Novel gene targets detected by genomic profiling in a consecutive series of 126 adults with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2015;100(1):55–61.
271. Beldjord K, Chevret S, Asnafi V, Hugué F, Boulland M-L, Leguay T, et al. Oncogenetics and minimal residual disease are independent outcome predictors in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2014 Jun 12;123(24):3739–49.
272. Clappier E, Grardel N, Bakkus M, Rapión J, De Moerloose B, Kastner P, et al. 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*. 2015;(January):2154–61.
273. Krentz S, Hof J, Mendioroza, Vaggopoulou R, Dörge P, Lottaz C, et al. Prognostic value of genetic alterations in children with first bone marrow relapse of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2012;(May 2012):295–304.
274. Feng J, Tang Y. Prognostic significance of IKZF1 alteration status in pediatric B-lineage acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(4):889–91.
275. Zhang W, Kuang P, Li H, Wang F, Wang Y. Prognostic significance of IKZF1 deletion in adult B cell acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Ann Hematol*. 2017 Feb;96(2):215–225.
276. Jia M, Wang ZJ, Li JY, Yang SL, Zhao HZ, Cheng YP, et al. The impact of IKZF1 deletion on the prognosis of acute lymphoblastic leukemia: An updated meta-analysis. *Cancer Biomarkers*. 2014;14(6):493–503.
277. Palmi C, Valsecchi MG, Longinotti G, Silvestri D, Carrino V, Conter V, et al. What is the relevance of Ikaros gene deletions as a prognostic marker in pediatric Philadelphia-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia? *Haematologica*. 2013;98(8):1226–31.
278. Boer JM, van der Veer A, Rizopoulos D, Fiocco M, Sonneveld E, de Groot-Kruseman H a, et al. Prognostic value of rare IKZF1 deletion in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: an international collaborative study. *Leukemia*. 2016 Jan;30(1):32–8.
279. Ribera J, Morgades M, Zamora L, Montesinos P, Gómez-Seguí I, Pratcorona M, et al. Prognostic significance of copy number alterations in adolescent and adult patients with precursor B acute lymphoblastic leukemia enrolled in PETHEMA protocols. *Cancer*. 2015 Nov 1;121(21):3809–17.
280. Lana T, de Lorenzo P, Bresolin S, Bronzini I, den Boer ML, Cave H, et al. Refinement of IKZF1 status in pediatric Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2015;29(10):2107–10.
281. Churchman ML, Mullighan CG. Ikaros: exploiting and targeting the hematopoietic stem cell niche in B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Exp Hematol*. 2016;46:1–8.
282. Song C, Gowda C, Pan X, Ding Y, Tong Y, Tan BH, et al. Targeting casein kinase II restores Ikaros tumor suppressor activity and demonstrates therapeutic efficacy in high-risk leukemia. *Blood*. 2015;126(15):1813–22.
283. Lin X, Zou X, Wang Z, Fang Q, Chen S, Huang J, et al. Targeting of heme oxygenase-1 attenuates the negative impact of Ikaros isoform 6 in adult BCR-ABL1-positive B-ALL. *Oncotarget*. 2016;7(33):53679–701.
284. Morgan B, Sun L, Avitahl N, Andrikopoulos K, Ikeda T, Gonzales E, et al. Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. *EMBO J*. 1997 Apr 15;16(8):2004–13.
285. Cai Q, Dierich A, Oulad-Abdelghani M, Chan S, Kastner P. Helios deficiency has minimal impact on T cell development and function. *J Immunol*. 2009 Aug 15;183(4):2303–11.
286. Wang JH, Nichogiannopoulou A, Wu L, Sun L, Sharpe AH, Bigby M, et al. Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity*. 1996;5(6):537–49.
287. Hahm K, Cobb BS, McCarty AS, Brown KE, Klug CA, Lee R, et al. Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin. *Genes Dev*. 1998;12(6):782–96.
288. Kelley CM, Ikeda T, Koipally J, Avitahl N, Wu L, Georgopoulos K, et al. Helios, a novel dimerization partner of Ikaros expressed in the earliest hematopoietic progenitors. *Curr Biol*. 1998;8(9):508–15.
289. Hagman J, Belanger C, Travis A, Turck CW, Grosschedl R. Cloning and functional characterization of early B-cell factor, a regulator of lymphocyte-specific gene expression. *Genes Dev*. 1993;7(5):760–73.
290. Medina KL, Pongubala JMR, Reddy KL, Lancki DW, DeKoter R, Kieslinger M, et al. Assembling a gene regulatory network for specification of the B cell fate. *Dev Cell*. 2004;7(4):607–17.
291. Roessler S, Györy I, Imhof S, Spivakov M, Williams RR, Busslinger M, et al. Distinct promoters mediate the regulation of Ebf1 gene expression by interleukin-7 and Pax5. *Mol Cell Biol*. 2007;27(2):579–94.
292. Pongubala JMR, Northrup DL, Lancki DW, Medina KL, Treiber T, Bertolino E, et al. Transcription factor EBF restricts alternative lineage options and promotes B cell fate commitment independently of Pax5. *Nat Immunol*. 2008;9(2):203–15.
293. Thal MA, Carvalho TL, He T, Kim H-G, Gao H, Hagman J, et al. Ebf1-mediated down-regulation of Id2 and Id3 is essential for specification of the B cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(2):552–7.
294. Lukin K, Fields S, Guerretaz L, Straign D, Rodriguez V, Zandi S, et al. A dose-dependent role for EBF1 in repressing non-B-cell-specific genes. *Eur J Immunol*. 2011 Jun;41(6):1787–93.
295. Yang JJ, Bhojwani D, Yang W, Cai X, Stocco G, Crews K, et al. Genome-wide copy number profiling reveals molecular evolution from diagnosis to relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2008;112(10):4178–83.
296. Nutt SL, Heavey B, Rolink AG, Busslinger M. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature*. 1999;401(October):556–62.
297. Liu GJ, Cimmino L, Jude JG, Hu Y, Witkowski MT, McKenzie MD, et al. Pax5 loss imposes a reversible differentiation block in B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Genes Dev*. 2014;28:1337–50.
298. Sarhadi VK, Lahti L, Scheinin I, Ellonen P, Kettunen E, Serra M, et al. Copy number alterations and neoplasia-specific mutations in MELK, PDCD1LG2, TLN1, and PAX5 at 9p in different neoplasias. *Genes, Chromosom Cancer*. 2014 Jul;53(7):579–88.
299. Papaemmanuil E, Rapado I, Li Y, Potter NE, Wedge DC, Tubio J, et al. RAG-mediated recombination is the predominant driver of oncogenic rearrangement in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2014;46(2):116–25.
300. Dong Y, Liu F, Wu C, Li S, Zhao X, Zhang P, et al. Illegitimate RAG-mediated recombination events are involved in IKZF1 Δ 3–6 deletion in BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia. *Clin Exp Immunol*. 2016;185(3):1–12.
301. Mendes RD, Sarmiento LM, Canté-Barrett K, Zuurbier L, Buijs-Gladdines JGCAM, Póvoa V, et al. PTEN microdeletions in T-cell acute lymphoblastic leukemia are caused by illegitimate RAG-mediated recombination events. *Blood*. 2014;124(4):567–78.

302. Gladdy RA, Taylor MD, Williams CJ, Grandal I, Karaskova J, Squire JA, et al. The RAG-1/2 endonuclease causes genomic instability and controls CNS complications of lymphoblastic leukemia in p53/Prkdc-deficient mice. *Cancer Cell*. 2003;3(1):37–50.
303. Teng G, Maman Y, Resch W, Kim M, Yamane A, Qian J, et al. RAG Represents a Widespread Threat to the Lymphocyte Genome. *Cell*. 2014;162(4):751–65.
304. Iacobucci I, Storlazzi CT, Cilloni D, Lonetti A, Ottaviani E, Soverini S, et al. Identification and molecular characterization of recurrent genomic deletions on 7p12 in the IKZF1 gene in a large cohort of BCR-ABL1 – positive acute lymphoblastic leukemia patients : on behalf of Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell ' Adulto Acute. *Hematology*. 2009;114(10):2159–67.
305. Hauer J, Mullighan C, Morillon E, Wang G, Bruneau J, Brousse N, et al. Loss of p19Arf in a Rag1-/- B-cell precursor population initiates acute B-lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011;118(3):544–53.
306. Licence S, Persson C, Mundt C, Mårtensson IL. The VpreB1 enhancer drives developmental stage-specific gene expression in vivo. *Eur J Immunol*. 2003;33(4):1117–26.
307. Seidl T, Rolink A, Melchers F. The VpreB protein of the surrogate light-chain can pair with some mu heavy-chains in the absence of the lambda 5 protein. *Eur J Immunol*. 2001 Jul;31(7):1999–2006.
308. Mundt C, Licence S, Shimizu T, Melchers F, Mårtensson IL. Loss of precursor B cell expansion but not allelic exclusion in VpreB1/VpreB2 double-deficient mice. *J Exp Med*. 2001;193(4):435–45.
309. Mangum D, Downie J, Mason C, Jahromi M, Joshi D, Rodic V, et al. VPRED1 deletions occur independent of lambda light chain rearrangement in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2014;28:216–220.
310. Kuster L, Grausenburger R, Fuka G, Kaindl U, Krapf G, Inthal A, et al. ETV6_RUNX1-positive relapses evolve from an ancestral clone and frequently acquire deletions of genes implicated in glucocorticoid signaling. *Blood*. 2011 Mar 3;117(9):2658–67.
311. Jumaa H, Bossaller L, Portugal K, Storch B, Lotz M, Flemming A, et al. Deficiency of the adaptor SLP-65 in pre-B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2003 May 22;423(6938):452–6.
312. Imai C, Ross ME, Reid G, Coustan-Smith E, Schultz KR, Pui C-H, et al. Expression of the adaptor protein BLNK/SLP-65 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2004;18:922–5.
313. Nakayama J, Yamamoto M, Hayashi K, Satoh H, Bundo K, Kubo M, et al. BLNK suppresses pre B-cell leukemogenesis through inhibition of JAK3. *Blood*. 2009;113(7):1483–92.
314. Yuvaraj S, Hendriks RW. http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_BLNK.html
315. Watanabe N, Gavrieli M, Sedy JR, Yang J, Fallarino F, Loftin SK, et al. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat Immunol*. 2003;4(7):670–9.
316. Alapat D, Coviello-Malle J, Owens R, Qu P, Barlogie B, Shaughnessy JD, et al. Diagnostic usefulness and prognostic impact of CD200 expression in lymphoid malignancies and plasma cell myeloma. *Am J Clin Pathol*. 2012;137(1):93–100.
