

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:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

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:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

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>

Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Biociències
Departament de Biologia Animal, de Biologia Vegetal i d'Ecologia



CARACTERITZACIÓ GENÈTICA DE LES LEUCÈMIES
LIMFOBLÀSTIQUES AGUDES B PEDIÀTRIQUES:
METODOLOGIES DE DIAGNÒSTIC I IMPACTE PRONÒSTIC

Memòria presentada per

GLORIA HIDALGO GÓMEZ

Per optar al grau de Doctor de la Universitat Autònoma de Barcelona

Aquesta tesis ha esta realitzada sota la tutoria de la Dra. Gemma Armengol Rosell del Departament de
Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia
de la Universitat Autònoma de Barcelona
i la direcció de la Dra. Margarita Ortega Blanco a la Unitat de Citogenètica Hematològica del Hospital
Universitari Vall d'Hebron

Tesis adscrita al programa de Doctorat en Biodiversitat
de la Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona, 2024

A tots els que m'han acompanyat durant

aquest emocionant viatge

“Los genes, al igual que los diamantes, son para siempre”

- Richard Dawkins -

AGRAÏMENTS

Ara, després de tants anys, arriba el moment d'escriure els agraïments de la meva tesi doctoral. Ostres, quina impressió... Ha estat un viatge llarg i ple de reptes, però em sento profundament afortunada d'haver tingut l'oportunitat de viure'l. Hi ha tantes persones a qui agrair que no sé si unes poques línies seran suficients, però intentaré fer-ho amb tot el cor.

En primer lloc, vull donar les gràcies a la meva directora de tesi, Magui. No sé si hi ha paraules suficients per agrair-te tot el que has fet per mi. Gràcies per confiar en aquella jove estudiant que es va atrevir a demanar-te una oportunitat. Has estat la meva mentora, la meva guia, i has despertat en mi una passió per la citogenètica que sempre m'acompanyarà. Gràcies per tots els teus consells, la teva paciència, per preocupar-te tant per mi, per motivar-me a créixer i per no deixar que em rendeixi mai. M'has ensenyat molt més que ciència; m'has mostrat què significa ser una gran professional i una millor persona. Com bé diem en broma, «voy a ser tu heredera», però, Magui, el teu llegat és insuperable.

A les meves noies citogenetistes, Montse i Noe. Sou una part fonamental per a mi, i no sé com expressar prou l'agraïment que sento per haver-me acollit tan bé i per permetre'm formar part d'aquest equip meravellós. Gràcies per ser-hi sempre, per confiar en mi, per la vostra companyia i per tots els riures compartits. El vostre suport ha estat impagable. Amb vosaltres, fins i tot els dies més durs al laboratori esdevenen més lleugers i plens de vida. No podria imaginar-me aquest camí sense vosaltres.

Tampoc puc oblidar tota la gent del Vall d'Hebron, que ha estat la meva segona casa durant aquests anys. Als companys del laboratori i del mòdul blau, gràcies per l'ambient acollidor i el suport constant. A les citòlogues, Silvia, Julia i Mayda, per ensenyar-me que les cèl·lules també poden ser maques. Als citometristes, Carlos i Laura, per fer més acolorida la hematologia. Als moleculars, Bárbara, Dori, Andrés i Maria, per estar sempre al meu costat i compartir tantes ensenyances. A la Sara, la millor assessora genètica que un pacient podria tenir. A les meves companyes citogenetistes constitucionals, Mar i Natalia, gràcies per aguantar-me quan parlo sola amb els cromosomes i quan, als estius, sempre em venen casos complicats que em fan delirar una mica. També vull agrair a les tècnics de totes les unitats, les veritables heroïnes a l'ombra, sense les quals la feina no sortiria endavant. Gràcies també a tots els clínics, en especial en Pablo, la Thais i la Laura,

a qui admiro enormement per la feina tan dura que fan, per cuidar tan bé tots els pacients i per tenir sempre present a la gent del laboratori. Gràcies, i més gràcies, a tots i totes per la vostra feina diària. Cadascun de vosaltres ha estat una peça essencial en aquesta aventura, fent que el dia a dia sigui un lloc d'aprenentatge constant i de grans experiències. La vostra dedicació, entusiasme i suport m'han acompanyat sempre, i no hi ha prou paraules per agrair-vos-ho.

Així mateix, un agraïment molt especial als residents i estudiants que han passat pel laboratori al llarg dels anys. Maria (😊), Alejandra, Ainoa, Marta i Paula, gràcies per confiar en nosaltres per fer els vostres màsters, pels ànims i el suport. Gràcies per la vostra curiositat i entusiasme, per recordar-me com d'important és compartir el coneixement, i per ensenyar-me també tantes coses.

També he de fer una menció a tots els companys i companyes de professió amb qui he coincidit en congressos, reunions i altres esdeveniments. Treballar al costat de professionals tan brillants ha estat un autèntic honor. Gràcies per cada conversa, consell i ànim. La vostra dedicació m'ha inspirat a millorar constantment.

No puc oblidar la Fundació VHIO i la Fundació FERO, que han contribuït a finançar part del nostre treball. Gràcies per fer possible que, des d'un humil laboratori assistencial, puguem fer una mica de recerca.

Finalment, no puc deixar de donar les gràcies a la meva tutora de tesi, Gemma. Ha estat un honor comptar amb la teva visió, consells i empenta al llarg d'aquesta aventura.

Pel que fa als meus amics i família, les paraules se'm queden curtes. A tots vosaltres, que sou el meu pilar en tot moment, gràcies. Minerva i Bazaga, si hagués de definir què significa ser un bon amic, vosaltres en seríeu l'exemple a la RAE. Gràcies per escoltar-me, per estar sempre en els bons i mals moments, i per fer-me riure fins i tot quan tot sembla massa complicat. Ainoa i Ainhoa, sou les meves "supernenas" preferides; tot i la distància, els nostres moments juntes són sempre màgics, i sé que sempre que ens tornem a trobar el món tremola. Ana, gràcies per ser sempre allà i per ajudar-me amb el disseny de la portada, ets una artista increïble i una amiga de les que valen la pena. Maria

i Sara, apareixeu dues vegades en aquests agraïments, però és que no puc no mencionar-vos també en aquesta secció: sou un descobriment meravellós. La vostra amistat és un dels regals més grans que m'ha donat aquesta experiència. El brindis per aquesta tesi serà amb surf, vi i llibres!

Per la meva família no hi ha agraïments prou grans. Mama, ets el meu refugi en els moments de neguit. Papa, m'has ensenyat a viure amb passió i seny. Marina, gràcies per estar sempre al meu costat, és un orgull veure't créixer. I avi, tot i que ara estàs a 1159km, segueixes aquí, sempre present.

Bella, Aria i Maui, vosaltres també teniu el vostre espai en aquests agraïments. La vostra companyia incondicional és impagable. Escriure la tesi amb un gat ronronejant al costat del teclat i amb dues gossetes escalfant-me els peus ha fet que tot fos més suportable. Sou amor pur i el meu refugi.

Finalment, Lluís, a tu et deixo per al final, però només perquè ets el més important. Ets el meu pilar fonamental, m'has portat en volandes quan jo ja no podia més, i per això aquesta tesi és també teva. Gràcies per ser el meu suport incondicional, per creure en mi quan ni jo mateixa ho feia, i per fer-me sentir sempre estimada i valorada. Gràcies per ser el meu còmplice, la meva força, i la meva pau; amb tu al meu costat sé que tot és possible. T'estimo molt, i em sento immensament afortunada de tenir tota la vida per demostrar-t'ho.

Gràcies a tots i totes per formar part d'aquest viatge!

RESUM

Aquesta tesi doctoral investiga l'heterogeneïtat genètica de la leucèmia limfoblàstica aguda de línia B pediàtrica (LLA-B) mitjançant un enfocament integrat que combina tècniques citogenètiques i moleculars. S'han identificat 17 subtipus genètics diferents, evidenciant la complexitat de la LLA-B. L'estudi subratlla la importància de mètodes diagnòstics com el cariotip, FISH, MLPA, seqüenciació dirigida (t-NGS) i el mapeig òptic del genoma (OGM), cadascun amb avantatges i limitacions específiques. El cariotip i el FISH han estat fonamentals per a la detecció ràpida d'anomalies cromosòmiques, classificant el 73% dels pacients, mentre que la t-NGS i l'OGM han estat essencials per a una caracterització genètica més profunda (classificació d'un 10% adicional dels casos), tot i que amb limitacions per detectar alguns reordenaments, com *DUX4* i *IGH*.

Els resultats mostren que el 71% dels pacients presenten anomalies primàries recurrents clàssiques, mentre que el 29% restant es va classificar com a B-other, on es van identificar set subgrups genètics addicionals. Les alteracions secundàries van ser escasses, amb una mediana d'una CNV i dues mutacions per pacient, sense impacte pronòstic significatiu. Tot i així, s'han detectat mutacions en *TP53* i *NT5C2* en el 16% dels pacients amb recaiguda, la majoria en pacients amb bon pronòstic genètic, confirmant el seu paper en la resistència al tractament.

S'ha identificat un subgrup específic de pacients amb reordenaments de *KMT2A* i fenotip de cèl·lula B madura, amb unes característiques clíniques i biològiques molt específiques, associats a un pronòstic extremadament desfavorable i a altes taxes de recaiguda. També s'ha demostrat la heterogeneïtat clonal i evolució genòmica intrínseca de la *iAMP21*, destacant la necessitat d'ampliar la definició original d'aquesta alteració per incloure el perfil genòmic complet de la regió 21q.

L'anàlisi de supervivència confirma la influència pronòstica significativa de les alteracions genètiques, amb grans diferències segons el subtipus. Els pacients *BCR::ABL1-like* amb reordenaments de *CRLF2* van mostrar una supervivència global del 52% als 5 anys, similar als subgrups d'alt risc (reordenaments de *KMT2A* i hipodiploidia) amb una supervivència del 50%.

La tesi aporta informació rellevant sobre la importància diagnòstica i pronòstica de les alteracions genètiques en la LLA-B i destaca la necessitat d'utilitzar múltiples tècniques diagnòstiques per millorar l'estratificació genètica i el maneig clínic dels pacients.

ÍNDEX

Abreviatures.....	I
Glossari de gens	V
1. INTRODUCCIÓ.....	1
1.1. Leucèmia limfoblàstica aguda	3
1.1.1. Incidència i supervivència de la leucèmia limfoblàstica aguda	3
1.1.2. Causes i factors de risc en la leucèmia limfoblàstica aguda	5
1.1.3. Predisposició genètica a la leucèmia limfoblàstica aguda	6
1.2. Classificació de la leucèmia limfoblàstica aguda	13
1.2.1. Classificació morfològica de la LLA	13
1.2.2. Classificació immunofenotípica de la LLA	14
1.2.3. Classificació genètica de la LLA-B	15
1.2.3.1. Leucèmia limfoblàstica aguda B amb alteracions genètiques recurrents	19
1.2.3.2. Leucèmia limfoblàstica aguda B-other	34
1.2.3.3. Alteracions genètiques secundàries en la LLA-B	42
1.3. Tractament de la leucèmia limfoblàstica aguda	45
1.4. Tècniques citogenètiques i moleculars aplicades a l'estudi de la LLA	48
1.4.1. Citogenètica convencional.....	49
1.4.2. Hibridació <i>in situ</i> fluorescent (FISH).....	50
1.4.3. Microarrays cromosòmic	52
1.4.4. <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> (MLPA)	53
1.4.5. <i>Optical Genome Mapping</i> (OGM).....	54
1.4.6. Seqüenciació massiva de nova generació (NGS)	56
2. HIPÒTESIS I OBJECTIUS	59
3. RESULTATS.....	63
Article I. <i>How to Combine Multiple Tools for the Genetic Diagnosis Work-Up of B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia</i>	65
Article II. <i>Is Acute Lymphoblastic Leukemia with Mature B Cell Phenotype and KMT2A Rearrangements A New Entity? A Systematic Review And Meta-Analysis</i>	91
Article III. <i>Clonal Heterogeneity and Genomic Evolution in Intrachromosomal Amplification of Chromosome 21: A Case Report</i>	93
4. DISCUSSIÓ.....	95
5. CONCLUSIONS.....	107
6. BIBLIOGRAFIA	111

7. ANNEXOS.....	127
7.1. Llistat de figures	129
7.2. Llistat de taules	131
7.3. Resum del subtipus genètics de la LLA-B pediàtrica	133
7.4. Material suplementari “ <i>How to Combine Multiple Tools for the Genetic Diagnosis Work-Up of B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia</i> ”	137