317. Adnan Awad S, Kamel MM, Ayoub MA, Kamel AM, Elnoshokaty EH, El Hifnawi N. Immunophenotypic Characterization of Cytogenetic Subgroups in Egyptian Pediatric Patients With B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk*. 2016;16(August):S19–S24.e1.
318. Coustan-smith E, Song G, Clark C, Key L, Liu P, Mehrpooya M, et al. New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011;117(23):6267–6276.
319. Ivanov Öfverholm I, Tran AN, Olsson L, Zachariadis V, Heyman M, Rudd E, et al. Detailed gene dose analysis reveals recurrent focal gene deletions in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2016;57(9):2161–2170.
320. Lundin C, Hjorth L, Behrendtz M, Nordgren A, Palmqvist L, Andersen MK, et al. High frequency of BTG1 deletions in acute lymphoblastic leukemia in children with down syndrome. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012 Feb;51(2):196–206.
321. Okamura RM, Sigvardsson M, Galceran J, Verbeek S, Clevers H, Grosschedl R. Redundant regulation of T cell differentiation and TCRalpha gene expression by the transcription factors LEF-1 and TCF-1. *Immunity*. 1998;8(1):11–20.
322. Yu S, Zhou X, Steinke FC, Liu C, Chen SC, Zagorodna O, et al. The TCF-1 and LEF-1 Transcription Factors Have Cooperative and Opposing Roles in T Cell Development and Malignancy. *Immunity*. 2012;37(5):813–26.
323. Nutt SL, Morrison AM, Dörfler P, Rolink A, Busslinger M. Identification of BSAP (Pax-5) target genes in early B-cell development by loss- and gain-of-function experiments. *EMBO J*. 1998;17(8):2319–33.
324. Schebesta M, Pfeiffer PL, Busslinger M. Control of pre-BCR signaling by Pax5-dependent activation of the BLNK gene. *Immunity*. 2002;17(4):473–85.
325. Jin Z-X, Kishi H, Wei X-C, Matsuda T, Saito S, Muraguchi A. Lymphoid enhancer-binding factor-1 binds and activates the recombination-activating gene-2 promoter together with c-Myb and Pax-5 in immature B cells. *J Immunol*. 2002;169(7):3783–92.
326. Gutierrez A, Sanda T, Ma W, Zhang J, Grebliunaitė R, Dahlberg S, et al. Inactivation of LEF1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010 Apr 8;115(14):2845–51.
327. Reya T, O'Riordan M, Okamura R, Devaney E, Willert K, Nusse R, et al. Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity*. 2000;13(1):15–24.
328. Yan L, Ping N, Zhu M, Sun A, Xue Y, Ruan C, et al. Clinical, immunophenotypic, cytogenetic, and molecular genetic features in 117 adult patients with mixed-phenotype acute leukemia defined by WHO-2008 classification. *Haematologica*. 2012;97(11):1708–12.
329. Kühnl A, Gökbüget N, Kaiser M, Schlee C, Stroux A, Burmeister T, et al. Overexpression of LEF1 predicts unfavorable outcome in adult patients with B-precursor acute lymphoblastic leukemia Overexpression of LEF1 predicts unfavorable outcome in adult patients with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011;118(24):6362–7.
330. Jia M, Zhao HZ, Shen HP, Cheng YP, Luo ZB, Li SS, et al. Overexpression of lymphoid enhancer-binding factor-1 (LEF1) is a novel favorable prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Lab Hematol*. 2015;37(5):631–40.
331. Guo X, Zhang R, Liu J, Li M, Song C, Dovat S, et al. Characterization of LEF1 high expression and novel mutations in adult acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One*. 2015;10(5):1–13.
332. Rasighaemi P, Onnebo SMN, Liongue C, Ward AC. ETV6 (TEL1) regulates embryonic hematopoiesis in zebrafish. *Haematologica*. 2015;100(1):23–31.
333. Hock H, Meade E, Medeiros S, Schindler JW, Valk PJM, Fujiwara Y, et al. Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival. *Genes Dev*. 2004;18(19):2336–41.
334. Sakurai T, Yamada T, Kihara-Negishi F, Teramoto S, Sato Y, Izawa T, et al. Effects of overexpression of the Ets family

- transcription factor TEL on cell growth and differentiation of K562 cells. *Int J Oncol.* 2003;22(6):1327–33.
335. Yamagata T, Maki K, Waga K, Mitani K. TEL/ETV6 induces apoptosis in 32D cells through p53-dependent pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;347(2):517–26.
336. Fenrick R, Wang L, Nip J, Amann JM, Rooney RJ, Walker-Daniels J, et al. TEL, a putative tumor suppressor, modulates cell growth and cell morphology of ras-transformed cells while repressing the transcription of stromelysin-1. *Mol Cell Biol.* 2000;20(16):5828–39.
337. Van Rompaey L, Potter M, Adams C, Grosveld G. Tel induces a G1 arrest and suppresses Ras-induced transformation. *Oncogene.* 2000;19(46):5244–50.
338. Wlodarska I, Marynen P, La Starza R, Mecucci C, Van den Berghe H. The ETV6, CDKN1B and D12S178 loci are involved in a segment commonly deleted in various 12p aberration in different hematological malignancies. *Cytogenet Cell Genet.* 1996;72(2–3):229–35.
339. Wall M, Rayeroux KC, MacKinnon RN, Zordan A, Campbell LJ. ETV6 deletion is a common additional abnormality in patients with myelodysplastic syndromes or acute myeloid leukemia and monosomy 7. *Haematologica.* 2012 Dec;97(12):1933–6.
340. Raynaud SD, Baens M, Grosgeorge J, Rodgers K, Reid CD, Dainton M, et al. Fluorescence in situ hybridization analysis of t(3;12)(q26; p13): a recurring chromosomal abnormality involving the TEL gene (ETV6) in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 1996;88(2):682–9.
341. Cavé H, Cacheux V, Raynaud S, Brunie G, Bakkus M, Cochaux P, et al. ETV6 is the target of chromosome 12p deletions in t(12;21) childhood acute lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 1997 Sep;11(9):1459–64.
342. Patel N, Goff LK, Clark T, Ford AM, Foot N, Lillington D, et al. Expression profile of wild-type ETV6 in childhood acute leukaemia. *Br J Haematol.* 2003;122(1):94–8.
343. Bokemeyer A, Eckert C, Meyr F, Koerner G, von Stackelberg A, Ullmann R, et al. Copy number genome alterations are associated with treatment response and outcome in relapsed childhood ETV6/RUNX1-positive acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2014;99(4):706–14.
344. van Delft FW, Horsley S, Colman S, Anderson K, Bateman C, Zuna J, et al. Clonal origins of relapse in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia Clonal origins of relapse in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2011;117(23):6247–54.
345. Rasighaemi P, Liongue C, Onnebo SMN, Ward AC. Functional analysis of truncated forms of ETV6. *Br J Haematol.* 2015 Nov;171(4):658–62.
346. Zuna J, Ford AM, Peham M, Patel N, Saha V, Eckert C, et al. TEL deletion analysis supports a novel view of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res.* 2004 Aug 15;10(16):5355–60.
347. Ko D-H, Jeon Y, Kang HJ, Park KD, Shin HY, Kim HK, et al. Native ETV6 deletions accompanied by ETV6-RUNX1 rearrangements are associated with a favourable prognosis in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a candidate for prognostic marker. *Br J Haematol.* 2011 Nov;155(4):530–3.
348. Attarbaschi A, Mann G, König M, Dworzak MN, Trebo MM, Mühlegger N, et al. Incidence and relevance of secondary chromosome abnormalities in childhood TEL/AML1+ acute lymphoblastic leukemia: an interphase FISH analysis. *Leukemia.* 2004;18(10):1611–6.
349. Loughran SJ, Kruse E a, Hacking DF, de Graaf C a, Hyland CD, Willson T a, et al. The transcription factor Erg is essential for definitive hematopoiesis and the function of adult hematopoietic stem cells. *Nat Immunol.* 2008;9(7):810–9.
350. Huang Y, Thoms J, Tursky M, Knezevic K, Beck D, Chandrakanthan V, et al. MAPK/ERK2 phosphorylates ERG at serine 283 in leukemic cells and promotes stem cell signatures and cell proliferation. *Leukemia.* 2016;30(10):1552–1561.
351. Taoudi S, Bee T, Hilton A, Knezevic K, Scott J, Willson TA, et al. ERG dependence distinguishes developmental control of hematopoietic stem cell maintenance from hematopoietic specification. *Genes Dev.* 2011;25(3):251–62.
352. Tsuzuki S, Taguchi O, Seto M. Promotion and maintenance of leukemia by ERG. *Blood.* 2011;117(14):3858–68.
353. Chen DW-C, Saha V, Liu J-Z, Schwartz J-M, Krstic-Demonacos M. Erg and AP-1 as determinants of glucocorticoid response in acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene.* 2013 Jun 20;32(25):3039–48.
354. Mochmann LH, Neumann M, Heide EK Von Der, Nowak V. ERG induces a mesenchymal-like chemoresistance in leukemia cells state associated with chemoresistance in leukemia cells. *Oncotarget.* 2013;5(2):351–62.
355. Marcucci G, Maharry K, Whitman SP, Vukosavljevic T, Paschka P, Langer C, et al. High expression levels of the ETS-related gene, ERG, predict adverse outcome and improve molecular risk-based classification of cytogenetically normal acute myeloid leukemia: A cancer and leukemia group B study. *J Clin Oncol.* 2007;25(22):3337–43.
356. Baldus CD, Burmeister T, Martus P, Schwartz S, Gökbuget N, Bloomfield CD, et al. High expression of the ETS transcription factor ERG predicts adverse outcome in acute T-lymphoblastic leukemia in adults. *J Clin Oncol.* 2006;24(29):4714–20.
357. Olsson L, Ivanov Ofverholm I, Noron-Nystrom U, Zachariadis V, Nordlund J, Sjogren H, et al. The clinical impact of IKZF1 deletions in paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia is independent of minimal residual disease stratification in Nordic Society for Paediatric Haematology and Oncology treatment protocols used between 1992 a. *Br J Haematol.* 2015;170(6):847–58.
358. Della Ragione F, Mercurio C, Iolascon A. Cell cycle regulation and human leukemias: the role of p16INK4 gene inactivation in the development of human acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 1995;80(6):557–68.
359. Carrasco Salas P, Fernández L, Vela M, Bueno D, González B, Valentín J, et al. The role of CDKN2A/B deletions in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol.* 2016;33(7–8):415–22.
360. Grausenburger R, Bastelberger S, Eckert C, Kauer M, Stanulla M, Frech C, et al. Genetic alterations in glucocorticoid signaling pathway components are associated with adverse prognosis in children with relapsed ETV6/RUNX1-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2016 May;57(5):1163–73.
361. Tutor O, Diaz MA, Ramirez M, Algara P, Madero L, Martinez P. Loss of heterozygosity of p16 correlates with minimal residual disease at the end of the induction therapy in non-high risk childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.* 2002;26(9):817–20.
362. Braun M, Pastorczak A, Fendler W, Madzio J, Tomasik B, Taha J, et al. Biallelic loss of CDKN2A is associated with poor response to treatment in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2017 May;58(5):1162–1171.
363. Dalle JH, Fournier M, Nelken B, Mazingue F, Lai JL, Bauters F, et al. p16(INK4a) immunocytochemical analysis is an

- independent prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002;99(7):2620–3.
364. Heyman M, Rasool O, Borgonovo Brandter L, Liu Y, Grandér D, Söderhäll S, et al. Prognostic importance of p15INK4B and p16INK4A gene inactivation in childhood acute lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 1996 May;14(5):1512–20.
365. Carter TL, Watt PM, Kumar R, Burton PR, Reaman GH, Sather HN, et al. Hemizygous p16INK4A deletion in pediatric acute lymphoblastic leukemia predicts independent risk of relapse. *Blood*. 2001;97(2):572–4.
366. Moorman A V, Enshaei A, Schwab C, Wade R, Chilton L, Elliott A, et al. A novel integrated cytogenetic and genomic classification refines risk stratification in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2014;124(9):1434–44.
367. Sulong S, Moorman A V, Irving J a E, Strefford JC, Konn ZJ, Case MC, et al. A comprehensive analysis of the CDKN2A gene in childhood acute lymphoblastic leukemia reveals genomic deletion, copy number neutral loss of heterozygosity, and association with specific cytogenetic subgroups. *Blood*. 2009 Jan 1;113(1):100–7.
368. Usvasalo A, Savola S, Rätty R, Vettenranta K, Harila-Saari A, Koistinen P, et al. CDKN2A deletions in acute lymphoblastic leukemia of adolescents and young adults: an array CGH study. *Leuk Res*. 2008;32(8):1228–35.
369. Kim M, Yim SH, Cho NS, Kang SH, Ko DH, Oh B, et al. Homozygous deletion of CDKN2A (p16, p14) and CDKN2B (p15) genes is a poor prognostic factor in adult but not in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia: a comparative deletion and hypermethylation study. *Cancer Genet Cytogenet*. 2009;195(1):59–65.
370. van Zutven LJCM, van Drunen E, de Bont JM, Wattel MM, Den Boer ML, Pieters R, et al. CDKN2 deletions have no prognostic value in childhood precursor-B acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia*. 2005;19(7):1281–4.
371. Mirebeau D, Acquaviva C, Suciú S, Bertin R, Dastugue N, Robert A, et al. The prognostic significance of CDKN2A, CDKN2B and MTAP inactivation in B-lineage acute lymphoblastic leukemia of childhood. Results of the EORTC studies 58881 and 58951. *Haematologica*. 2006;91(7):881–5.
372. Iacobucci I, Ferrari A, Lonetti A, Papayannidis C, Paoloni F, Trino S, et al. CDKN2A/B Alterations Impair Prognosis in Adult BCR-ABL1-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia Patients. *Clin Cancer Res*. 2011 Dec 1;17(23):7413–23.
373. Kees UR, Burton PR, Lu C, Baker DL. Homozygous deletion of the p16/MTS1 gene in pediatric acute lymphoblastic leukemia is associated with unfavorable clinical outcome. *Blood*. 1997;89(11):4161–6.
374. Faderl S, Kantarjian HM, Manshouri T, Chan CY, Pierce S, Hays KJ, et al. The prognostic significance of p16INK4a/p14ARF and p15INK4b deletions in adult acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*. 1999 Jul;5(7):1855–61.
375. Graf Einsiedel H, Taube T, Hartmann R, Eckert C, Seifert G, Wellmann S, et al. Prognostic value of p16(INK4a) gene deletions in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2001;97(12):4002–4.
376. Braekeleer M De, Douet-Guilbert N, BRAEKELEER EDE. Prognostic impact of p15 gene aberrations in acute leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2016;58(2):257–65.
377. Hoshino K, Asou N, Okubo T, Suzushima H, Kiyokawa T, Kawano F, et al. The absence of the p15INK4B gene alterations in adult patients with precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia is a favourable prognostic factor. *Br J Haematol*. 2002 Jun;117(3):531–40.
378. Chudnovsky Y, Khavari PA, Adams AE. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J Clin Invest*. 2005;115(4):813–24.
379. Mihara K, Cao X, Yen A, Chandler S, Driscoll B, Murphree a L, et al. Cell Cycle-Dependent Regulation of Phosphorylation of the Human Retinoblastoma Gene Product. *Science*. 1989 Dec 8;246(4935):1300–3.
380. Liu H, Tang X, Srivastava A, Pécot T, Daniel P, Hemmelgarn B, et al. Redeployment of Myc and E2f1–3 drives Rb-deficient cell cycles. *Nat Cell Biol*. 2015 Jul 20;17(8):1036–48.
381. Harrison CJ, Moorman A V, Schwab C, Carroll AJ, Raetz EA, Devidas M, et al. An international study of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): cytogenetic characterization and outcome. *Leukemia*. 2014 May;28(5):1015–21.
382. Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, et al. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev*. 1994 Jan;8(1):9–22.
383. Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell*. 1995;6(4):387–400.
384. Sato Y, Suto Y, Pietenpol J, Golub TR, Gilliland DG, Davis EM, et al. TEL and KIP1 define the smallest region of deletions on 12p13 in hematopoietic malignancies. *Blood*. 1995;86(4):1525–33.
385. Kuiper RP, Schoenmakers EFP, van Reijmersdal S V, Hehir-Kwa JY, van Kessel AG, van Leeuwen FN, et al. High-resolution genomic profiling of childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesions affecting pathways involved in lymphocyte differentiation and cell cycle progression. *Leukemia*. 2007;21(6):1258–66.
386. Winkler GS. The mammalian anti-proliferative BTG/Tob protein family. *J Cell Physiol*. 2010;222(1):66–72.
387. Van Galen JC, Kuiper RP, Van Emst L, Levers M, Tijchon E, Scheijen B, et al. BTG1 regulates glucocorticoid receptor autoinduction in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010;115(23):4810–9.
388. Wada M, Bartram CR, Nakamura H, Hachiya M, Chen DL, Borenstein J, et al. Analysis of p53 mutations in a large series of lymphoid hematologic malignancies of childhood. *Blood*. 1993;82(10):3163–9.
389. Marks DI, Kurz BW, Link MP, Ng E, Shuster JJ, Lauer SJ, et al. High incidence of potential p53 inactivation in poor outcome childhood acute lymphoblastic leukemia at diagnosis. *Blood*. 1996;87(3):1155–61.
390. Zhu YM, Foroni L, McQuaker IG, Papaioannou M, Haynes a, Russell HH. Mechanisms of relapse in acute leukaemia: involvement of p53 mutated subclones in disease progression in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer*. 1999;79(7–8):1151–7.
391. Tang JL, Tien HF, Lin MT, Chen PJ, Chen YC. Frequent p53 mutation in relapsed acute lymphoblastic leukemia with cytogenetic instability: a longitudinal analysis. *Anticancer Res*. 1998;18(2B):1273–8.
392. Stengel A, Kern W, Haferlach T, Meggendorfer M, Fasan A, Haferlach C. The impact of TP53 mutations and TP53 deletions on survival varies between AML, ALL, MDS and CLL—an analysis of 3307 cases. *Leukemia*. 2016;31(May):1–34.
393. Chiaretti S, Brugnoletti F, Tavolaro S, Bonina S, Paoloni F, Marinelli M, et al. TP53 mutations are frequent in adult acute lymphoblastic leukemia cases negative for recurrent fusion genes and correlate with poor response to induction therapy. *Haematologica*. 2013;98(5):59–61.
394. Oshima K, Khabanian H, da Silva-Almeida AC, Tzoneva G, Abate F, Ambesi-Impiombato A, et al. Mutational landscape, clonal evolution patterns, and role of RAS mutations in relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci*. 2016;113(40):11306–11.

395. Brown VI, Hulitt J, Fish J, Sheen C, Bruno M, Xu Q, et al. Thymic stromal-derived lymphopoietin induces proliferation of pre-B leukemia and antagonizes mTOR inhibitors, suggesting a role for interleukin-7 α signaling. *Cancer Res.* 2007;67(20):9963–70.
396. Ray RJ, Furlonger C, Williams DE, Paige CJ. Characterization of thymic stromal-derived lymphopoietin (TSLP) in murine B cell development in vitro. *Eur J Immunol.* 1996;26(1):10–6.
397. Francis OL, Milford T-AM, Beldiman C, Payne KJ. Fine-tuning patient-derived xenograft models for precision medicine approaches in leukemia. *J Investig Med.* 2016 Mar;64(3):740–4.
398. Roll JD, Reuther GW. CRLF2 and JAK2 in B-progenitor acute lymphoblastic leukemia: A novel association in oncogenesis. *Cancer Res.* 2010;70(19):7347–52.
399. Peschon BJJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, Ramsde FJ, Maraskovsky E, Gliniak BC, et al. Brief Detnitive. *Gene.* 1994;180(November):6–11.
400. Puel a, Ziegler SF, Buckley RH, Leonard WJ. Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. *Nat Genet.* 1998;20(4):394–7.
401. Liu Y-J, Soumelis V, Watanabe N, Ito T, Wang Y-H, de Waal Malefyt R, et al. TSLP: An Epithelial Cell Cytokine that Regulates T Cell Differentiation by Conditioning Dendritic Cell Maturation. *Annu Rev Immunol.* 2007;25(1):193–219.
402. Rochman Y, Kashyap M, Robinson GW, Sakamoto K, Gomez-Rodriguez J, Wagner K-U, et al. Thymic stromal lymphopoietin-mediated STAT5 phosphorylation via kinases JAK1 and JAK2 reveals a key difference from IL-7-induced signaling. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(45):19455–60.
403. Shochat C, Tal N, Gryshkova V, Birger Y, Bandapalli OR, Cazzaniga G, et al. Novel activating mutations lacking cysteine in type i cytokine receptors in acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2014;124(1):106–10.
404. Shochat C, Tal N, Bandapalli OR, Palmi C, Ganmore I, te Kronnie G, et al. Gain-of-function mutations in *interleukin-7 receptor- α* (*IL7R*) in childhood acute lymphoblastic leukemias. *J Exp Med.* 2011;208(5):901–8.