ABREVIATURES

ADN	Àcid desoxiribonucleic
ARN	Àcid ribonucleic
CAR-T	<i>Chimeric antigen receptor T-cell</i>
CNV	Canvis en el nombre de còpies
EGIL	<i>European Group of Immunological classification of Leukemias</i>
FISH	Hibridació <i>in situ</i> fluorescent
IAR	Incidència acumulada de recaiguda
ICC	<i>International Consensus Classification</i>
Indel	Insercions i/o delecions
ISCN	<i>International System for Human Cytogenetics Nomenclature</i>
LCR	Líquid cefalorraquidi
LLA	Leucèmia limfoblàstica aguda
LMA	Leucèmia mieloide aguda
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
MMR	Malaltia residual mesurable
MO	Medul·la òssia
MPAL	Leucèmia aguda de fenotip mixt B/mieloide
NGS	Tècniques de seqüenciació massiva de nova generació
NOS	Sense diagnòstic especificat (<i>Not Otherwise Specified</i>)
OGM	Mapeig òptic del genoma
OMS (WHO)	Organització Mundial de la Salut (<i>World Health Organization</i>)
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PETHEMA	Programa Espanyol de Tractaments en Hematologia
qPCR	Reacció en cadena de la polimerasa a temps real
RC	Remissió completa
RETI-SEHOP	Registre Espanyol de Tumors Infantils de la Sociedad Espanyola de Hematologia i Oncologia Pediàtrica
SEHOP	Societat Espanyola de Hematologia i Oncologia Pediàtrica
SG	Supervivència global
SLE	Supervivència lliure d'esdeveniment
SNC	Sistema nerviós central

SNP	(<i>Single nucleotide Polymorphism</i>): variant que difereix en un nucleòtid respecte al genoma de referència i que està present en $\geq 1\%$ de la població (polimorfisme)
SNV	(<i>Single nucleotide Variant</i>): variant consistent en el canvi d'un sol nucleòtid respecte del genoma de referència
SP	Sang perifèrica
TK	Tirosina cinasa
TKi	Inhibidors de tirosina cinasa
VAF	Freqüència al·lèlica d'una variant
WES	Tècniques de seqüenciació de l'exoma complet
WGS	Tècniques de seqüenciació del genoma complet

GLOSSARI DE GENS

SÍMBOL*	NOM	LOCALITZACIÓ
ABL1	ABL Proto-Oncogene 1, Non-Receptor Tyrosine Kinase	9q34.12
ABL2	ABL Proto-Oncogene 2, Non-Receptor Tyrosine Kinase	1q25.2
ACIN1	Apoptotic Chromatin Condensation Inducer 1	14q11.2
AFDN	Afadin, Adherens Junction Formation Factor	6q27
AFF1	ALF Transcription Elongation Factor 1	4q21.3-q22.1
AKAP8	A-Kinase Anchoring Protein 8	19p13.12
ANGPTL2	Angiopoietin Like 2	9q33.3
ARHGEF28	Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor 28	5q13.2
ARID1A	AT-Rich Interaction Domain 1A	1p36.11
ARID1B	AT-Rich Interaction Domain 1B	6q25.3
ARID5B	AT-Rich Interaction Domain 5B	10q21.2
ATAD5	ATPase Family AAA Domain Containing 5	17q11.2
ATF7IP	Activating Transcription Factor 7 Interacting Protein	12p13.1
ATP2C1	ATPase Secretory Pathway Ca ²⁺ Transporting 1	3q22.1
ATRX	ATRX Chromatin Remodeler	Xq21.1
ATXN7L3	Ataxin 7 Like 3	17q21.31
AUTS2	Activator Of Transcription And Developmental Regulator AUTS2	7q11.22
BAK1	BCL2 Antagonist/Killer 1	6p21.31
BCL2	BCL2 Apoptosis Regulator	18q21.33
BCL6	BCL6 Transcription Repressor	3q27.3
BCL9	BCL9 Transcription Coactivator	1q21.2
BCL9L	BCL9 Like	11q23.3
BCR	BCR Activator Of RhoGEF And GTPase	22q11.23
BIRC7	Baculoviral IAP Repeat Containing 7	20q13.33
BLNK	B Cell Linker	10q24.1
BMI1	BMI1 Proto-Oncogene, Polycomb Ring Finger	10p12.2
BMP2	Bone Morphogenetic Protein 2	20p12.3
BMP2K	BMP2 Inducible Kinase	4q21.21
BPTF	Bromodomain PHD Finger Transcription Factor	17q24.2
BRD9	Bromodomain Containing 9	5p15.33
BRWD1	Bromodomain And WD Repeat Domain Containing 1	21q22.2
BTG1	BTG Anti-Proliferation Factor 1	12q21.33
BTLA	B And T Lymphocyte Associated	3q13.2
CBFA2T3	CBFA2/RUNX1 Partner Transcriptional Co-Repressor 3	16q24.3
CBL	Cbl Proto-Oncogene	11q23.3
CBR3	Carbonyl Reductase 3	21q22.12
CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A	9p21.3
CDKN2B	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2B	9p21.3
CDX2	Caudal Type Homeobox 2	13q12.2
CEBPA	CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha	19q13.11
CEBPE	CCAAT Enhancer Binding Protein Epsilon	14q11.2
CHAF1B	Chromatin Assembly Factor 1 Subunit B	21q22.12
CHD4	Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 4	12p13.31
CLDN14	Claudin 14	21q22.13
CLIC5	Chloride Intracellular Channel 5	6p21.1
CLTC	Clathrin Heavy Chain	17q23.1
CREBBP	CREB Binding Protein	16p13.3
CRLF2	Cytokine Receptor Like Factor 2	Xp22.3 i Yp11.3
CRYZL1	Crystallin Zeta Like 1	21q22.11
CSF1R	Colony Stimulating Factor 1 Receptor	5q32

Glossari de gens |

CSF2RA	Colony Stimulating Factor 2 Receptor Subunit Alpha	Xp22.32 i Yp11.3
CUX1	Cut Like Homeobox 1	7q22.1
CXCR4	C-X-C Motif Chemokine Receptor 4	2q22.1
DACH1	Dachshund Family Transcription Factor 1	13q21.33
DAZAP1	DAZ Associated Protein 1	19p13.3
DDX42	DEAD-Box Helicase 42	17q23.3
DGKH	Diacylglycerol Kinase Eta	13q14.11
DOPEY2	DOP1 Leucine Zipper Like Protein B	21q22.12
DUX4	Double Homeobox 4	4q35.2
DYRK1A	Dual Specificity Tyrosine Phosphorylation Regulated Kinase 1A	21q22.13
EBF1	EBF Transcription Factor 1	5q33.3
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	7p11.2
EHMT1	Euchromatic Histone Lysine Methyltransferase 1	9q34.3
ELK3	ETS Transcription Factor ELK3	12q23.1
ELL	Elongation Factor For RNA Polymerase II	19p13.11
EP300	E1A Binding Protein P300	22q13.2
EPOR	Erythropoietin Receptor	19p13.2
ERG	ETS Transcription Factor ERG	21q22.2
ETV6	ETS Variant Transcription Factor 6	12p13.2
EWSR1	EWS RNA Binding Protein 1	22q12.2
EZH2	Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit	7q36.1
FGFR1	Fibroblast Growth Factor Receptor 1	8p11.23
FLI1	Fli-1 Proto-Oncogene, ETS Transcription Factor	11q24.3
FLT3	Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 3	13q12.2
FLT4	Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 4	5q35.3
FOXJ2	Forkhead Box J2	12p13.31
FOXP1	Forkhead Box P1	3p13
GATA1	GATA Binding Protein 1	Xp11.23
GATA2	GATA Binding Protein 2	3q21.3
GATA3	GATA Binding Protein 3	10p14
HLCS	Holocarboxylase Synthetase	21q22.13
HLF	HLF Transcription Factor, PAR BZIP Family Member	17q22
HMGN1	High Mobility Group Nucleosome Binding Domain 1	21q22.2
HNRNPH1	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein H1	5q35.3
HNRNPUL1	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein U Like 1	19q13.2
HOXA9	Homeobox A9	7p15.2
IGF2BP1	Insulin Like Growth Factor 2 mRNA Binding Protein 1	17q21.32
IGH	Immunoglobulin Heavy Locus	14q32.33
IGK	Immunoglobulin Kappa Locus	2p11.2
IGL	Immunoglobulin Lambda Locus	22q11.2
IKZF1	IKAROS Family Zinc Finger 1	7p12.2
IKZF2	IKAROS Family Zinc Finger 2	2q34
IKZF3	IKAROS Family Zinc Finger 3	17q12-q21.1
IL2RB	Interleukin 2 Receptor Subunit Beta	22q12.3
IL3	Interleukin 3	5q31.1
IL3RA	Interleukin 3 Receptor Subunit Alpha	Xp22.32 i Yp11.3
IL7R	Interleukin 7 Receptor	5p13.2
IQGAP2	IQ Motif Containing GTPase Activating Protein 2	5q13.3
JAK1	Janus Kinase 1	1p31.3
JAK2	Janus Kinase 2	9p24.1

JAK3	Janus Kinase 3	19p13.11
KAT6A	Lysine Acetyltransferase 6A	8p11.21
KDM6A	Lysine Demethylase 6A	Xp11.3
KMT2A	Lysine Methyltransferase 2A	11q23.3
KMT2D	Lysine Methyltransferase 2D	12q13.12
KMT5B	Lysine Methyltransferase 5B	11q13.2
KRAS	KRAS Proto-Oncogene, GTPase	12p12.1
LEF1	Lymphoid Enhancer Binding Factor 1	4q25
LHPP	Phospholysine Phosphohistidine Inorganic Pyrophosphate Phosphatase	10q26.13
LMO1	LIM Domain Only 1	11p15.4
LMO2	LIM Domain Only 2	11p13
LYN	LYN Proto-Oncogene, Src Family Tyrosine Kinase	8q12.1
MED12	Mediator Complex Subunit 12	Xq13.1
MEF2D	Myocyte Enhancer Factor 2D	1q22
MEIS1	Meis Homeobox 1	2p14
MLH1	MutL Homolog 1	3p22.2
MLLT1	MLLT1 Super Elongation Complex Subunit	19p13.3
MLLT10	MLLT10 Histone Lysine Methyltransferase DOT1L Cofactor	10p12.31
MLLT3	MLLT3 Super Elongation Complex Subunit	9p21.3
MORC3	MORC Family CW-Type Zinc Finger 3	21q22.12
MSH2	MutS Homolog 2	2p21-p16.3
MSH6	MutS Homolog 6	2p16.3
MTAP	Methylthioadenosine Phosphorylase	9p21.3
MYC	MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor	8q24.21
NBN	Nibrin	8q21.3
NCOA3	Nuclear Receptor Coactivator 3	20q13.12
NF1	Neurofibromin 1	17q11.2
NFATC4	Nuclear Factor Of Activated T Cells 4	14q12
NIPBL	NIPBL Cohesin Loading Factor	5p13.2
NOL4L	Nucleolar Protein 4 Like	20q11.21
NOTCH1	Notch Receptor 1	9q34.3
NR3C1	Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1	5q31.3
NRAS	NRAS Proto-Oncogene, GTPase	1p13.2
NSD2	Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 2	4p16.3
NT5C2	5'-Nucleotidase, Cytosolic II	10q24.32
NTRK3	Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 3	15q25.3
NUP214	Nucleoporin 214	9q34.13
NUTM1	NUT Midline Carcinoma Family Member 1	15q14
P2RY8	P2Y Receptor Family Member 8	Xp22.33 i Yp11.3
PAG1	Phosphoprotein Membrane Anchor With Glycosphingolipid Microdomains 1	8q21.13
PAN3	Poly(A) Specific Ribonuclease Subunit PAN3	13q12.2
PAX5	Paired Box 5	9p13.2
PBX1	PBX Homeobox 1	1q23.3
PDGFRA	Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha	4q12
PDGFRB	Platelet Derived Growth Factor Receptor Beta	5q32
PHF6	PHD Finger Protein 6	Xq26.2
PIGP	Phosphatidylinositol Glycan Anchor Biosynthesis Class P	21q22.13
PIP4K2A	Phosphatidylinositol-5-Phosphate 4-Kinase Type 2 Alpha	10p12.2
PMS2	PMS1 Homolog 2, Mismatch Repair System Component	7p22.1
PTCH1	Patched 1	9q22.32

Glossari de gens |

PTK2B	Protein Tyrosine Kinase 2 Beta	8p21.2
PTPN11	Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 11	12q24.13
PTPRJ	Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type J	11p11.2
PYGO2	Pygopus Family PHD Finger 2	1q21.3
RB1	RB Transcriptional Corepressor 1	13q14.2
RIPPLY3	Ripply Transcriptional Repressor 3	21q22.13
RUNX1	RUNX Family Transcription Factor 1	21q22.12
SALL1	Spalt Like Transcription Factor 1	16q12.1
SETD1B	SET Domain Containing 1B, Histone Lysine Methyltransferase	12q24.31
SETD2	SET Domain Containing 2, Histone Lysine Methyltransferase	3p21.31
SH2B3	SH2B Adaptor Protein 3	12q24.12
SHOX	SHOX Homeobox	Xp22.33 i Yp11.3
SIM2	SIM BHLH Transcription Factor 2	21q22.13
SLC12A6	Solute Carrier Family 12 Member 6	15q14
SMAD1	SMAD Family Member 1	4q31.21
SMARCA2	SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily A, Member 2	9p24.3
SMARCA4	SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily A, Member 4	19p13.2
SON	SON DNA And RNA Binding Protein	21q22.11
SPI1	Spi-1 Proto-Oncogene	11p11.2
SS18	SS18 Subunit Of BAF Chromatin Remodeling Complex	18q11.2
STAT3	Signal Transducer And Activator Of Transcription 3	17q21.2
STAT5	Signal Transducer And Activator Of Transcription 5A	17q21.2
SYNRG	Synergin Gamma	17q12
TAF15	TATA-Box Binding Protein Associated Factor 15	17q12
TAL1	TAL BHLH Transcription Factor 1	1p33
TBL1XR1	TBL1X/Y Related 1	3q26.32
TCF3	Transcription Factor 3	19p13.3
TCF4	Transcription Factor 4	18q21.2
TEX41	Testis Expressed 41	2q22.3
TMEM156	Transmembrane Protein 156	4p14
TMEM50B	Transmembrane Protein 50B	21q22.11
TP53	Tumor Protein P53	17p13.1
TP63	Tumor Protein P63	3q28
TSLP	Thymic Stromal Lymphopoietin	5q22.1
TTC3	Tetratricopeptide Repeat Domain 3	21q22.13
TYK2	Tyrosine Kinase 2	19p13.2
UBTF	Upstream Binding Transcription Factor	17q21.31
USP7	Ubiquitin Specific Peptidase 7	16p13.2
VPREB1	V-Set Pre-B Cell Surrogate Light Chain 1	22q11.22
VPS26C	VPS26 Endosomal Protein Sorting Factor C	21q22.13
WBP1L	WW Domain Binding Protein 1 Like	10q24.32
YAP1	Yes1 Associated Transcriptional Regulator	11q22.1
ZEB2	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2	2q22.3
ZFP36L2	ZFP36 Ring Finger Protein Like 2	2p21
ZNF362	Zinc Finger Protein 362	1p35.1
ZNF384	Zinc Finger Protein 384	12p13.31
ZNF521	Zinc Finger Protein 521	18q11.2
ZNF618	Zinc Finger Protein 618	9q32

*Segons la nomenclatura actualitzada HUGO

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Leucèmia limfoblàstica aguda

La **leucèmia limfoblàstica aguda** (LLA) és una neoplàsia hematològica que sorgeix de la transformació i proliferació descontrolada dels precursors limfoides (limfoblasts). Es produeix una desregulació en qualsevol punt de la diferenciació cel·lular dels limfòcits, de manera que aquestes cèl·lules immadures proliferen descontroladament i impedeixen la producció de les cèl·lules hematopoètiques normals. La LLA es manifesta com una infiltració blàstica de la medul·la òssia, tot i que els blasts també envaeixen la sang perifèrica i sovint poden afectar altres òrgans perifèrics, com el fetge, la melsa, el sistema nerviós central (SNC) i els ganglis limfàtics.

Dins de la LLA, es poden identificar diversos subtipus segons en el tipus de cèl·lula alterada, dividint-se principalment en dos subtipus: **LLA d'estirp B** (LLA-B) i **LLA d'estirp T** (LLA-T). La LLA-B és la més freqüent, constituint el 85% de totes les leucèmies agudes en edat pediàtrica. Tot i això, aquesta incidència varia geogràficament, sent més freqüent la LLA-B als països més industrialitzats i la LLA-T als països menys desenvolupats¹.

1.1.1. Incidència i supervivència de la leucèmia limfoblàstica aguda

La leucèmia limfoblàstica aguda és el càncer infantil més comú, representant més d'un quart de totes les neoplàsies diagnosticades en menors de 19 anys². D'acord amb la informació del Registre Espanyol de Tumors Infantils (RETI-SEHOP)³, s'estima que hi ha 47,5 casos de LLA per cada milió de nens a l'any. La incidència de la LLA varia segons l'edat, el sexe i la raça, entre altres factors. El pic màxim d'incidència es dona entre els 2 i els 5 anys, i és lleugerament més comú en homes i en persones de raça blanca³.

La incidència de nous casos de LLA ha augmentat un 1,29% des del 1990⁴, gràcies a millores en els processos de diagnòstic i a la influència de diversos factors com l'envelliment de la població mundial, els canvis en els factors ambientals i la major exposició a agents cancerígens. L'índex sociodemogràfic (SDI: avalua els ingressos per càpita, el nivell educatiu mitjà i les taxes de fertilitat) juga un paper important en la incidència de la LLA, sent els països amb un SDI mitjà o alt els que presenten una

incidència més elevada^{4,5}. Concretament, a Espanya, la leucèmia suposa el 28% del total de casos de càncer registrats en nens de 0 a 14 anys. S'estima que es diagnostiquen unes 300 LLA noves cada any a Espanya; a tall d'exemple, el 2022 es van diagnosticar 288 leucèmies en nens i adolescents a tot el territori espanyol³.

En ser la neoplàsia més comuna durant la infància, constitueix la primera causa de mort per càncer en menors de 15 anys². Tot i això, la supervivència en la LLA ha augmentat considerablement al llarg de la història recent. En nens, la supervivència als 3 anys del diagnòstic ha augmentat del 66% als anys 80 al 93% actualment (Taula 1)³. Aquest augment de la supervivència es deu principalment a la millor estratificació clínica, genètica i de la resposta al tractament dels pacients, la qual cosa ha permès la introducció de tractaments poli-quimioteràpics adaptats al risc individualitzat de cada pacient. Aparentment, amb l'abordatge convencional, la intensitat de la quimioteràpia ha arribat al seu límit de tolerància. Per millorar els resultats i reduir els efectes adversos, es fan necessaris enfocaments terapèutics innovadors⁶.

Taula 1. Seguiment i supervivència als 3 i 5 anys del diagnòstic, per cohorts d'anys d'incidència, dels casos de leucèmia limfoblàstica aguda (LLA) d'entre 0-14 anys diagnosticats a Espanya del 1980-2018.

Taula adaptada del RETI-SEHOP³.

Cohort d'incidència	n	% de seguiment		% de supervivència	
		3 anys	5 anys	3 anys	5 anys
1980-1984	424	96,9	94,3	66(61,3-70,5)	57(52,6-62,2)
1985-1989	578	92,7	90,3	72(67,7-75,2)	63(58,4-66,6)
1990-1994	635	99,5	99,2	76(72,3-79,0)	70(66,5-73,7)
1995-1999	619	99,4	99,2	83(79,5-85,5)	78(74,4-81,0)
2000-2004	686	99,1	98,3	83(79,7-85,4)	80(76,9-82,9)
2005-2009	956	98,9	97,6	86(83,3-87,7)	83(80,7-85,4)
2010-2013	927	98,5	97,4	88(86,1-90,3)	85(83,1-87,7)
2014-2016	690	99,0	96,7	91(88,7-93,0)	88(85,7-90,6)
2017-2018	459	98,7	-	93(90,4-95,1)	-
TOTAL 1980-2018	5.974				

1.1.2. Causes i factors de risc en la leucèmia limfoblàstica aguda

Com a totes les malalties neoplàsiques, la seqüència d'esdeveniments que condueixen a la transformació maligna d'una cèl·lula és multifactorial. En el cas de la LLA, aquests esdeveniments es produeixen durant el desenvolupament de l'estirp limfoide. Els precursors limfoides presenten una alta taxa de proliferació i de reordenaments genètics, i aquestes característiques afavoreixen l'aparició de mutacions espontànies i d'altres alteracions citogenètiques que faciliten la transformació maligna. A més, cal destacar que certs factors s'han associat a un augment del risc de patir LLA:

- **Factors mediambientals:** els pacients han estat exposats a alts nivells de radiació, els que s'han sotmès prèviament a certs tipus de quimioteràpia i radioteràpia per altres tipus de càncer, o, en alguns casos, fins i tot l'exposició a determinats virus, com amb el virus de l'Epstein-Barr (EBV) o el virus limfotrópic humà de cèl·lules T tipus 1 (HTLV-1). Així com l'exposició a toxines i hidrocarburs, com ara les micotoxines i el benzè, s'han identificat com a elements de risc potencials per desenvolupar LLA.
- **Factors genètics:** la influència de la genètica hereditària en el desenvolupament de la LLA es pot classificar en dos grups:
 - Predisposició de baixa penetrància: associat a polimorfismes germinals comuns. Resulten en un augment moderat del risc de leucèmia d'1,5 a 2 vegades⁵.
 - Predisposició d'alta penetrància: associat a variants de línia germinal rares i a síndromes congènites. Provoquen un augment significatiu de més de 10 vegades el risc relatiu ⁵ (veure apartat 1.1.3. *Predisposició genètica a la leucèmia limfoblàstica aguda*).

D'altra banda, són remarcables els casos de LLA que es produeix en infants de setmanes o mesos de vida. Malgrat que es desconeix la causa exacta que origina la LLA, s'ha observat que la majoria d'aquest casos infantils inicien el procés de leucemogènesi

durant el desenvolupament fetal (a l'úter) mitjançant l'aparició de cèl·lules pre-leucèmiques (per l'adquisició d'una translocació cromosòmica o l'adquisició/eliminació de material genètic). Aquestes cèl·lules són clínicament silencis i es requereixen esdeveniments oncogènics addicionals, probablement desencadenats per factors ambientals, per acabar manifestant la leucèmia^{7,8}.

1.1.3. Predisposició genètica a la leucèmia limfoblàstica aguda

La leucèmia limfoblàstica aguda pediàtrica es desenvolupa mitjançant una complexa interacció entre el **background genètic heretat i les alteracions somàtiques adquirides**. El *background* genètic dels pacients inclou canvis en gens de predisposició al càncer, polimorfismes de nucleòtid únic (SNPs) i síndromes de predisposició al càncer que augmenten la susceptibilitat a la leucèmia (Figura 1)⁸.