405. Ott CJ, Kopp N, Bird L, Paranal RM, Qi J, Bowman T, et al. BET bromodomain inhibition targets both c-Myc and IL7R in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2012;120(14):2843–52.
406. Suryani S, Bracken LS, Harvey RC, Sia KC, Carol H, Chen IM, et al. Evaluation of the in vitro and in vivo efficacy of the JAK inhibitor AZD1480 against JAK-mutated acute lymphoblastic leukemia. *Mol Cancer Ther.* 2015;14(2):364–74.
407. Degryse S, Cools J. JAK kinase inhibitors for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *J Hematol Oncol.* 2014;8:91.
408. Peeters P, Raynaud SD, Cools J, Wlodarska I, Grosgeorge J, Philip P, et al. Fusion of TEL, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor-associated kinase JAK2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia. *Blood.* 1997 Oct 1;90(7):2535–40.
409. Lacronique V, Boureux A, Valle VD, Poirel H, Quang CT, Mauchauffé M, et al. A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science.* 1997 Nov 14;278(5341):1309–12.
410. Flex E, Petrangeli V, Stella L, Chiaretti S, Hornakova T, Knoops L, et al. Somatically acquired *JAK1* mutations in adult acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med.* 2008;205(4):751–8.
411. Bercovich D, Ganmore I, Scott LM, Wainreb G, Birger Y, Elimelech A, et al. Mutations of *JAK2* in acute lymphoblastic leukaemias associated with Down's syndrome. *Lancet.* 2008;372(9648):1484–92.
412. Mullighan CG, Zhang J, Harvey RC, Collins-Underwood JR, Schulman B a, Phillips L a, et al. *JAK* mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(23):9414–8.
413. Zhang J, Mullighan CG, Harvey RC, Wu G, Chen X, Edmonson M, et al. Key pathways are frequently mutated in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia : a report from the Children ' s Oncology Group. *Blood.* 2011;118(11):3080–7.
414. Feng J, Li Y, Jia Y, Fang Q, Gong X, Dong X, et al. Spectrum of somatic mutations detected by targeted next-generation sequencing and their prognostic significance in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *J Hematol Oncol.* 2017 Feb 28;10(1):61.
415. Neumann M, Vosberg S, Schlee C, Heesch S, Schwartz S, Gokbuget N, et al. Mutational spectrum of adult T-ALL. *Oncotarget.* 2015;6(5):2754–66.
416. Loh ML, Zhang J, Harvey RC, Roberts K, Payne-Turner D, Kang H, et al. Tyrosine kinome sequencing of pediatric acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group TARGET Project. *Blood.* 2013 Jan 17;121(3):485–8.
417. Maude SL, Dolai S, Delgado-martin C, Vincent T, Robbins A, Selvanathan A, et al. Efficacy of *JAK* / *STAT* pathway inhibition in murine xenograft models of early T-cell precursor (ETP) acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2015;125(11):1759–68.
418. Kucine N, Marubayashi S, Bhagwat N, Papalexli E, Koppikar P, Martin MS, et al. Tumor-specific HSP90 inhibition as a therapeutic approach in *JAK*-mutant acute lymphoblastic leukemias. *Blood.* 2015;126(22):2479–83.
419. Small D, Levenstein M, Kim E, Carow C, Amin S, Rockwell P, et al. *STK-1*, the human homolog of *Flk-2/Flt-3*, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(2):459–63.
420. Mackarehtschian K, Hardin JD, Moore KA, Boast S, Goff SP, Lemischka IR. Targeted disruption of the *flk2/flt3* gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity.* 1995;3(1):147–61.
421. McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE, Brasel K, De Smedt T, Maraskovsky E, et al. Mice lacking *flt3* ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood.* 2000 Jun 1;95(11):3489–97.
422. Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, Minden MD, et al. *MLL* translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet.* 2002;30(1):41–7.
423. Vicente C, Schwab C, Broux M, Geerdens E, Degryse S, Demeyer S, et al. Targeted sequencing identifies associations between *IL7R*-*JAK* mutations and epigenetic modulators in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2015;100(10):1301–10.
424. Neumann M, Heesch S, Schlee C, Schwartz S, Gökbuget N, Hoelzer D, et al. Whole-exome sequencing in adult ETP-ALL reveals a high rate of *DNMT3A* mutations. *Blood.* 2013 Jun 6;121(23):4749–52.
425. Garza-Veloz I, Martinez-Fierro ML, Jaime-Perez JC, Carrillo-Sanchez K, Ramos-Del Hoyo MG, Lugo-Trampe A, et al. Identification of differentially expressed genes associated with prognosis of B acute lymphoblastic leukemia. *Dis Markers.* 2015;2015:828145.
426. Barbosa TC, Andrade FG, Lopes BA, de Andrade CFG, Mansur MB, Emerenciano M, et al. Impact of mutations in *FLT3*, *PTPN11*

- and RAS genes on the overall survival of pediatric B cell precursor acute lymphoblastic leukemia in Brazil. *Leuk Lymphoma*. 2014;55(July 2013):1–9.
427. Irving J, Matheson E, Minto L, Blair H, Case M, Halsey C, et al. Ras pathway mutations are prevalent in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia and confer sensitivity to MEK inhibition. *Blood*. 2014;124(23):3420–30.
428. Furuichi Y, Goi K, Inukai T, Sato H, Nemoto A, Takahashi K, et al. Fms-like tyrosine kinase 3 ligand stimulation induces MLL-rearranged leukemia cells into quiescence resistant to antileukemic agents. *Cancer Res*. 2007;67(20):9852–61.
429. Eder M, Hemmati P, Kalina U, Ottman OG, Hoelzer D, Lyman SD, et al. Effects of Flt3 ligand and interleukin-7 on in vitro growth of acute lymphoblastic leukemia cells. *Exp Hematol*. 1996 Feb;24(2):371–7.
430. Xu F, Taki T, Yang HW, Hanada R, Hongo T, Ohnishi H, et al. Tandem duplication of the FLT3 gene is found in acute lymphoblastic leukaemia as well as acute myeloid leukaemia but not in myelodysplastic syndrome or juvenile chronic myelogenous leukaemia in children. *Br J Haematol*. 1999;105(1):155–62.
431. Taketani T, Taki T, Sugita K, Furuichi Y, Ishii E, Hanada R, et al. FLT3 mutations in the activation loop of tyrosine kinase domain are frequently found in infant ALL with MLL rearrangements and pediatric ALL with hyperdiploidy. *Blood*. 2004;103(3):1085–8.
432. Stam RW, den Boer ML, Schneider P, Nollau P, Horstmann M, Beverloo HB, et al. Targeting FLT3 in primary MLL-gene-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2005 Oct 1;106(7):2484–90.
433. Man LM, Morris AL, Keng M. New Therapeutic Strategies in Acute Lymphocytic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2017 Mar 28;1–10.
434. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*. 1989 Sep 1;49(17):4682–9.
435. Rodenhuis S, Bos JL, Slater RM, Behrendt H, van 't Veer M, Smets LA. Absence of oncogene amplifications and occasional activation of N-ras in lymphoblastic leukemia of childhood. *Blood*. 1986 Jun;67(6):1698–704.
436. Ahuja HG, Foti A, Bar-Eli M, Cline MJ. The pattern of mutational involvement of RAS genes in human hematologic malignancies determined by DNA amplification and direct sequencing. *Blood*. 1990 Apr 15;75(8):1684–90.
437. Neri A, Knowles DM, Greco A, McCormick F, Dalla-Favera R. Analysis of RAS oncogene mutations in human lymphoid malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Dec;85(23):9268–72.
438. Tartaglia M, Martinelli S, Cazzaniga G, Cordeddu V, Iavarone I, Spinelli M, et al. Genetic evidence for lineage-related and differentiation stage-related contribution of somatic PTPN11 mutations to leukemogenesis in childhood acute leukemia. *Blood*. 2004;104(2):307–13.
439. Paulsson K, Horvat A, Strömbeck B, Nilsson F, Heldrup J, Behrendtz M, et al. Mutations of FLT3, NRAS, KRAS, and PTPN11 are frequent and possibly mutually exclusive in high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008 Jan;47(1):26–33.
440. Case M, Matheson E, Minto L, Hassan R, Harrison CJ, Bown N, et al. Mutation of genes affecting the RAS pathway is common in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*. 2008;68(16):6803–9.
441. Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, Wu G, Heatley SL, Payne-Turner D, et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2012 Jan 11;481(7380):157–63.
442. Nikolaev SI, Garieri M, Santoni F, Falconnet E, Ribaux P, Guipponi M, et al. Frequent cases of RAS-mutated Down syndrome acute lymphoblastic leukaemia lack JAK2 mutations. *Nat Commun*. 2014;5:1–14.
443. Al-Kzayer LFY, Sakashita K, Al-Jadiry MF, Al-Hadad SA, Ghali HH, Uyen LTN, et al. Analysis of KRAS and NRAS Gene Mutations in Arab Asian Children With Acute Leukemia: High Frequency of RAS Mutations in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2015 Dec;62(12):2157–61.
444. Van Vlierbergh P, Ambesi-Impiombato A, Perez-Garcia A, Haydu JE, Rigo I, Hadler M, et al. *ETV6* mutations in early immature human T cell leukemias. *J Exp Med*. 2011;208(13):2571–9.
445. Trentin L, Bresolin S, Giarin E, Bardini M, Serafin V, Accordi B, et al. Deciphering KRAS and NRAS mutated clone dynamics in MLL-AF4 paediatric leukaemia by ultra deep sequencing analysis. *Sci Rep*. 2016 Oct 4;6(October):34449.
446. Zhang J, Wang J, Liu Y, Sidik H, Young KH, Lodish HF, et al. Oncogenic Kras-induced leukemogenesis: Hematopoietic stem cells as the initial target and lineage-specific progenitors as the potential targets for final leukemic transformation. *Blood*. 2009;113(6):1304–14.
447. Sabnis AJ, Cheung LS, Dail M, Kang HC, Santaguida M, Hermiston ML, et al. Oncogenic Kras initiates leukemia in hematopoietic stem cells. *PLoS Biol*. 2009;7(3).
448. Dail M, Li Q, McDaniel A, Wong J, Akagi K, Huang B, et al. Mutant Ikzf1, KrasG12D, and Notch1 cooperate in T lineage leukemogenesis and modulate responses to targeted agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(11):5106–11.
449. Wang J, Liu Y, Li Z, Wang Z, Tan LX, Ryu MJ, et al. Endogenous oncogenic Nras mutation initiates hematopoietic malignancies in a dose- and cell type-dependent manner. *Blood*. 2011;118(2):368–79.