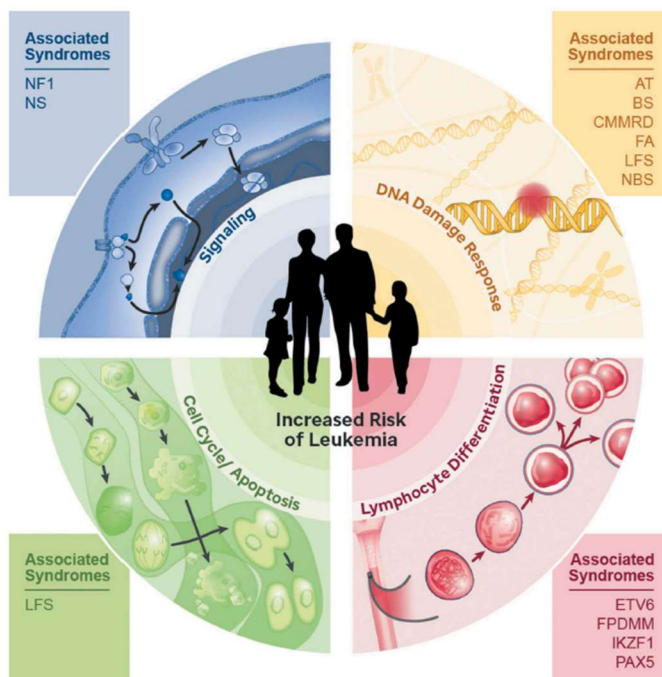


Figura 1. Representació dels gens amb variants germinals associades amb predisposició a la LLA pediàtrica, classificats segons si codifiquen proteïnes implicades en la senyalització cel·lular, la resposta al dany del DNA, el cicle cel·lular/mort cel·lular i la diferenciació del limfòcit. AT, Atàxia Telangiectàsia; BS, Síndrome de Bloom; CMMRD, deficiència de reparació de desajustaments constitucionals; ETV6, Predisposició associada a ETV6; FA, Anèmia de Fanconi; FPDMM, Trastorn familiar de les plaquetes amb predisposició a la malignitat mieloide; IKZF1, Predisposició associada a IKZF1; LFS, Síndrome de Li-Fraumeni; NBS, Síndrome de trencament de Nijmegen; NF1, Neurofibromatosi tipus 1; NS, Síndrome de Noonan; PAX5, Predisposició associada a PAX5. *Imatge adaptada de Bloom i col·laboradors⁹.*

Històricament, es pensava que la majoria dels càncers infantils (inclosa la LLA) no tenien una base hereditària. Malgrat això, estudis genòmics de la línia germinal han revelat que almenys el 5-10% dels nens amb càncer (i aproximadament el 3-4% dels nens amb LLA) desenvolupen la malaltia a causa d'una **predisposició genètica subjacent**⁹, tot i que

molts dels pacients amb aquestes mutacions no tenen antecedents familiars compatibles amb una síndrome de predisposició al càncer¹⁰. Si bé la incidència global de variants patogèniques germinals en la leucèmia és baixa, aquesta depèn del subtipus de LLA; per exemple, aproximadament el 65% dels pacients amb LLA-B amb hipodiploïdia tenen una variant patogènica germinal de *TP53*¹¹.

Polimorfismes de nucleòtid únic que predisposen al càncer

Els estudis d'associació del genoma (GWAS) han identificat SNPs associats amb un augment modest (normalment fins a 2 vegades) en el risc de desenvolupar LLA. Els loci més comuns involucren gens que codifiquen factors de transcripció, especialment aquells que regulen el desenvolupament hematopoètic i limfoide primerenc, i supressors de tumors, com ara *ARID5B*, *BAK1*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *CEBPE*, *ELK3*, *ERG*, *GATA3*, *IGF2BP1*, *IKZF1*, *IKZF3*, *LHPP* i *BMI1-PIP4K2A* (Taula 2). Tot i que el risc de LLA associat a una única variant és baix, de manera acumulativa, aquests genotips poden elevar el risc de LLA fins a 9 vegades^{5,10}.

Taula 2. Resum dels gens més comunament associats amb un risc incrementat de desenvolupar leucèmia limfoblàstica aguda. Per a cada gen, s'especifiquen els processos biològics afectats, la localització cromosòmica i el subtipus de LLA associat. Taula adaptada de Pagliaro i col·laboradors⁵.

Gen implicat	Procés involucrat	Localització	Subtipus de LLA
<i>CDKN2A/B</i>	Cicle cel·lular	9p21.3	Totes les LLA
<i>PIP4K2A</i>	Senyalització	10p12	Totes les LLA
<i>ARID5B</i>	Regulació de la transcripció	10q21.2	LLA-B amb hiperdiploïdia; LLA-T
<i>IKZF1</i>	Regulació de la transcripció	7p12.2	LLA-B
<i>GATA3</i>	Regulació de la transcripció	10p14	LLA-B amb <i>BCR::ABL1-like</i>
<i>CEBPE</i>	Regulació de la transcripció	14q11.2	LLA-B
<i>ERG</i>	Regulació de la transcripció	21q22.2	Totes les LLA
<i>IKZF3</i>	Regulació de la transcripció	17q12	Totes les LLA
<i>ETV6</i>	Regulació de la transcripció	12p13.2	Totes les LLA
<i>LHPP</i>	Senyalització	10q26.13	LLA-B
<i>ELK3</i>	Regulació de la transcripció	12q23.1	LLA-B
<i>BAK1</i>	Apoptosi	6p21.31	LLA-B amb alta hiperdiploïdia
<i>IGF2BP1</i>	Regulació de la transcripció	17q21.32	LLA-B

Alguns loci estan associats a subtipus específics de LLA o a ètnies concretes, com el *GATA3* amb LLA tipus *BCR::ABL1-Like* en poblacions hispanes; *TP63* i *PTPRJ* amb LLA amb reordenament d'*ETV6::RUNX1*; i variants en *USP7* amb la LLA-T, especialment en casos que involucren la desregulació del factor de transcripció *TAL1*¹⁰.

Mutacions genètiques que predisposen al càncer

Els gens associats amb mutacions germinals que predisposen a la LLA solen ser els mateixos que presenten mutacions somàtiques en el transcurs de la malaltia^{9,12}.

S'han descrit **mutacions germinals d'*IKZF1*** en casos de LLA familiar i esporàdica, i s'estima que al voltant de l'1% de les LLA-B pediàtriques contenen variants germinals patogèniques en *IKZF1*. Aquestes mutacions inclouen variants *missense*, *nonsense* i *frameshift* que es troben principalment fora dels motius ZF (Figura 2). La majoria de les variants germinals identificades no estan restringides a dominis funcionals específics, però s'ha descrit que les mutacions d'*IKZF1* dins del domini de unió a l'ADN afecten l'activació transcripcional dels seus gens diana, mentre que les mutacions truncants poden tenir un impacte sobre la dimerització. També s'han descrit casos de LLA familiar amb microdeleccions de 7p12.1, regió que inclou a *IKZF1*^{13,14}. Pel que fa al pronòstic i la resposta terapèutica, encara es desconeix l'abast real de les variants germinals, però s'ha suggerit que podrien conferir resistència a certes teràpies anti-leucèmiques^{8,14}.

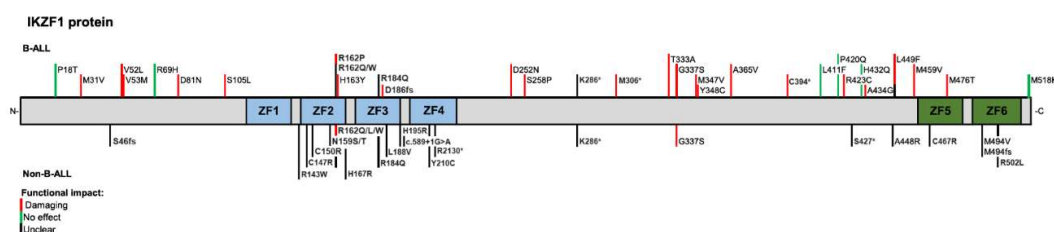


Figura 2. Representació esquemàtica de la proteïna *IKZF1* (basada en NM_006060), amb les variants germinals d'*IKZF1* identificades en individus amb LLA-B (part superior) i les variants identificades en individus sense LLA-B (part inferior). Els colors de les barres indiquen l'impacte funcional en estudis *in vitro*, amb barres vermelles que indiquen un efecte nociu, barres verdes sense efecte i barres negres efectes poc clars (no estudiats encara). Imatge adaptada de Wagener i col·laboradors¹¹.

També s'han identificat diferents **variants germinals de *PAX5*** en múltiples estudis de LLA-B familiar, que es presenten amb penetrància incompleta. Una d'aquestes és la variant germinal *PAX5* G183S (p.Gly183Ser) associada a una predisposició a LLA-B amb herència autosòmica dominant. Aquesta variant es va identificar en tres famílies no relacionades, cadascuna de les quals tenia diversos fills que van desenvolupar LLA i presentaven aquesta mutació en línia germinal^{15,16}. L'altra mutació en línia germinal descrita és *PAX5* R38H (p.Arg38His), heretada d'un dels progenitors que no va desenvolupar leucèmia, cosa que suggereix que es requereixen d'alteracions addicionals

per a una transformació completa¹⁷. Ambdues són mutacions *missense* que resulten en una disminució de la repressió transcripcional mediada per PAX5, però es requereix un segon esdeveniment en el al·lel *wildtype* (habitualment delecions del 9p, la formació d'un isocromosoma 9q o un cromosoma 9q dicèntric) per al desenvolupament de la leucèmia^{8,15-17}.

Les neoplàsies limfoides associades a variants germinals dels gens *IKZF1* o *PAX5* constitueix un subtipus independent en la classificació de la *International Consensus Classification*¹². Donat que les mutacions puntuals en ambdós gens poden ser d'origen somàtic o germinal, es recomana descartar l'origen germinal, especialment en pacients pediàtrics i adults joves.

D'altra banda, també s'han descrit famílies amb **mutacions germinals d'*ETV6*** que sovint presenten trombocitopènia i una predisposició a malalties hematològiques, sent la LLA-B amb hiperdiploidia la més freqüent. Les mutacions germinals d'*ETV6* inclouen mutacions *missense*, *nonsense*, *frameshift*, delecions i insercions que condueixen a una pèrdua de la funció d'*ETV6*. Un conglomerat de mutacions s'ubiquen en el domini de unió a l'ADN ETS ('E26 específic de transformació') d'*ETV6*, provocant efectes dominants negatius i repressió transcripcional (Figura 3)^{8,9,11,18}.

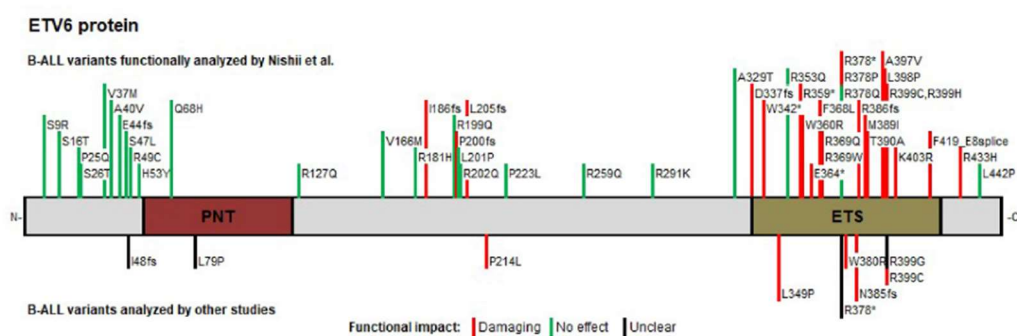


Figura 3. Representació esquemàtica de la proteïna *ETV6* (basada en NM_001987), amb les variants germinals d'*ETV6* identificades en individus amb LLA-B. Els colors de les barres indiquen l'impacte funcional en estudis *in vitro*, amb barres vermelles que indiquen un efecte nociu, barres verdes sense efecte i barres negres efectes poc clars (no estudiats encara). *Imatge adaptada de Wagener i col·laboradors*¹¹.

Així mateix, s'ha descrit **variants germinals de *RUNX1*** en famílies amb trastorn plaquetari familiar (TPF), un trastorn autosòmic dominant amb penetrància variable per defectes plaquetaris, com la trombocitopènia. Les variants germinals en famílies amb predisposició a TPF provoquen una pèrdua de funció de *RUNX1*, generalment deguda a

delecions parcials o totals, així com a variants *frameshift* i *missense* que afecten principalment el domini RUNT (Figura 4)^{10,11,19,20}. Aquests pacients tenen un risc augmentat a desenvolupar neoplàsies hematològiques, majoritàriament mieloides, incloent síndromes mielodisplàsics i/o leucèmies mieloides agudes. La incidència de casos amb LLA és menys comú, sent més freqüent en las LLA-T que en les LLA-B^{10,11,21}. En general, la freqüència de variants germinals de *RUNX1* associades a la LLA-B és molt baixa, i la majoria d'aquestes variants podrien no tenir un impacte funcional significatiu. L'aparició de LLA-B en pacients amb variants germinals de *RUNX1* depèn de l'adquisició de variants somàtiques addicionals de *RUNX1* o en *GATA2*¹⁹; mentre que l'aparició de LLA-T s'associa a l'adquisició de variants somàtiques de *JAK3*²². Tot i la baixa freqüència, en situacions amb indicis clínics de trombocitopènia o historial familiar de trastorns hematològics amb afectació plaquetària, es podria considerar la presència d'una variant de predisposició germinal de *RUNX1*¹¹.