450. Wang J, Liu Y, Tan LX, Lo JC, Du J, Ryu MJ, et al. Distinct requirements of hematopoietic stem cell activity and Nras G12D signaling in different cell types during leukemogenesis. *Cell Cycle*. 2011;10(17):2836–9.
451. Prieto C, Stam RW, Agraz-Doblas A, Ballerini P, Camos M, Castaño J, et al. Activated KRAS cooperates with MLL-AF4 to promote extramedullary engraftment and migration of cord blood CD34+ HSPC but is insufficient to initiate leukemia. *Cancer Res*. 2016;76(8):2478–89.
452. Driessen EMC, van Roon E, Spijkers-Hagelstein JAP, Schneider P, de Lorenzo P, Valsecchi MG, et al. Frequencies and prognostic impact of RAS mutations in MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia in infants. *Haematologica*. 2013;98(6):937–44.
453. Trinquand A, Tanguy-Schmidt A, Abdelali R Ben, Lambert J, Beldjord K, Lengliné E, et al. Toward a NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN-based oncogenetic risk classification of adult T-Cell acute lymphoblastic leukemia: A group for research in adult acute lymphoblastic leukemia study. *J Clin Oncol*. 2013;31(34):4333–42.
454. Malinowska-Ozdowy K, Frech C, Schönegger A, Eckert C, Cazzaniga G, Stanulla M, et al. KRAS and CREBBP mutations: a relapse-linked malicious liaison in childhood high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2015;29(8):1656–67.
455. Chen C, Bartenhagen C, Gombert M, Okpanyi V, Binder V, R??ttgers S, et al. Next-generation-sequencing of recurrent childhood high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia reveals mutations typically associated with high risk patients. *Leuk Res*. 2015;39(9):990–1001.
456. Dixon ZA, Nicholson L, Zeppetzaer M, Matheson E, Sinclair P, Harrison CJ, et al. [1] Z. A. Dixon et al., “CREBBP knockdown

- enhances RAS/RAF/MEK/ERK signaling in Ras pathway mutated acute lymphoblastic leukemia but does not modulate chemotherapeutic response." *Haematologica*. 2017;102(4):736–45.
457. Davidsson J, Paulsson K, Lindgren D, Lilljebjörn H, Chaplin T, Forestier E, et al. Relapsed childhood high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia: presence of preleukemic ancestral clones and the secondary nature of microdeletions and RTK-RAS mutations. *Leukemia*. 2010;24(5):924–31.
 458. Xiao H, Wang L-M, Luo Y, Lai X, Li C, Shi J, et al. Mutations in epigenetic regulators are involved in acute lymphoblastic leukemia relapse following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Oncotarget*. 2016 Jan 19;7(3):2696–708.
 459. de Smith AJ, Ojha J, Francis SS, Sanders E, Endicott AA, Hansen HM, et al. Clonal and microclonal mutational heterogeneity in high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*. 2016;7(45):72733–45.
 460. George AA, Paz H, Fei F, Kirzner J, Kim Y-M, Heisterkamp N, et al. Phosphoflow-Based Evaluation of Mek Inhibitors as Small-Molecule Therapeutics for B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *PLoS One*. 2015;10(9):e0137917.
 461. Nonami A, Sattler M, Weisberg E, Liu Q, Zhang J, Patricelli MP, et al. Identification of novel therapeutic targets in acute leukemias with NRAS mutations using a pharmacologic approach. *Blood*. 2015 May 14;125(20):3133–43.
 462. Shi Z-Q, Yu D-H, Park M, Marshall M, Feng G-S. Molecular Mechanism for the Shp-2 Tyrosine Phosphatase Function in Promoting Growth Factor Stimulation of Erk Activity. *Mol Cell Biol*. 2000;20(5):1526–36.
 463. Maroun CR, Naujokas MA, Holgado-Madruga M, Wong AJ, Park M. The Tyrosine Phosphatase SHP-2 Is Required for Sustained Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase and Epithelial Morphogenesis Downstream from the Met Receptor Tyrosine Kinase. *Mol Cell Biol*. 2000;20(22):8513–25.
 464. Qu CK, Yu WM, Azzarelli B, Cooper S, Broxmeyer HE, Feng GS. Biased suppression of hematopoiesis and multiple developmental defects in chimeric mice containing Shp-2 mutant cells. *Mol Cell Biol*. 1998;18(10):6075–82.
 465. Qu CK, Nguyen S, Chen J, Feng GS. Requirement of Shp-2 tyrosine phosphatase in lymphoid and hematopoietic cell development. *Blood*. 2001;97(4):911–4.
 466. Malinowska-Ozdowy K, Frech C, Schönegger A, Eckert C, Cazzaniga G, Stanulla M, et al. KRAS and CREBBP mutations: a relapse-linked malicious liaison in childhood high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2015 Aug;29(8):1656–67. 467. Blobel G a. CREB-binding protein and p300: molecular integrators of hematopoietic transcription. *Blood*. 2000;95(3):745–55.
 468. Vo N, Goodman RH. CREB-binding Protein and p300 in Transcriptional Regulation. *J Biol Chem*. 2001;276(17):13505–8.
 469. Inthal a, Zeithofer P, Zeginigg M, Morak M, Grausenburger R, Fronkova E, et al. CREBBP HAT domain mutations prevail in relapse cases of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2012;26(8):1797–803.
 470. Huether R, Dong L, Chen X, Wu G, Parker M, Wei L, et al. The landscape of somatic mutations in epigenetic regulators across 1,000 paediatric cancer genomes. *Nat Commun*. 2014 Apr 8;5(7):3630.
 471. Mar BG, Bullinger LB, McLean KM, Grauman P V, Harris MH, Stevenson K, et al. Mutations in epigenetic regulators including SETD2 are gained during relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun*. 2014 Mar 24;5:3469.
 472. Zhu X, He F, Zeng H, Ling S, Chen A, Wang Y, et al. Identification of functional cooperative mutations of SETD2 in human acute leukemia. *Nat Genet*. 2014 Mar;46(3):287–93.
 473. Wang Q, Cheng T. Evidences for mutations in the histone modifying gene SETD2 as critical drivers in leukemia development. *Sci China Life Sci*. 2014 Sep;57(9):944–6.
 474. Glaser S, Schaft J, Lubitz S, Vintersten K, van der Hoeven F, Tufteland KR, et al. Multiple epigenetic maintenance factors implicated by the loss of Mll2 in mouse development. *Development*. 2006 Apr;133(8):1423–32.
 475. Issaeva I, Zonis Y, Rozovskaia T, Orlovsky K, Croce CM, Nakamura T, et al. Knockdown of ALR (MLL2) reveals ALR target genes and leads to alterations in cell adhesion and growth. *Mol Cell Biol*. 2007 Mar;27(5):1889–903.
 476. Guo C, Chen LH, Huang Y, Chang C-C, Wang P, Pirozzi CJ, et al. KMT2D maintains neoplastic cell proliferation and global histone H3 lysine 4 monomethylation. *Oncotarget*. 2013 Nov;4(11):2144–53.
 477. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, Goya R, Mungall KL, Corbett RD, et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature*. 2011 Jul 27;476(7360):298–303.
 478. Lindqvist CM, Nordlund J, Ekman D, Johansson A, Moghadam BT, Raine A, et al. The mutational landscape in pediatric acute lymphoblastic leukemia deciphered by whole genome sequencing. *Hum Mutat*. 2015 Jan;36(1):118–28.
 479. Van Der Meulen J, Speleman F, Van Vlierberghe P. The H3K27me3 demethylase UTX in normal development and disease. *Epigenetics*. 2014;9(5):658–68.
 480. Mar BG, Bullinger L, Basu E, Schlis K, Silverman LB, Döhner K, et al. Sequencing histone-modifying enzymes identifies UTX mutations in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2012 Aug;26(8):1881–3.
 481. Van Vlierberghe P, Ferrando A. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*. 2012 Oct;122(10):3398–406.
 482. De Keersmaecker K, Atak ZK, Li N, Vicente C, Patchett S, Girardi T, et al. Exome sequencing identifies mutation in CNOT3 and ribosomal genes RPL5 and RPL10 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2013 Feb;45(2):186–90.
 483. Benyoucef A, Palić CG, Wang C, Porter CJ, Chu A, Dai F, et al. UTX inhibition as selective epigenetic therapy against TAL1-driven T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes Dev*. 2016 Mar 1;30(5):508–21.
 484. Kuster L, Grausenburger R, Fuka G, Kaindl U, Krapf G, Inthal A, et al. ETV6/RUNX1-positive relapses evolve from an ancestral clone and frequently acquire deletions of genes implicated in glucocorticoid signaling. *Blood*. 2011 Mar 3;117(9):2658–67.
 485. Brouwer C, Vogels-Mentink TM, Keizer-Garritsen JJ, Trijbels FJM, Bökkerink JPM, Hoogerbrugge PM, et al. Role of 5'-nucleotidase in thiopurine metabolism: enzyme kinetic profile and association with thio-GMP levels in patients with acute lymphoblastic leukemia during 6-mercaptopurine treatment. *Clin Chim Acta*. 2005 Nov;361(1–2):95–103.
 486. Tzoneva G, Perez-Garcia A, Carpenter Z, Khiabani H, Tosello V, Allegretta M, et al. Activating mutations in the NT5C2 nucleotidase gene drive chemotherapy resistance in relapsed ALL. *Nat Med*. 2013 Mar;19(3):368–71.
 487. Meyer JA, Wang J, Hogan LE, Yang JJ, Dandekar S, Patel JP, et al. Relapse-specific mutations in NT5C2 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2013 Mar;45(3):290–4.
 488. Li B, Li H, Bai Y, Kirschner-Schwabe R, Yang JJ, Chen Y, et al. Negative feedback-defective PRPS1 mutants drive thiopurine resistance in relapsed childhood ALL. *Nat Med*. 2015 Jun 20;21(6):563–71.
 489. Nosal JM, Switzer RL, Becker MA. Overexpression, purification, and characterization of recombinant human 5-

- phosphoribosyl-1-pyrophosphate synthetase isozymes I and II. *J Biol Chem.* 1993 May 15;268(14):10168–75.
490. Buermeier AB, Deschênes SM, Baker SM, Liskay RM. Mammalian DNA mismatch repair. *Annu Rev Genet.* 1999;33:533–64.
491. Mark SC, Sandercock LE, Luchman HA, Baross A, Edelmann W, Jirik FR. Elevated mutant frequencies and predominance of G:C to A:T transition mutations in Msh6(-/-) small intestinal epithelium. *Oncogene.* 2002 Oct 10;21(46):7126–30.