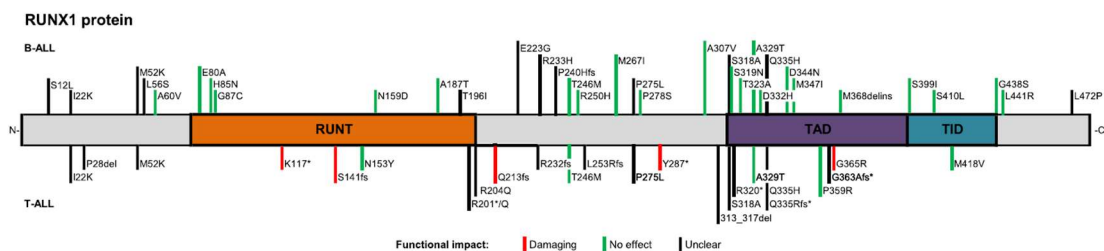


Figura 4. Representació esquemàtica de la proteïna *RUNX1* (basada en NM_001754), amb les variants germinals de *RUNX1* identificades en individus amb LLA-B (part superior) i les variants identificades en individus amb LLA-T (part inferior). Els colors de les barres indiquen l'impacte funcional en estudis *in vitro*, amb barres vermelles que indiquen un efecte nociu, barres verdes sense efecte i barres negres efectes poc clars (no estudiats encara). *Imatge adaptada de Wagener i col·laboradors*¹¹.

A més, mitjançant estudis de casos individuals i anàlisis de cohorts, s'han identificat altres gens rars que poden predisposar a la LLA. Per exemple, al cribratge d'una cohort de LLA amb hiperdiploïdia, s'han descrits mutacions patogèniques en gens com *NBN*, *FLT3*, *SH2B3* i *CREBBP* que predisposen a la LLA-B. També s'han identificat mutacions germinals en el gen *TYK2* i delecions en el gen *LMO2*, associades a la predisposició a LLA-T. Així mateix, s'han descrit variants en *JAK2* i *STAT3* en individus amb LLA associada a la síndrome de Down¹⁰.

Síndromes de predisposició al càncer

Hi ha trastorns genètics com la **síndrome de Down**, la **síndrome de Noonan (NS)**, la **síndrome de Bloom (BLM)**, la **neurofibromatosis tipus 1 (NF1)**, la **deficiència de reparació de desajustaments constitucionals (CMMRD)** i **síndrome de Li-Fraumeni (LFS)**, **síndrome de Rubinstein-Taybi**, l'**anèmia de fanconi** i l'**atàxia telangiectasia (ATM)**, que s'associen amb un risc incrementat a desenvolupar LLA⁹ (Taula 3). Per exemple, la síndrome de Down està associada amb un augment de 10-20 vegades en el risc desenvolupar LLA durant la infància²³.

Taula 3. Resum de síndromes genètiques associades a leucèmia limfoblàstica aguda. Per a cada síndrome, s'especifiquen els gens alterats, els processos biològics afectats, la localització dels gens, el mode d'herència i el subtipus de LLA més freqüentment associat. Taula adaptada de Pagliaro i col·laboradors⁵.

Síndrome de predisposició	Gen implicat	Procés involucrat	Localització	Mode d'herència	Subtipus de LLA associat
Síndrome de Rubinstein-Taybi	<i>CREBBP; EP300</i>	Regulació epigenètica	16p13.3; 22q13.2	AD	Totes les LLA
Síndrome de Noonan	<i>PTPN11</i>	Senyalització	12q24.1	AD	Totes les LLA
Dèficit de reparació per desajust de base (CMMRD)	<i>MLH1; MSH2; MSH6; PMS2</i>	Resposta al dany de l'ADN	3p22.2; 2p21-p16.3; 2p16.3; 7p22.1	AR	Totes les LLA
Síndrome de Li-Fraumeni	<i>TP53</i>	Resposta al dany de l'ADN	17p13.1	AD	LLA-B
Síndrome de Down	<i>CRLF2; JAK2 (R683)</i>	Senyalització	Xp22.3; 9p24.1	TAC	LLA-B
Anèmia de Fanconi	<i>FANCA; FANCC; FANCG (XRCC9); FANCE; FANCF; FANCL; FANCB (FAAP95); FANCM; FANCI; FANCD2; FANCD1 (BRCA2); FANCI (BRIP1); FANCN (PALB2); FANCO (RAD51C); FANCP (SLX4); FANCO (ERCC4, XPF); FANCR (RAD51); FANCS (BRCA1); FANCT (UBE2T); FANCU (XRCC2); FANCV (REV7, MAD2L2)</i>	Resposta al dany de l'ADN	16q24.3; 9q22.32; 9p13.3; 6p21.31; 11p14.3; 2p16.1; Xp22.2; 14q21.1; 15q26.1 3p25.3; 13q13.1; 17q23.2; 16p12.2; 17q22; 16p13.3; 16p13.12; 15q15.1; 17q21.31; 1q31.3; 7q36.1; 1p36.22	AR; Lligat al X	LLA-T
Síndrome Bloom	<i>BLM</i>	Resposta al dany de l'ADN	15q26.1	AR	LMA i LLA
Neurofibromatosis tipus 1	<i>NF1</i>	Senyalització	17q11.2	AD	LLA
Atàxia telangiectasia	<i>ATM</i>	Resposta al dany de l'ADN	11q22.3	AR	LLA
LLA familiar	<i>SH2B3; TP53; RUNX1; TYK2; IKZF1; PAX5; ETV6</i>	Senyalització; Resposta al dany de l'ADN; Regulació transcripcional	16p.11.2; 7p13.1; 21q22.12; 19p13.2; 7p12.2; 9p13.2; 12p13.2	AR	LLA-B

MD: mode d'herència; AD: autosòmic dominant; AR: autosòmic recessiu; TAC: trisomia autosòmica.

D'altra banda, s'ha descrit que els portadors de reordenaments cromosòmics constitucionals com ara la translocació robertsoniana rob(15;21)(q10;q10) o el cromosoma 21 en anell, tenen una predisposició específica molt alta a desenvolupar LLA amb amplificació intracromosòmica del cromosoma 21 (iAMP21), amb un risc 2.700 vegades augmentat en comparació amb la població general^{24,25}.

1.2. Classificació de la leucèmia limfoblàstica aguda

El diagnòstic de la LLA es basa en l'observació morfològica de $\geq 25\%$ de blasts de línia limfoide en medul·la òssia. Les dades clíniques juntament amb les característiques citomorfològiques, el llinatge (B, T o fenotip mixt) i la classificació genètica s'han d'integrar per tal d'establir un diagnòstic segons els criteris de la l'Organització Mundial de la Salut (OMS)^{26,27} (Figura 5). Aquesta classificació és primordial per definir el pronòstic i el tractament més adequat²⁸.

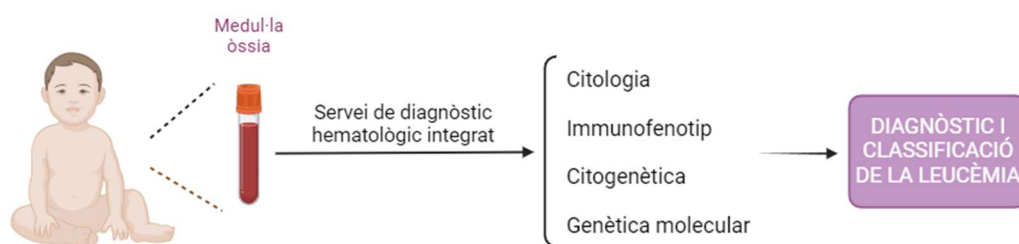


Figura 5. Representació de les àrees implicades en el diagnòstic integrat de les leucèmies que permeten la classificació d'aquestes neoplàsies.

1.2.1. Classificació morfològica de la LLA

En el moment del diagnòstic s'avaluarà la citomorfologia de la medul·la òssia (MO) i la sang perifèrica (SP). També s'ha de realitzar l'estudi citològic de extensions de líquid cefalorraquidi per tal de descartar l'afectació del SNC.

Habitualment, les extensions de MO es tenyeixen amb Mai-Grünwald-Giemsa (MGG) i es realitza el recompte de 500 cèl·lules nucleades per indicar el percentatge de blasts i les característiques morfològiques d'aquests²⁹. Al passat, els limfoblastes es classificaven seguint els criteris de la French-American-British (FAB) en el tipus morfològic L1, L2 o L3³⁰; no obstant, actualment aquesta classificació ja no s'utilitza donada subjectivitat associada i la falta d'importància pronòstica. Altres tincions citoquímiques convencionals com PAS, fosfatasa àcida, mieloperoxidasa (MPO), negre Sudan (SBB) i esterases (NACE, ANAE / ANBE $\pm$ NaF), no són obligatòries, però poden ser útils en casos de difícil caracterització.

1.2.2. Classificació immunofenotípica de la LLA

L'estudi de l'immunofenotip mitjançant citometria de flux (CF) és de gran rellevància tant en el diagnòstic com en el seguiment de la leucèmia limfoblàstica aguda. La CF és una tecnologia capaç de proporcionar una anàlisi multiparamètrica ràpida de cèl·lules individuals, permetent mesurar les característiques físiques (com la mida i la complexitat) i els marcadors de superfície o intracel·lulars de cadascuna de les cèl·lules. Així, la CF determina el grau de maduració i el llinatge de la població cel·lular, a més de mesurar l'índex d'ADN per determinar la ploïdia d'aquestes cèl·lules. Gràcies a aquests elements, la CF permet una caracterització fenotípica àgil i precisa de la població cel·lular, facilitant així un diagnòstic ràpid de la leucèmia i la seva classificació segons els criteris de l'Organització Mundial de la Salut (OMS)^{26,27}, sent també útil per a la predicció del pronòstic.

Els antígens més comunament utilitzats per a la identificació de la leucèmia limfoblàstica de cèl·lules B són CD19, CD22, i CD79a citoplasmàtic (cyCD79a), mentre que per a la leucèmia de llinatge T són el CD3 de superfície (smCD3), CD3 citoplasmàtic (cyCD3) i CD7 (Taula 4).

Taula 4. Classificació immunològica característica de las LLA, segons la classificació d'EGIL^{26,31}. Taula adaptada del protocol de tractament LAL/SEHOP-PETHEMA 2013³².

LLA d'estirp B: CD22+ i/o CD19+ i/o CD79a+
<u>Pro-B</u> : Tdt+, CD10-, cylg-, smlg-, CD38+ <u>B comú</u> : Tdt+, CD10+ , cylg-, smlg-, CD38+ <u>Pre-B</u> : Tdt+, CD10+/-, cylg+ , smlg-, CD38+/- <u>B madura</u> : CD20+ , Tdt-, CD10+/-, cylg+/-, cadena lleugera citoplasmàtica o de superfície + , CD38-
LLA d'estirp T: cyCD3+
<u>Pro-T</u> : CD7+, CD2-, CD5-, CD8-, CD1a- <u>Pre-T</u> : CD2+ i/o CD5+ i/o CD8+, CD1a-, CD71+ <u>T cortical</u> : CD1a+ , smCD3+/-, CD71- <u>T madura</u> : smCD3+ , CD1a-, CD2+, CD5+, CD4/8+ <u>Early Pre-T</u> : CD7+, CD1a-, CD8-, CD5-/expressió dèbil, antígen de cèl·lules mare o mieloides + (incloent CD34, HLA-DR, CD13, CD33, CD117, CD11b i CD65).

En l'hematopoiesi normal, l'antigen comú de leucòcits CD45 s'adquireix durant la maduració, de manera que la seva baixa expressió o absència s'associa amb més del 90% dels casos de leucèmia aguda, permetent així la identificació clara de poblacions immadures. L'antigen CD34, associat amb cèl·lules mare i progenitors hematopoètics, s'utilitza àmpliament en diversos panells de diagnòstic i indica el nivell de diferenciació dels blasts leucèmics. És crucial diferenciar el nivell de maduració, especialment en els casos de LLA-B, ja que la diferenciació entre la LLA-B immadura i el limfoma/leucèmia de Burkitt té implicacions terapèutiques importants³¹.

La caracterització inicial de la leucèmia és essencial per al seguiment de la resposta al tractament, mitjançant l'avaluació de la **malaltia residual mesurable** (MMR). Aquesta avaluació permet distingir entre pacients que responen bé a la teràpia i aquells que poden necessitar una reintensificació del tractament. El valor pronòstic de la MMR és considerat el factor més important en el maneig clínic de la leucèmia, ja que presenta una alta correlació amb el risc de recaiguda primerenca.

És important tenir en compte que, en casos de LLA, poden produir-se canvis fenotípics en la intensitat o en el coeficient de variació de la distribució d'un o més marcadors quan es comparen les mostres obtingudes en el moment del diagnòstic amb les de la recaiguda³³.

1.2.3. Classificació genètica de la LLA-B

En la leucèmia limfoblàstica aguda, el perfil genètic de la malaltia juga un paper crucial en el diagnòstic, la determinació del pronòstic i l'estratificació del tractament. La classificació de l'OMS de l'any 2017 definia els subtipus genètics clàssics de LLA-B: t(9;22)/BCR::ABL1, t(12;21)/ETV6::RUNX1, t(1;19)/TCF3::PBX1, t(5;14)/IGH::IL3, t(v;11q23.3)/reordenaments de KMT2A, alta hiperdiploïdia i hipodiploïdia. A més, es van incorporar a la classificació dos subtipus provisionals: iAMP21 i BCR::ABL1-like²⁶.

Aproximadament el 70% de les LLA-B es poden classificar mitjançant tècniques genètiques estàndards (veure apartat 1.4. *Tècniques citogenètiques i moleculars aplicades a l'estudi de la LLA*) en diferents subtipus amb **alteracions genètiques clàssiques**. El 30% restant dels casos pediàtrics de LLA-B no tenen aquestes alteracions

definitòries dels subtipus clàssics i s'anomenen "**B-other**". Dins d'aquest subgrup, a partir de l'anàlisi del transcriptoma complet i els estudis d'agrupació d'expressió gènica³⁴ (Figura 6), han sorgit diferents entitats genètiques com ara: *ETV6::RUNX1-like*, reordenaments de *DUX4*, *ZNF384*, *MEF2D*, *NUTM1* i alteracions de *PAX5*. Tot i que la majoria d'entitats es poden classificar mitjançant les proves citogenètiques clàssiques, també es requereix un tipatge genètic molecular per a categoritzar algunes entitats, com ara la *PAX5* P80R o l'*IKZF1* N159Y³⁵.

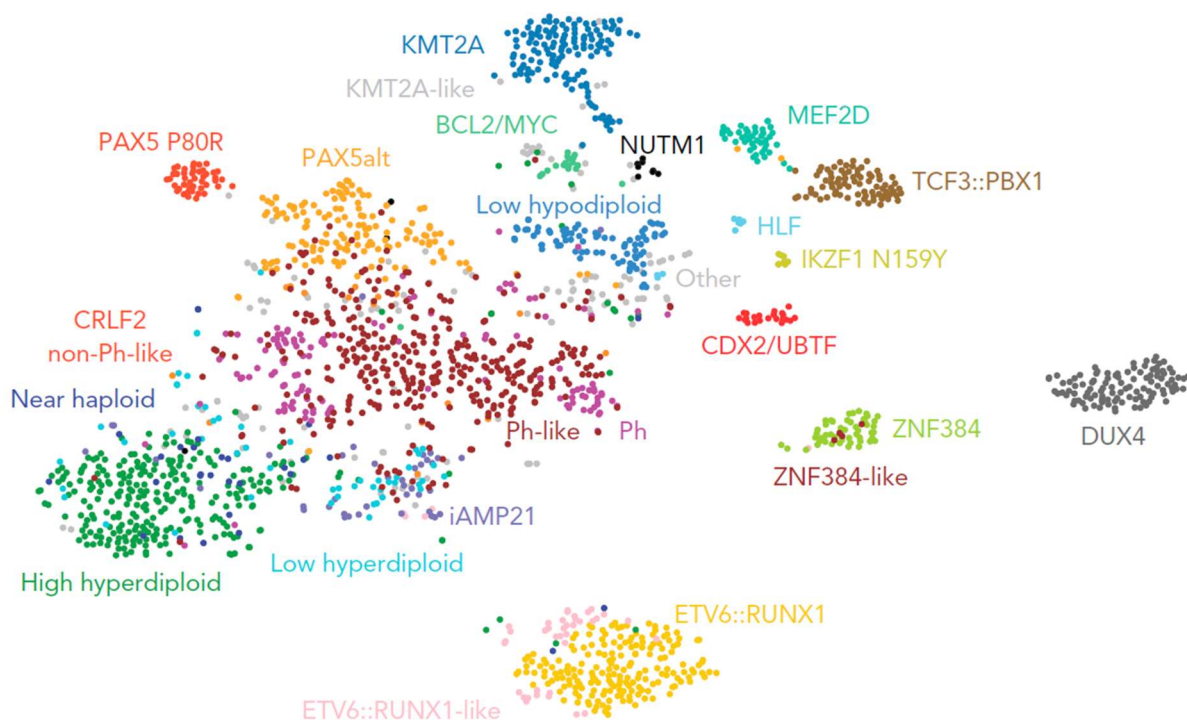


Figura 6. Agrupació bidimensional de l'expressió gènica de casos de LLA-B basada en dades de seqüenciació del transcriptoma de mostres de leucèmia recollides en el diagnòstic de nens o adults amb LLA. Els casos estan codificats per colors segons el subtipus. Aquest enfocament va ser informat per primera vegada per Gu i col·laboradors³⁴, i s'ha actualitzat per incloure casos addicionals de CDX2/UBTF després de la definició recent d'aquest subtipus³⁶. Imatge extreta de Kimura i col·laboradors³⁶.

L'any 2022, a partir de la integració de dades clíniques, citogenètiques i moleculars recents, es van presentar dues noves classificacions per part de l'OMS i l'ICC (Taula 5), en les quals s'han inclòs alguns d'aquests nous biomarcadors^{27,37}. Per exemple, en la nova classificació WHO-HAEM5, les entitats provisionals com *iAMP21* i *BCR::ABL1-like* ara són reconegudes formalment, i, paral·lelament, també s'han incorporat l'*ETV6::RUNX1-like* i la *t(17;19)/TCF3::HFL*³⁷.

Taula 5. Classificació genètica de les leucèmies limfoblàstiques agudes B, adaptada de les actualitzacions recents de l'OMS i l'ICC^{27,37}.

Leucèmia limfoblàstica aguda B (LLA-B)

Leucèmia/limfoma limfoblàstic B, NOS

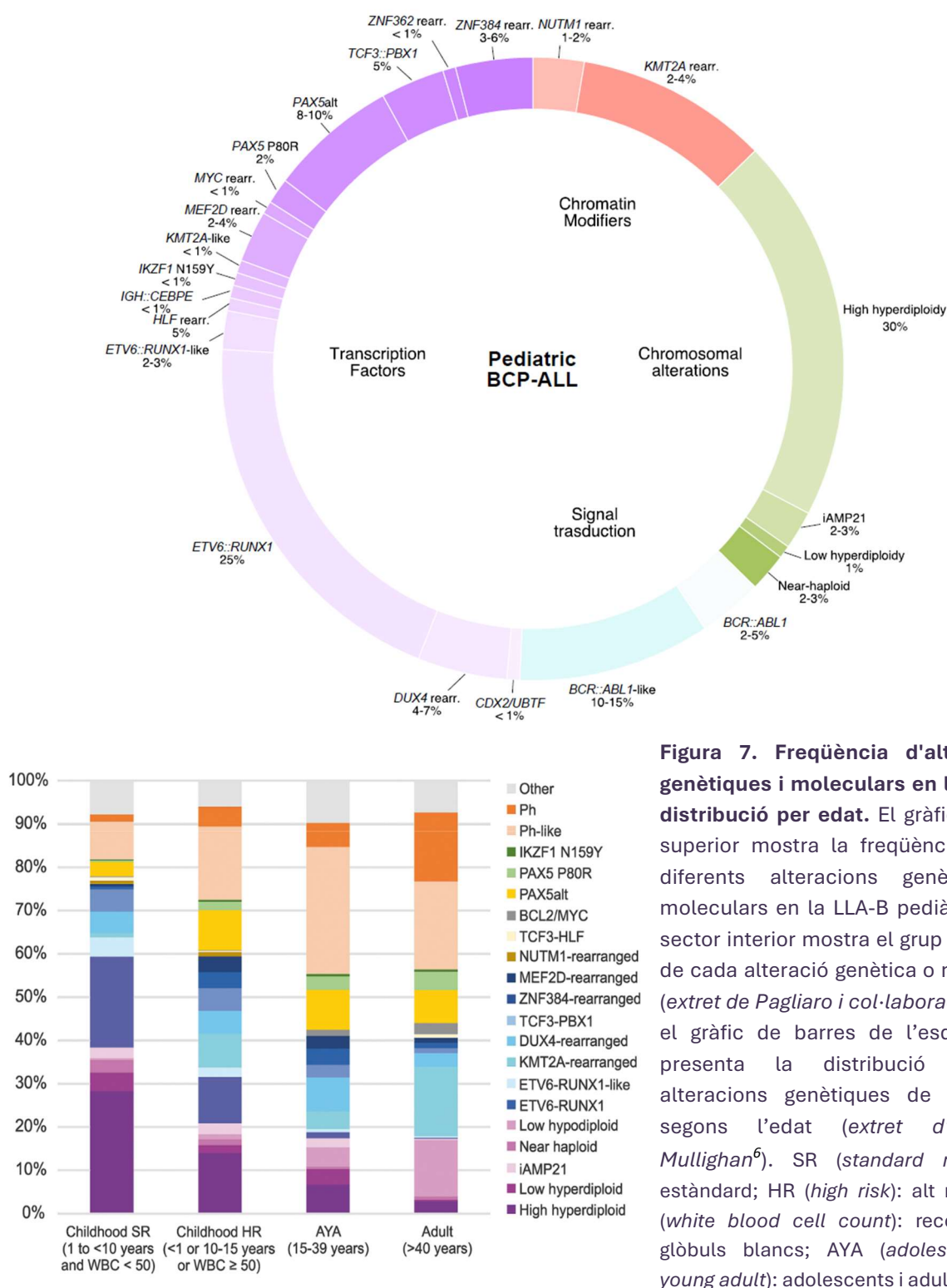
Leucèmia/limfoma limfoblàstic B amb anomalies genètiques recurrents

- Leucèmia/limfoma limfoblàstic B amb alta hiperdiploïdia
- Leucèmia/limfoma limfoblàstic B amb hipodiploïdia
 - Hipodiploïdia baixa (32–39 cromosomes)
 - Gairebé haploide (24–31 cromosomes)
- Leucèmia/limfoma limfoblàstic B amb *iAMP21*
- Leucèmia/limfoma limfoblàstic B amb fusió *IGH::IL3*
- Leucèmia/limfoma limfoblàstic B amb reordenament de *KMT2A*
- Leucèmia/limfoma limfoblàstic B amb fusió *ETV6::RUNX1*
- Leucèmia/limfoma limfoblàstic B amb característiques *ETV6::RUNX1-like*
- Leucèmia/limfoma limfoblàstic B amb fusió *BCR::ABL1*
- Leucèmia/limfoma limfoblàstic B amb característiques *BCR::ABL1-like*
 - Reordenament de les ABL1-Class
 - Activació de la via JAK/STAT
- Leucèmia/limfoma limfoblàstic B amb fusió *TCF3::PBX1*
- Leucèmia/limfoma limfoblàstic B amb fusió *TCF3::HLF*

Leucèmia/limfoma limfoblàstic B amb altres anomalies genètiques

- Leucèmia/limfoma limfoblàstic B amb reordenament de *DUX4*
- Leucèmia/limfoma limfoblàstic B amb reordenament de *MEF2D*
- Leucèmia/limfoma limfoblàstic B amb reordenament de *ZNF384*
- Leucèmia/limfoma limfoblàstic B amb reordenament de *NUTM1*
- Leucèmia/limfoma limfoblàstic B amb reordenament de *MYC*
- Leucèmia/limfoma limfoblàstic B amb reordenament de *UBTF::ATXN7L3/PAN3*, *CDX2* ("CDX2/UBTF")
- Leucèmia/limfoma limfoblàstic B amb mutació *PAX5* P80R
- Leucèmia/limfoma limfoblàstic B amb mutació *IKZF1* N159Y
- Altres entitats provisionals: LLA-B amb alteracions de *PAX5*, LLA-B amb mutació *ZEB2* H1038R/*IGH::CEBPE*, LLA-B amb característiques *ZNF384-like*, LLA-B amb característiques *KMT2A-like*

Les freqüències de les diferents alteracions genètiques varien segons l'edat dels pacients (Figura 7). En general, en pacients pediàtrics, les alteracions més comunes són aquelles associades a un bon pronòstic, mentre que en adults l'alteració més freqüent és la $t(9;22)/BCR::ABL1$. De fet, els biomarcadors genètics d'alt risc són quatre vegades més freqüents en adults que en nens^{6,38-40}.