492. Campbell MR, Nation PN, Andrew SE. A lack of DNA mismatch repair on an athymic murine background predisposes to hematologic malignancy. *Cancer Res.* 2005 Apr 1;65(7):2626–35.
493. Matheson EC, Hall AG. Expression of DNA mismatch repair proteins in acute lymphoblastic leukaemia and normal bone marrow. *Adv Exp Med Biol.* 1999;457:579–83.
494. Matheson EC, Hall AG. Assessment of mismatch repair function in leukaemic cell lines and blasts from children with acute lymphoblastic leukaemia. *Carcinogenesis.* 2003 Jan;24(1):31–8.
495. Richter-Pechařnska P, Kunz JB, Hof J, Zimmermann M, Rausch T, Bandapalli OR, et al. Identification of a genetically defined ultra-high-risk group in relapsed pediatric T-lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer J.* 2017 Feb 3;7(2):e523.
496. Nagel S, Pommerenke C, Meyer C, Kaufmann M, MacLeod RAF, Drexler HG. Identification of a tumor suppressor network in T-cell leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2017 Jan 31;1–15.
497. Martin A, Scharff MD. AID and mismatch repair in antibody diversification. *Nat Rev Immunol.* 2002 Aug;2(8):605–14.
498. Hoelzer D, Bassan R, Dombret H, Fielding A, Ribera JM, Buske C, et al. Acute lymphoblastic leukaemia in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2016 Sep;27(suppl 5):v69–82.
499. Koka A, Saygin C, Uzunaslın D, Ozdemir N, Apak H, Celkan T. A 17-year experience with ALL-BFM protocol in acute lymphoblastic leukemia: prognostic predictors and interruptions during protocol. *Leuk Res.* 2014 Jun;38(6):699–705.
500. Dores GM, Devesa SS, Curtis RE, Linet MS, Morton LM, Dores GM, et al. Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001–2007. *Blood.* 2011;119(1):34–43.
501. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol.* 1982 Dec;5(6):649–55.
502. Pui C, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2006 Jan 12;354(2):166–78.
503. Sirvent N, Cuciu S, Rialland X, Millot F, Benoit Y, Plantaz D, et al. Prognostic significance of the initial cerebro-spinal fluid (CSF) involvement of children with acute lymphoblastic leukaemia (ALL) treated without cranial irradiation: results of European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Children. *Eur J Cancer.* 2011 Jan;47(2):239–47.
504. Bürger B, Zimmermann M, Mann G, Kühl J, Löning L, Riehm H, et al. Diagnostic cerebrospinal fluid examination in children with acute lymphoblastic leukemia: significance of low leukocyte counts with blasts or traumatic lumbar puncture. *J Clin Oncol.* 2003 Jan 15;21(2):184–8.
505. Lazarus HM, Richards SM, Chopra R, Litzow MR, Burnett AK, Wiernik PH, et al. Central nervous system involvement in adult acute lymphoblastic leukemia at diagnosis: results from the international ALL trial MRC UKALL XII /ECOG E2993. *Blood.* 2006;108(2):465–72.
506. Annino L, Vegna ML, Camera A, Specchia G, Visani G, Fioritoni G, et al. Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): long-term follow-up of the GIMEMA ALL 0288 randomized study. *Blood.* 2002 Feb 1;99(3):863–71.
507. Brüggemann M, Raff T, Kneba M. Has MRD monitoring superseded other prognostic factors in adult ALL? *Blood.* 2012 Nov 29;120(23):4470–81.
508. Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, Bowman WP, Carroll AJ, Carroll WL, et al. 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.* 2008 Jun 15;111(12):5477–85.
509. Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, Schrauder A, Panzer-Grümayer R, Möricke A, et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood.* 2010 Apr 22;115(16):3206–14.
510. Pieters R, de Groot-Kruseman H, Van der Velden V, Fiocco M, van den Berg H, de Bont E, et al. Successful Therapy Reduction and Intensification for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Based on Minimal Residual Disease Monitoring: Study ALL10 From the Dutch Childhood Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2016 Aug 1;34(22):2591–601.
511. Ortega JJ, Ribera JM, Oriol A, Bastida P, González ME, Calvo C, et al. Early and delayed consolidation chemotherapy significantly improves the outcome of children with intermediate risk acute lymphoblastic leukemia. Final results of the prospective randomized PETHEMA ALL-89 TRIAL. *Haematologica.* 2001 Jun;86(6):586–95.
512. van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia.* 2003 Dec;17(12):2257–317.
513. Ladetto M, Brüggemann M, Monitillo L, Ferrero S, Pepin F, Drandi D, et al. Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders. *Leukemia.* 2014 Jun;28(6):1299–307.
514. Faham M, Zheng J, Moorhead M, Carlton VEH, Stow P, Coustan-Smith E, et al. Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2012 Dec 20;120(26):5173–80. A
515. Pulsipher M a, Carlson C, Langholz B, Wall D a, Schultz KR, Bunin N, et al. IgH-V(D)J NGS-MRD measurement pre- and early post-allotransplant defines very low- and very high-risk ALL patients. *Blood.* 2015 May 28;125(22):3501–8.
516. Dördelmann M, Reiter A, Borkhardt A, Ludwig WD, Götz N, Viehmann S, et al. Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1999 Aug 15;94(4):1209–17.
517. Brüggemann M, Raff T, Flohr T, Gökbuget N, Nakao M, Droese J, et al. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2006 Feb 1;107(3):1116–23.
518. Bassan R, Hoelzer D. Modern therapy of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 2011 Feb 10;29(5):532–43.
519. Bassan R, Spinelli O, Oldani E, Intermesoli T, Tosi M, Peruta B, et al. Improved risk classification for risk-specific therapy based on the molecular study of minimal residual disease (MRD) in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood.* 2009 Apr 30;113(18):4153–62.
520. Specchia G, Pastore D, Carluccio P, Liso A, Mestice A, Rizzi R, et al. FLAG-IDA in the treatment of refractory/relapsed adult acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol.* 2005 Nov;84(12):792–5.
521. Hijiya N, Thomson B, Isakoff MS, Silverman LB, Steinherz PG, Borowitz MJ, et al. Phase 2 trial of clofarabine in combination with etoposide and cyclophosphamide in pediatric patients with refractory or relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Blood.*

- 2011 Dec 1;118(23):6043–9.
522. O'Brien S, Schiller G, Lister J, Damon L, Goldberg S, Aulitzky W, et al. High-dose vincristine sulfate liposome injection for advanced, relapsed, and refractory adult Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2013 Feb 20;31(6):676–83.
523. Gökbüget N, Basara N, Baurmann H, Beck J, Brüggemann M, Diedrich H, et al. High single-drug activity of nelarabine in relapsed T-lymphoblastic leukemia/lymphoma offers curative option with subsequent stem cell transplantation. *Blood*. 2011 Sep 29;118(13):3504–11.
524. Chalandon Y, Thomas X, Hayette S, Cayuela J-M, Abbal C, Huguet F, et al. Randomized study of reduced-intensity chemotherapy combined with imatinib in adults with Ph-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2015 Jun 11;125(24):3711–9.
525. Segal E, Martens M, Wang H-L, Brazauskas R, Weisdorf D, Sandmaier BM, et al. Comparing outcomes of matched related donor and matched unrelated donor hematopoietic cell transplants in adults with B-Cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2017 Apr 27;1–10.
526. Solomon SR, Sizemore CA, Zhang X, Brown S, Holland HK, Morris LE, et al. Impact of Donor Type on Outcome after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Acute Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Oct;22(10):1816–22.
527. Kiehl MG, Kraut L, Schwerdtfeger R, Hertenstein B, Remberger M, Kroeger N, et al. Outcome of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in adult patients with acute lymphoblastic leukemia: no difference in related compared with unrelated transplant in first complete remission. *J Clin Oncol*. 2004 Jul 15;22(14):2816–25.
528. Yu S, Fan Q, Sun J, Fan Z, Zhang Y, Jiang Q, et al. Haploidentical Transplantation Without In Vitro T-Cell Depletion Results in Outcomes Equivalent to Those of Contemporaneous Matched Sibling and Unrelated Donor Transplantation for Acute Leukemia. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Mar;95(11):e2973.
529. Piemontese S, Ciceri F, Labopin M, Bacigalupo A, Huang H, Santarone S, et al. A survey on unmanipulated haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in adults with acute leukemia. *Leukemia*. 2015 May;29(5):1069–75.
530. Khandelwal P, Millard HR, Thiel E, Abdel-Azim H, Abraham AA, Auletta JJ, et al. Hematopoietic Stem Cell Transplant Activity in Pediatric Cancer between 2008 and 2014 in the United States: a CIBMTR Report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017 Apr 24;0(0).
531. Gorin N-C, Giebel S, Labopin M, Savani BN, Mohty M, Nagler A. Autologous stem cell transplantation for adult acute leukemia in 2015: time to rethink? Present status and future prospects. *Bone Marrow Transplant*. 2015 Dec;50(12):1495–502.
532. El Fakih R, Kharfan-Dabaja MA, Aljurf M. Refining the Role of Hematopoietic Cell Transplantation for Acute Lymphoblastic Leukemia as Novel Therapies Emerge. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Dec;22(12):2126–33.
533. Cornelissen JJ, van der Holt B, Verhoef GEG, van't Veer MB, van Oers MHJ, Schouten HC, et al. Myeloablative allogeneic versus autologous stem cell transplantation in adult patients with acute lymphoblastic leukemia in first remission: a prospective sibling donor versus no-donor comparison. *Blood*. 2009 Feb 5;113(6):1375–82.
534. Giebel S, Labopin M, Gorin NC, Caillot D, Leguay T, Schaap N, et al. Improving results of autologous stem cell transplantation for Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia in the era of tyrosine kinase inhibitors: a report from the Acute Leukaemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transpl. *Eur J Cancer*. 2014 Jan;50(2):411–7.
535. Wetzler M, Watson D, Stock W, Koval G, Mulkey FA, Hoke EE, et al. Autologous transplantation for Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia achieves outcomes similar to allogeneic transplantation: results of CALGB Study 10001 (Alliance). *Haematologica*. 2014 Jan;99(1):111–5.
536. Biondi A, Schrappe M, De Lorenzo P, Castor A, Lucchini G, Gandemer V, et al. Imatinib after induction for treatment of children and adolescents with Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia (EsPhALL): a randomised, open-label, intergroup study. *Lancet Oncol*. 2012 Sep;13(9):936–45.
537. Ribera J-M, Oriol A, González M, Vidriales B, Brunet S, Esteve J, et al. Concurrent intensive chemotherapy and imatinib before and after stem cell transplantation in newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. Final results of the CSTIBES02 trial. *Haematologica*. 2010 Jan;95(1):87–95.
538. Foà R, Vitale A, Vignetti M, Meloni G, Guarini A, De Propris MS, et al. Dasatinib as first-line treatment for adult patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011 Dec 15;118(25):6521–8. A
539. Pfeifer H, Wassmann B, Bethge W, Dengler J, Bornhäuser M, Stadler M, et al. Randomized comparison of prophylactic and minimal residual disease-triggered imatinib after allogeneic stem cell transplantation for BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2013 Jun;27(6):1254–62.
540. Ribera J-M, García O, Oriol A, Gil C, Montesinos P, Bernal T, et al. Feasibility and results of subtype-oriented protocols in older adults and fit elderly patients with acute lymphoblastic leukemia: Results of three prospective parallel trials from the PETHEMA group. *Leuk Res*. 2016 Feb;41:12–20.
541. Soverini S, De Benedittis C, Papayannidis C, Paolini S, Venturi C, Iacobucci I, et al. Drug resistance and BCR-ABL kinase domain mutations in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia from the imatinib to the second-generation tyrosine kinase inhibitor era: The main changes are in the type of mutations, but not in the frequency of mutation involvement. *Cancer*. 2014;120(7):1002–9.
542. Soverini S, Gnani A, Colarossi S, Castagnetti F, Abruzzese E, Paolini S, et al. Philadelphia-positive patients who already harbor imatinib-resistant Bcr-Abl kinase domain mutations have a higher likelihood of developing additional mutations associated with resistance to second- or third-line tyrosine kinase inhibitors. *Blood*. 2009;114(10):2168–71.
543. Sanford DS, Kantarjian H, O'Brien S, Jabbour E, Cortes J, Ravandi F. The role of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2015;15(4):365–73.
544. Lavallade H De, Kizilers A. The importance of mutational analysis in chronic myeloid leukaemia for treatment choice. *EMJ Oncol*. 2016;4(1):86–95.
545. Ribera J-M, García O, Grande C, Esteve J, Oriol A, Bergua J, et al. Dose-intensive chemotherapy including rituximab in Burkitt's leukemia or lymphoma regardless of human immunodeficiency virus infection status: final results of a phase 2 study (Burkimab). *Cancer*. 2013 May 1;119(9):1660–8.
546. Hoelzer D, Walewski J, Döhner H, Viardot A, Hiddemann W, Spiekermann K, et al. Improved outcome of adult Burkitt lymphoma/leukemia with rituximab and chemotherapy: report of a large prospective multicenter trial. *Blood*. 2014 Dec

- 18;124(26):3870–9.
547. Bhojwani D, Pui C-H. Relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol.* 2013;14(6):e205-17.
548. Nagasawa T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol.* 2006 Feb;6(2):107–16.
549. Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri S V. Monoclonal antibody and intravenous immunoglobulin therapy for rheumatic diseases: rationale and mechanisms of action. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2007 May;3(5):262–72.
550. Raponi S, De Propriis MS, Intoppa S, Milani ML, Vitale A, Elia L, et al. Flow cytometric study of potential target antigens (CD19, CD20, CD22, CD33) for antibody-based immunotherapy in acute lymphoblastic leukemia: analysis of 552 cases. *Leuk Lymphoma.* 2011 Jun;52(6):1098–107.
551. Piccaluga PP, Arpinati M, Candoni A, Laterza C, Paolini S, Gazzola A, et al. Surface antigens analysis reveals significant expression of candidate targets for immunotherapy in adult acute lymphoid leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2011 Feb;52(2):325–7.
552. Thomas DA, O'Brien S, Faderl S, Garcia-Manero G, Ferrajoli A, Wierda W, et al. Chemoimmunotherapy with a modified hyper-CVAD and rituximab regimen improves outcome in de novo Philadelphia chromosome-negative precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 2010 Aug 20;28(24):3880–9.
553. Chevallier P, Pigneux A, Robillard N, Ayari S, Guillaume T, Delaunay J, et al. Rituximab for the treatment of adult relapsed/refractory CD20 positive B-ALL patients: a pilot series. *Leuk Res.* 2012 Mar;36(3):311–5.
554. Maury S, Chevret S, Thomas X, Heim D, Leguay T, Huguet F, et al. Rituximab in B-Lineage Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 2016 Sep 15;375(11):1044–53.
555. Wierda WG, Padmanabhan S, Chan GW, Gupta I V, Lisby S, Osterborg A, et al. Ofatumumab is active in patients with fludarabine-refractory CLL irrespective of prior rituximab: results from the phase 2 international study. *Blood.* 2011 Nov 10;118(19):5126–9.
556. Raetz EA, Cairo MS, Borowitz MJ, Blaney SM, Krailo MD, Leil TA, et al. Chemoimmunotherapy reinduction with epratuzumab in children with acute lymphoblastic leukemia in marrow relapse: a Children's Oncology Group Pilot Study. *J Clin Oncol.* 2008 Aug 1;26(22):3756–62.
557. Narayanan PK, Ponce R, Hinkle B. Early De-risking Strategy for Novel Biotherapeutics. In: *Nonclinical Development of Novel Biologics, Biosimilars, Vaccines and Specialty Biologics.* Elsevier; 2013. p. 65–95.
558. Kantarjian H, Stein A, Gökbuğet N, Fielding AK, Schuh AC, Ribera J-M, et al. Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 2017;376(9):836–47.
559. Martinelli G, Boissel N, Chevallier P, Ottmann O, Gökbuğet N, Topp MS, et al. Complete Hematologic and Molecular Response in Adult Patients With Relapsed/Refractory Philadelphia Chromosome-Positive B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Following Treatment With Blinatumomab: Results From a Phase II, Single-Arm, Multicenter Study. *J Clin Oncol.* 2017 Mar 29;JCO2016693531.
560. von Stackelberg A, Locatelli F, Zugmaier G, Handgretinger R, Trippett TM, Rizzari C, et al. Phase I/Phase II Study of Blinatumomab in Pediatric Patients With Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol.* 2016 Dec 20;34(36):4381–9.
561. Topp MS, Kufer P, Gökbuğet N, Goebeler M, Klinger M, Neumann S, et al. Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival. *J Clin Oncol.* 2011 Jun 20;29(18):2493–8.
562. Gökbuğet N, Zugmaier G, Klinger M, Kufer P, Stelljes M, Viardot A, et al. Long-term relapse-free survival in a phase 2 study of blinatumomab for the treatment of patients with minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2017 Apr;102(4):e132–5.
563. Braig F, Brandt A, Goebeler M, Tony H-P, Kurze A-K, Nollau P, et al. Resistance to anti-CD19/CD3 BiTE in acute lymphoblastic leukemia may be mediated by disrupted CD19 membrane trafficking. *Blood.* 2017 Jan 5;129(1):100–4.
564. de Vries JF, Zwaan CM, De Bie M, Voerman JSA, den Boer ML, van Dongen JJM, et al. The novel calicheamicin-conjugated CD22 antibody inotuzumab ozogamicin (CMC-544) effectively kills primary pediatric acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia.* 2012 Feb;26(2):255–64.
565. Kantarjian HM, DeAngelo DJ, Stelljes M, Martinelli G, Liedtke M, Stock W, et al. Inotuzumab Ozogamicin versus Standard Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 2016;375(8):740–53.
566. Rytting M, Triche L, Thomas D, O'Brien S, Kantarjian H. Initial experience with CMC-544 (inotuzumab ozogamicin) in pediatric patients with relapsed B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2014 Feb;61(2):369–72.
567. Maus M V., June CH. Making Better Chimeric Antigen Receptors for Adoptive T-cell Therapy. *Clin Cancer Res.* 2016 Apr 15;22(8):1875–84.
568. Davila ML, Riviere I, Wang X, Bartido S, Park J, Curran K, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med.* 2014 Feb 19;6(224):224ra25.
569. Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med.* 2014 Oct 16;371(16):1507–17.
570. Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, Cui YK, Delbrook C, Feldman SA, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet (London, England).* 2015 Feb 7;385(9967):517–28.
571. Maus M V, Grupp S a, Porter DL, June CH. Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood.* 2014 Apr 24;123(17):2625–35.
572. Di Stasi A, Tey S-K, Dotti G, Fujita Y, Kennedy-Nasser A, Martinez C, et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med.* 2011 Nov 3;365(18):1673–83.
573. Chiaretti S, Foà R. Management of adult Ph-positive acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2015;2015(1):406–13.
574. Gang EJ, Hsieh Y-T, Pham J, Zhao Y, Nguyen C, Huantes S, et al. Small-molecule inhibition of CBP/catenin interactions eliminates drug-resistant clones in acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene.* 2014 Apr 24;33(17):2169–78.
575. Elizabeth A. Raetz DM et. al. A phase I study of EZN-3042, a novel survivin messenger ribonucleic acid antagonist, administered in combination with chemotherapy in children with relapse acute lymphoblastic leukemia: a report from the

- Therapeutic Advances in Childhood Leukemia and Lymph. *Blood*. 2015;36(6):458–63.
576. Neri LM, Cani A, Martelli AM, Simioni C, Junghans C, Tabellini G, et al. Targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in B-precursor acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic potential. *Leukemia*. 2014 Apr 29;28(4):739–48.
577. Piovan E, Yu J, Tosello V, Herranz D, Ambesi-Impiombato A, DaSilva A, et al. Direct Reversal of Glucocorticoid Resistance by AKT Inhibition in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. 2013;24(6):766–76.
578. Kerstjens M, Driessen EMC, Willekes M, Pinhaños SS, Schneider P, Pieters R, et al. MEK inhibition is a promising therapeutic strategy for MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia patients carrying RAS mutations. *Oncotarget*. 2016; Available from:
579. Park E, Gang EJ, Hsieh Y-T, Schaefer P, Chae S, Klemm L, et al. Targeting survivin overcomes drug resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011;118(8):2191–9.
580. Daigle SR, Olhava EJ, Therkelsen CA, Basavapathruni A, Jin L, Boriack-Sjodin PA, et al. Potent inhibition of DOT1L as treatment of MLL-fusion leukemia. *Blood*. 2013;122(6):1017–25.
581. Chen CW, Armstrong SA. Targeting DOT1L and HOX gene expression in MLL-rearranged leukemia and beyond. *Exp Hematol*. 2015;43(8):673–84.
582. Maude S, Tasian S, Vincent T, Hall J, Roberts K, Collins R, et al. Targeting JAK2 and mtor in xenograft models of crlf2-overexpressing acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Pediatr Blood Cancer*. 2012;58(17):1014.
583. Chang BH, Johnson K, LaTocha D, Rowley JSJ, Bryant J, Burke R, et al. YM155 potently kills acute lymphoblastic leukemia cells through activation of the DNA damage pathway. *J Hematol Oncol*. 2015;8:39.