A més d'aquestes alteracions genètiques primàries, les leucèmies limfoblàstiques agudes presenten característicament canvis en el nombre de còpies (CNV: delecions i guanys) i mutacions acompanyants que són importants en la leucemogènesi i es poden adquirir o enriquir durant la progressió de la malaltia. Aquests inclouen alteracions dels factors de transcripció limfoides (*IKZF1*, *PAX5*, *EBF1* i *ETV6*), gens associats a la regulació del cicle cel·lular (*CDKN2A/B*, *RB1* i *BTG1*), la regulació de l'apoptosi (*TP53*), la regulació transcripcional i la coactivació (*ERG*) i les alteracions epigenètiques (*ATF7IP*, *SETD2*, *KMT2D* i *CREBBP*). Així com mutacions de la via RAS (*KRAS*, *NRAS* i *PTPN11*) i mutacions de *FLT3*, entre d'altres. La prevalença, el tipus d'alteració i els gens alterats varien entre els diferents subtipus genètics^{5,41-43}.

La comprensió de la base genètica pot conduir a un millor seguiment de la malaltia, a l'avaluació del risc de recaiguda i a la inferència sobre la possible evolució, així com a la implementació de teràpies moleculars dirigides per reduir aquest risc i els efectes secundaris subjacents^{38,44}.

1.2.3.1. Leucèmia limfoblàstica aguda B amb alteracions genètiques recurrents

Les alteracions genètiques recurrents es poden classificar en:

- **Aneuploidies:** canvi en el nombre de cromosomes d'una cèl·lula.
- **Reordenament cromosòmic i/o fusions de gens coneguts:** ruptures i unions anormals dels cromosomes que resulten en la combinació de dos gens; normalment desregulen oncògens o codifiquen factors de transcripció quimèrics.
- **Mutacions puntuals:** canvis en un sol nucleòtid de l'ADN, que resulten en una activitat anormal del gen al qual afecten.
- **Perfil d'expressió similar a altres subtipus establerts:** presenten un perfil d'expressió gènica similar a un subtipus conegut, però no tenen l'alteració genètica característica d'aquest subtipus.

LLA-B amb alta hiperdiploïdia

L'**alta hiperdiploïdia** és l'anomalia citogenètica més freqüent en la leucèmia limfoblàstica aguda pediàtrica, representant el 30-35% dels casos. Es defineix pel guany no aleatori de cromosomes, augmentant el nombre de cromosomes en el clon leucèmic entre 51 i 65-67; també s'utilitza freqüentment un índex d'ADN d'entre d'1,16-1,48 per definir aquest subgrup. El 75% dels esdeveniments d'aneuploïdia impliquen una o dues còpies extres dels cromosomes X, 4, 6, 10, 14, 17, 18 i 21 (Figura 8)⁴⁵⁻⁴⁸.

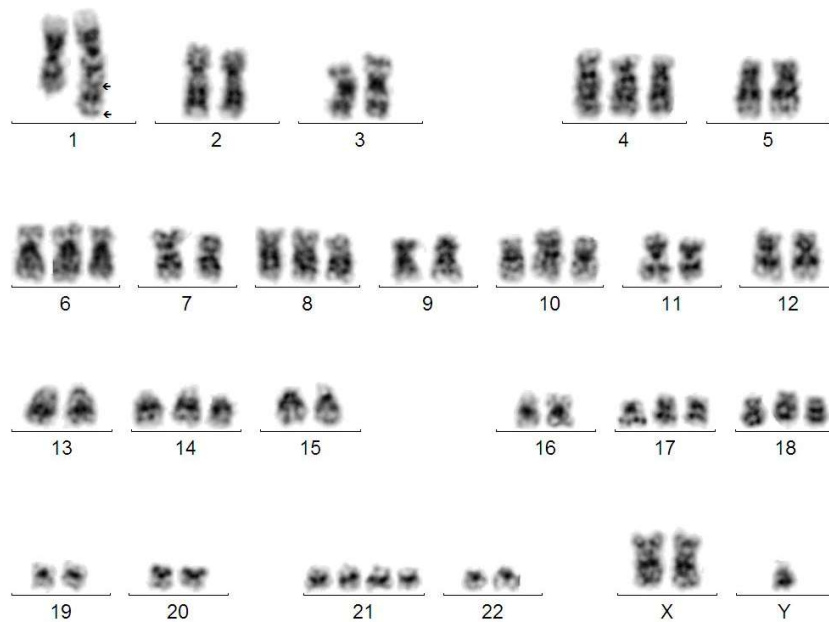


Figura 8. Imatge d'una alta hiperdiploïdia típica en la LLA-B.

L'alta hiperdiploïdia s'ha associat amb un pronòstic favorable i elevades taxes de supervivència en diversos estudis durant dècades. Malgrat aquesta associació amb bons resultats, l'alta freqüència de pacients amb LLA amb alta hiperdiploïdia fa que aquest subgrup representi fins al 25% de totes les recaigudes⁴⁸.

Recentment, Enshaei i col·laboradors⁴⁹ han definit una combinació òptima de trisomies de cromosomes que permeten predir de forma significativa el pronòstic dels pacients amb alta hiperdiploïdia. S'identifica un grup de bon pronòstic, corresponent al 80% dels casos, que es defineix per les trisomies 17 i/o 18 i sense trisomies 5 i 20. Aquest grup mostra una millor resposta al tractament independent de la MMR, amb un resultat similar als dels pacients amb LLA amb reordenament *ETV6::RUNX1*, presentant baixes taxes de recaiguda i millor supervivència global. D'altra banda, els pacients amb alta

hiperdiploïdia i un perfil de mal pronòstic presentaven resultats similars al grup de LLA-B amb citogenètica de risc intermedi. Aquests resultats recolzen la importància d'obtenir bones dades citogenètiques o de SNP-array per poder definir correctament el risc dels pacients amb hiperdiploïdia.

Pel que fa a les mutacions associades, normalment s'observen subclons amb mutacions en gens modificadors de la cromatina (*CREBBP*, *NSD2*, *KMT5B*, *SETD2* i *EZH2*) i de la via de senyalització RTK/RAS (*FLT3*, *NRAS*, *KRAS* i *PTPN11*)^{47,48,50}. Altres alteracions també enriquides en les altes hiperdiploïdies afecten els gens *NF1*, *CDKN2A/B*, *IKZF3* i *PAG1*⁴⁸.

LLA-B amb hipodiploïdia

La **hipodiploïdia** es defineix com la pèrdua dos o més cromosomes. Es classifica en funció del nombre de cromosomes com: hipodiploïdia baixa (32-39 cromosomes) i gairebé haploïdia (24-31 cromosomes). Ambdues s'associen a pronòstics extremadament desfavorables^{37,51}. La **hipodiploïdia baixa** s'observa en aproximadament l'1% dels nens amb LLA i en més del 10% dels adults⁶. Els cromosomes que més freqüentment es perden són el 3, 7, 9, 15, 16 i 17⁵¹. A més, es caracteritzen per alteracions en la via de RAS (principalment en *NRAS*, *FLT3*, *KRAS* i *PTPN11*) i en *TP53*, i delecions d'*IKZF2* i *RB1*^{51,52}. La **gairebé haploïdia** està present en aproximadament un 2% de la LLA pediàtrica⁶ i s'associa amb alteracions activadores de la via de senyalització RTK/RAS (particularment *NF1* i *PAG1*) i delecions d'*IKZF3*⁵².

La hipodiploïdia pot passar desapercebuda, ja que sovint les cèl·lules experimenten una endorreduplicació i s'observa un clon amb un nombre modal de cromosomes en l'interval hiperdiploide (50-78 o més) (Figura 9), podent ser erròniament considerat com una alta hiperdiploïdia i interpretat com un factor de bon pronòstic. La presència d'únicament el clon hiperdiploide (duplicat) representa aproximadament el 25% dels pacients amb LLA hipodiploide, cosa que pot complicar la classificació correcta d'aquests pacients. Per aquests casos, cal tenir en compte que els clon hipodiploides habitualment contenen 1 o 2 còpies de cada cromosoma; per tant, si el clon experimenta una duplicació gairebé exacta, el nou clon tindrà 2 o 4 còpies de cada cromosoma. Això contrasta amb la hiperdiploïdia típica associada a un bon pronòstic, on la majoria d'aneuploïdia es produeix

en forma de trisomies. Per tant, es poden sospitar hipodiploïdies emmascarades al detectar clons amb “hiperdiploïdia per tetrasomia” i confirmar-les formalment mitjançant l'índex de l'ADN⁵³ o per arrays.

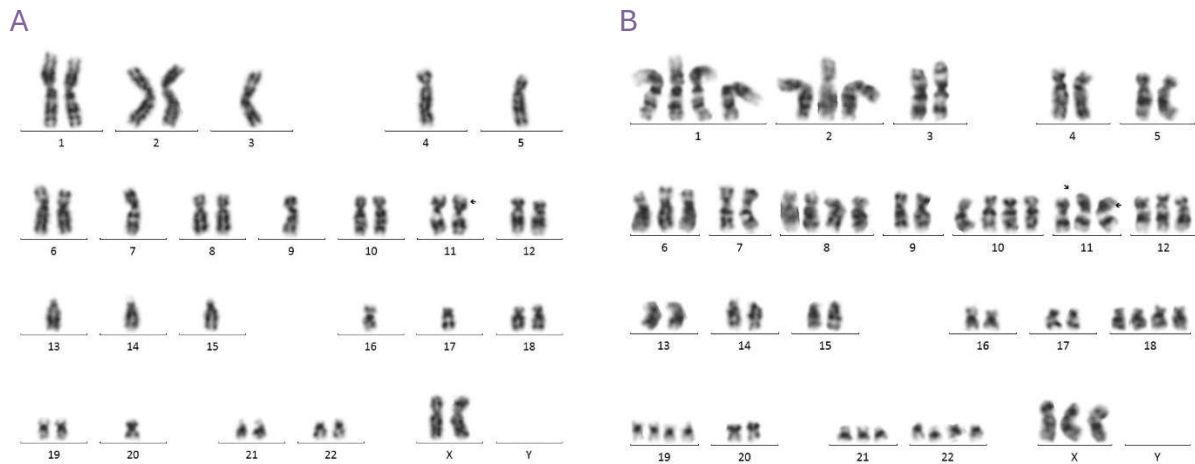


Figura 9. Imatge d'una hipodiploïdia típica en la LLA-B. (A) Clon hipodiploide, amb 35 cromosomes, on s'observa el patró recurrent de pèrdues dels cromosomes -3, -7, -13, -17 i -20. (B) Clon endorreduplicat, que mostra el doble de còpies dels cromosomes observats en el clon hipodiploide.

LLA-B amb iAMP21

La leucèmia limfoblàstica aguda amb **amplificació intracromosòmica del cromosoma 21 (iAMP21)** es presenta en el 2% de la LLA-B pediàtrica. En general, és més comuna en nens majors de 5 anys i adults menors de 30 anys (mediana de 9-10 anys), amb un baix recompte de leucòcits ($<50 \times 10^9/L$)^{6,25,39}.

S'ha associat a un mal pronòstic i altes taxes de recaiguda, que han millorat amb l'aplicació de tractaments més intensius^{54,55}. La iAMP21 es defineix com la presència de cinc o més còpies del gen *RUNX1* (o tres o més còpies addicionals de *RUNX1* dins d'un únic cromosoma 21 anormal)²⁷. Una de les tècniques “*gold standard*” per identificar aquesta alteració és la FISH, on les senyals de *RUNX1* s'observen agrupades en interfase (Figura 10a) i duplicades en tàndem al llarg del cromosoma 21 alterat en metafase (Figura10b)²⁵.