584. Waibel M, Solomon VS, Knight DA, Ralli RA, Kim SK, Banks KM, et al. Combined Targeting of JAK2 and Bcl-2/Bcl-xL to Cure Mutant JAK2-Driven Malignancies and Overcome Acquired Resistance to JAK2 Inhibitors. *Cell Rep*. 2013;5(4):1047–59.
585. Polyak K. Is Breast Tumor Progression Really Linear? *Clin Cancer Res*. 2008;14(2):339–41.
586. Notta F, Mullighan CG, Wang JCY, Poepl A, Doulatov S, Phillips LA, et al. Evolution of human BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia-initiating cells. *Nature*. 2011;469(7330):362–7.
587. Dick JE. Acute myeloid leukemia stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1044:1–5.
588. Diehn M, Cho RW, Clarke MF. Therapeutic Implications of the Cancer Stem Cell Hypothesis. *Semin Radiat Oncol*. 2009;19(2):78–86.
589. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012;481(7381):306–13.
590. Bashford-Rogers RJM, Nicolaou KA, Bartram J, Goulden NJ, Loizou L, Koumas L, et al. Eye on the B-ALL: B-cell receptor repertoires reveal persistence of numerous B-lymphoblastic leukemia subclones from diagnosis to relapse. *Leukemia*. 2016;30(May):1–10.
591. Bochtler T, Stölzel F, Heilig CE, Kunz C, Mohr B, Jauch A, et al. Clonal heterogeneity as detected by metaphase karyotyping is an indicator of poor prognosis in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2013;31(31):3898–905.
592. Mroz EA, Tward AD, Pickering CR, Myers JN, Ferris RL, Rocco JW. High intratumor genetic heterogeneity is related to worse outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2013;119(16):3034–42.
593. Ribera J-M, Oriol A, Sanz M-A, Tormo M, Fernández-Abellán P, del Potro E, et al. Comparison of the results of the treatment of adolescents and young adults with standard-risk acute lymphoblastic leukemia with the Programa Español de Tratamiento en Hematología pediatric-based protocol ALL-96. *J Clin Oncol*. 2008 Apr 10;26(11):1843–9.
594. Ribera J-M, Oriol A, Bethencourt C, Parody R, Hernández-Rivas J-M, Moreno M, et al. Comparison of intensive chemotherapy, allogeneic or autologous stem cell transplantation as post-remission treatment for adult patients with high-risk acute lymphoblastic leukemia. Results of the PETHEMA ALL-93 trial. *Haematologica*. 2005 Oct;90(10):1346–56.
595. <https://www.mrc-holland.com>. MRC HOLLAND.
596. Schwab CJ, Jones LR, Morrison H, Ryan SL, Yigitop H, Schouten JP, et al. 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 Cancer*. 2010 Dec;49(12):1104–13.
597. Al Zaabi EA, Fernandez LA, Sadek IA, Riddell DC, Greer WL. Multiplex ligation-dependent probe amplification versus multiprobe fluorescence in situ hybridization to detect genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia: a tertiary center experience. *J Mol Diagn*. 2010 Mar;12(2):197–203.
598. Coll-Mulet L, Santidrián AF, Cosiáls AM, Iglesias-Serret D, De Frias M, Grau J, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification for detection of genomic alterations in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2008;142(5):793–801.
599. Hömig-Hözel C, Savola S. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in tumor diagnostics and prognostics. *Diagn Mol Pathol*. 2012 Dec;21(4):189–206.
600. Zhu LJ, Gazin C, Lawson ND, Pagès H, Lin SM, Lapointe DS, et al. ChIPpeakAnno: a Bioconductor package to annotate ChIP-seq and ChIP-chip data. *BMC Bioinformatics*. 2010 May 11;11(1):237.
601. Ford CE, Jacobs PA, LaJtha LG. Human somatic chromosomes. *Nature*. 1958 Jun 7;181(4623):1565–8.
602. Propp S, Lizzi FA. Philadelphia chromosome in acute lymphocytic leukemia. *Blood*. 1970 Sep;36(3):353–60.
603. Catovsky D, Pittman S, O'Brien M, Cherchi M, Costello C, Foa R, et al. Multiparameter studies in lymphoid leukemias. *Am J Clin Pathol*. 1979 Oct;72(4 Suppl):736–45.
604. Bloomfield CD, Lindquist LL, Arthur D, McKenna RW, LeBien TW, Nesbit ME, et al. Chromosomal abnormalities in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*. 1981 Nov;41(11 Pt 2):4838–43.
605. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*. 1975 Nov 5;98(3):503–17.
606. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1975 May 25;94(3):441–8.
607. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*. 1981 Apr;112(2):195–203.
608. Forero-Castro M, Robledo C, Lumberras E, Benito R, Hernández-Sánchez JM, Hernández-Sánchez M, et al. The presence of genomic imbalances is associated with poor outcome in patients with Burkitt lymphoma treated with dose-intensive chemotherapy including rituximab. *Br J Haematol*. 2016 Feb;172(3):428–38.

609. Wlodarska I, Matthews C, Veyt E, Pospisilova H, Catherwood M a, Poulsen TS, et al. Telomeric IGH losses detectable by fluorescence in situ hybridization in chronic lymphocytic leukemia reflect somatic VH recombination events. *J Mol Diagn.* 2007 Feb;9(1):47–54.
610. Dijkman R, Tensen CP, Jordanova ES, Knijnenburg J, Hoefnagel JJ, Mulder AA, et al. Array-based comparative genomic hybridization analysis reveals recurrent chromosomal alterations and prognostic parameters in primary cutaneous large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2006 Jan 10;24(2):296–305.
611. Kim SW, Kim JW, Kim YT, Kim JH, Kim S, Yoon BS, et al. Analysis of chromosomal changes in serous ovarian carcinoma using high-resolution array comparative genomic hybridization: Potential predictive markers of chemoresistant disease. *Genes Chromosomes Cancer.* 2007 Jan;46(1):1–9.
612. Hwang K-T, Han W, Cho J, Lee JW, Ko E, Kim EK, et al. Genomic copy number alterations as predictive markers of systemic recurrence in breast cancer. *Int J cancer.* 2008 Oct 15;123(8):1807–15.
613. Loukopoulos P, Shibata T, Katoh H, Kokubu A, Sakamoto M, Yamazaki K, et al. Genome-wide array-based comparative genomic hybridization analysis of pancreatic adenocarcinoma: identification of genetic indicators that predict patient outcome. *Cancer Sci.* 2007 Mar;98(3):392–400.
614. Yoshihara T, Ishida M, Kinomura A, Katsura M, Tsuruga T, Tashiro S, et al. XRCC3 deficiency results in a defect in recombination and increased endoreduplication in human cells. *EMBO J.* 2004 Feb 11;23(3):670–80.
615. Bushell KR, Kim Y, Chan FC, Ben-Neriah S, Jenks A, Alcaide M, et al. Genetic inactivation of TRAF3 in canine and human B-cell lymphoma. *Blood.* 2015 Feb 5;125(6):999–1005.
616. Béné MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia.* 2011;25(4):567–74.
617. Kim M, Park J, Kim D-W, Kim Y-J, Jeon Y-W, Yoon J-H, et al. Impact of IKZF1 deletions on long-term outcomes of allo-SCT following imatinib-based chemotherapy in adult Philadelphia chromosome-positive ALL. *Bone Marrow Transplant.* 2015 Mar;50(3):354–62.
618. Yao Q-M, Liu K-Y, Gale RP, Jiang B, Liu Y-R, Jiang Q, et al. Prognostic impact of IKZF1 deletion in adults with common B-cell acute lymphoblastic leukemia. *BMC Cancer.* 2016 Apr 11;16(1):269.
619. Fang Q, Zhao X, Li Q, Li Y, Liu K, Tang K, et al. IKZF1 alterations and expression of CRLF2 predict prognosis in adult Chinese patients with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2017 Jan;58(1):127–37. A
620. Patel S, Mason CC, Glenn MJ, Paxton CN, South ST, Cessna MH, et al. Genomic analysis of adult B-ALL identifies potential markers of shorter survival. *Leuk Res.* 2017 May;56:44–51.
621. Zhang W, Kuang P, Li H, Wang F, Wang Y. Prognostic significance of IKZF1 deletion in adult B cell acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Ann Hematol.* 2017 Feb;96(2):215–25.
622. Liu P, Lin Z, Qian S, Qiao C, Qiu H, Wu Y, et al. Expression of dominant-negative Ikaros isoforms and associated genetic alterations in Chinese adult patients with leukemia. *Ann Hematol.* 2012 Jul;91(7):1039–49.
623. Zhang N, Li C, Xu D, Liu Y, Ding X, Shen K, et al. Ikaros6 is associated with BCR-ABL1 and myeloid-associated antigens but indicates poor prognosis independently in Chinese adult B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(6):8497–505.
624. Mi J-Q, Wang X, Yao Y, Lu H-J, Jiang X-X, Zhou J-F, et al. Newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia in China (II): prognosis related to genetic abnormalities in a series of 1091 cases. *Leukemia.* 2012 Jul;26(7):1507–16.
625. Dhédin N, Huynh A, Maury S, Tabrizi R, Beldjord K, Asnafi V, et al. Role of allogeneic stem cell transplantation in adult patients with Ph-negative acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2015 Apr 16;125(16):2486–96; quiz 2586.
626. Paulsson K, Cazier J-B, Macdougall F, Stevens J, Stasevich I, Vrceelj N, et al. Microdeletions are a general feature of adult and adolescent acute lymphoblastic leukemia: Unexpected similarities with pediatric disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 May 6;105(18):6708–13.
627. Xu N, Li Y-L, Zhou X, Cao R, Li H, Lu Q-S, et al. CDKN2 Gene Deletion as Poor Prognosis Predictor Involved in the Progression of Adult B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia Patients. *J Cancer.* 2015;6(11):1114–20.
628. Sulzmaier FJ, Jean C, Schlaepfer DD. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat Rev Cancer.* 2014 Sep;14(9):598–610.
629. Smolewski P, Robak T. Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) as potential molecular targets for therapy of hematological malignancies. *Curr Mol Med.* 2011 Nov;11(8):633–49.
630. Meulen J Van Der, Sanghvi V, Mavrakis K, Durinck K, Fang F, Matthijssens F, et al. The H3K27me3 demethylase UTX is a gender-specific tumor suppressor in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2015;125(1):13–22.
631. Tan J, Yang X, Zhuang L, Jiang X, Chen W, Lee PL, et al. Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev.* 2007 May 1;21(9):1050–63.