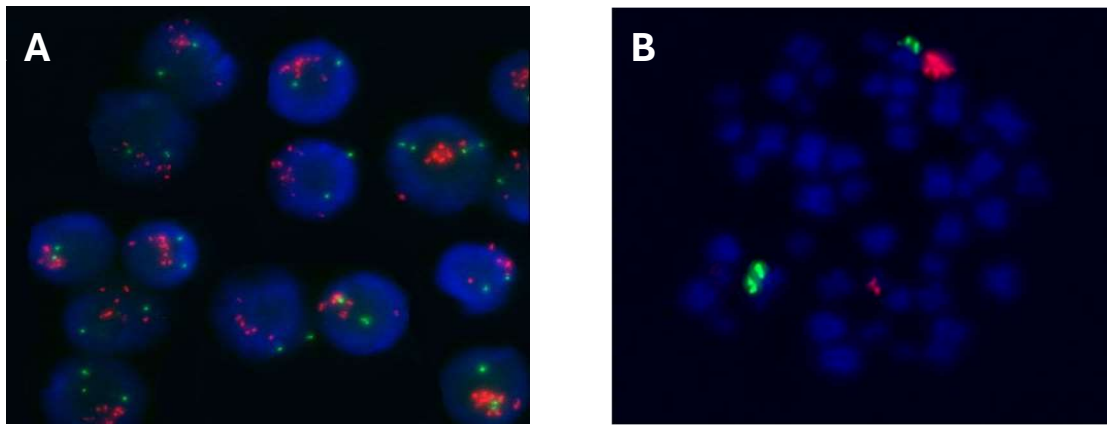


Figura 10. Patró típic de la iAMP21 en l'estudi de FISH utilitzant la sonda ETV6/RUNX1 dual color dual fusion. (A) Estudi en interfase, on s'observen les senyals de RUNX1 (vermell) agrupades corresponents a l'amplificació i una senyal corresponent al cromosoma 21 normal aïllat. (B) En metafase, s'observa una senyal per al cromosoma 21 normal i moltes senyals duplicades en tàndem per a la iAMP21.

El procés de formació de l'iAMP21 sovint inclou un o més cicles de “*breakage-fusion-bridge*”, seguit de cromotripsi del cromosoma 21²⁴. Aquests provoquen que l'alteració iAMP21 sigui altament variable i complexa, implicant múltiples guanys, amplificacions, inversions i delecions. Tot i això, hi ha característiques comunes entre totes les iAMP21: una regió comuna amb el nivell més alt d'amplificació i una pèrdua en la regió telomèrica²⁵. La regió amplificada comprèn 7,8Mb del cromosoma 21, des de 32,8 fins a 40,6Mb⁵⁶. La variació en el nombre de còpies d'aquesta regió oscil·la entre 3 i 8 (mitjana de 5,5), fins i tot observant-se variacions del nombre de còpies dins de la mateixa regió en un mateix individu⁵⁷.

S'ha demostrat heterogeneïtat clonal i evolució genòmica, indicant que l'adquisició de l'iAMP21 és un esdeveniment primerenc que pot experimentar una amplificació progressiva durant la malaltia⁵⁶. La iAMP21 s'estableix com un esdeveniment iniciador de la leucemogènesi, que es manté constant entre el diagnòstic i la recaiguda^{25,58}. A la mostra de la recaiguda, normalment es conserven els mateixos punts de trencament que la mostra de diagnòstic, tot i que el nombre de còpies pot variar^{57,59,60}. No obstant això, el mecanisme exacte pel qual la iAMP21 promou la leucèmia segueix sent desconegut. S'hipotetitzava que s'associa amb una major expressió del gens o seqüències funcionals no codificants que es troben dins de la regió amplificada⁶¹. Els gens que es troben comunament sobreexpressats són *CBR3*, *DOPEY2*, *MORC3*, *CHAF1B*, *CLDN14*, *SIM2*, *HLCS*, *RIPPLY3*, *PIGP*, *TTC3*, *VPS26C*, *DYRK1A*, *BRWD1*, *HMG1*, *CRYZL1*, *SON*,

TMEM50B i *ERG*^{56,57,62,63}. Cal tenir en compte, però, que també s'han informat casos de iAMP21 com esdeveniments subclonals i secundaris en LLA-B amb reordenament de *DUX4* o LLA-B amb *ETV6::RUNX1*⁵⁶.

En aproximadament el 20% dels casos, la iAMP21 és l'única anomalia citogenètica⁶⁰. En la resta de casos, s'observa una àmplia gamma d'anomalies genètiques secundàries que poden contribuir a la progressió de la malaltia: delecions de *RB1*, *EBF1*, *CDKN2A/B*, *SH2B3* i *ETV6*; reordenaments de *CRLF2*; guanys dels cromosomes X, 10 i 14; i delecions parcial dels cromosomes 7 i 11⁵⁹⁻⁶¹. De fet, les iAMP21 presenten el nombre mitjà més alt de variants estructurals i la càrrega mutacional més elevada entre els diferents subtipus de LLA⁶⁴. A nivell mutacional, les vies més alterades són la senyalització JAK/STAT, la senyalització RAS i la de diferenciació de cèl·lules B⁵⁶. En conseqüència, s'observen mutacions recurrents en *KRAS* i *NRAS*⁶⁵, *IL7R*⁶⁴, i *SH2B3*^{59,61}. A més, la pèrdua neutra d'heterozigositat (CN-LOH) en 9p, 12q i 6p s'observen freqüentment en la LLA amb iAMP21^{56,61}.

LLA-B amb fusió *IGH::IL3*

La LLA-B amb la **translocació t(5;14)(q31;q32)/*IGH::IL3*** és una entitat reconeguda en la classificació de l'OMS²⁶ que s'associa amb un fenomen massiu d'eosinofília. En la translocació t(5;14)(q31;q32), l'*enhancer* de l'*IGH* es juxtaposa amb el promotor del gen *IL3*, provocant la sobreproducció d'interleucina-3 i, conseqüentment, la maduració i l'alliberament d'eosinòfils madurs a la sang⁶⁶.

Es tracta d'una entitat extremadament rara (<1% de les LLA-B)²⁶, per la qual cosa les dades clíniques i biològiques són escasses a la literatura. Fournier i col·laboradors⁶⁶ van recollir les dades d'una vintena de pacients, descrivint-los com: majoritàriament adolescents o adults joves (edat mitjana: 14,3 anys), més prevalent en homes (ràtio 5:1), amb baix recompte de blasts, eosinofília massiva i símptomes relacionats amb el SNC (no per infiltració de blasts, sinó per la toxicitat dels propis eosinòfils) i sovint van acompanyats de delecions d'*IKZF1*. Els pacients tenen un pronòstic intermedi, amb freqüents fracassos en la inducció i alts nivells de MMR.

LLA-B amb reordenaments de *KMT2A*

Els **reordenaments de *KMT2A*** (localitzat a 11q23) s'han descrit amb més de 100 gens diferents, els quals presenten una distribució específica segons l'edat del pacient i el tipus de leucèmia (Figura 11). En la LLA, les cinc fusions més freqüents (*AFF1*, *MLLT3*, *MLLT1*, *MLLT10* i *AFDN*) representen més del 90% de tots els reordenaments de *KMT2A*. Concretament, el reordenament més comú en la LLA és la $t(4;11)(q21;q23)/KMT2A::AFF1$ ⁶⁷.

Els reordenaments de *KMT2A* es troben en el 80% dels lactants (<1 any), en el 5% dels casos pediàtrics i en un 15% dels casos adults⁶⁸. Els pacients solen presentar hiperleucocitosi, un immunofenotip pro-B (CD10-) amb l'expressió de marcadors mieloides, i una incidència relativament alta d'afectació del SNC^{69,70}. Independentment del *partner* de fusió o el fenotip de llinatge, aquest subtipus mostra una signatura d'expressió gènica concreta amb sobreexpressió dels gens del clúster *HOX* i del cofactor *MEIS1*. A més, les vies PI3K i RAS solen trobar-se alterades⁷⁰.

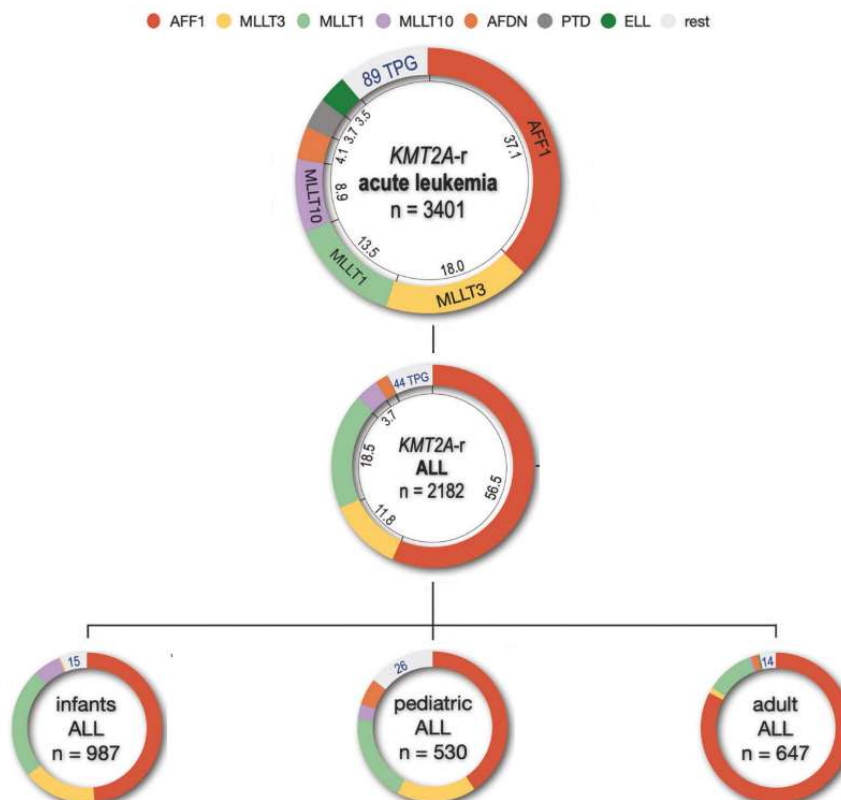


Figura 11. Distribució dels reordenaments de *KMT2A* en la LLA segons l'edat. La distribució dels socis de fusió més freqüents s'indica amb diferents colors (codi de color a la part superior) i la seva freqüència en percentatge. El nombre addicional de gens de fusió associats es mostra amb números blaus per a cada subgrup. Imatge adaptada de Meyer i col·laboradors⁶⁷.

Aquest subtipus de LLA s'associa a un pronòstic desfavorable, amb comportaments agressius que impliquen recaigudes precoces i una alta taxa de mortalitat^{6,68}. Tot i això, s'estan aconseguint millorar les supervivències tractant els pacients amb combinacions de millors quimioteràpies, estratificacions basades en la MMR, així com amb els avenços en cures de suport⁷¹.

LLA-B amb fusió *ETV6::RUNX1*

La LLA-B amb **fusió *ETV6::RUNX1*** és un dels subtipus més comuns en la LLA-B pediàtrica, representant el 20-25% dels casos⁷⁰. Aquesta fusió és més freqüent en nens menors de 10 anys (mediana de 4 anys). El subtipus *ETV6::RUNX1* es considera de bon pronòstic, amb supervivències superiors al 95% en la majoria de protocols de tractament i assajos clínics, la qual cosa fa que aquests pacients siguin candidats per a una desintensificació dels tractaments⁷².

Cal destacar que la t(12;21)(p13;q22)/*ETV6::RUNX1* és una variant estructural críptica a nivell de cariotip, per la qual cosa la tècnica “*gold standard*” per la seva detecció és l'estudi de FISH^{6,73} (Figura 12).

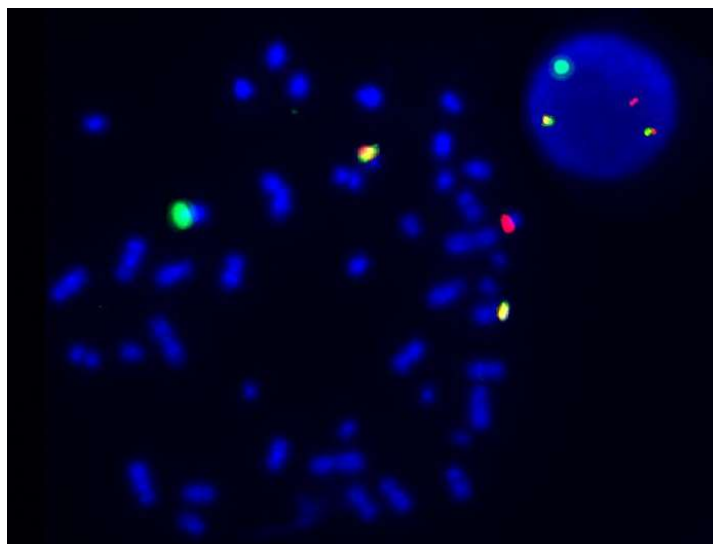


Figura 12. Imatge de la t(12;21)(p13;q22)/*ETV6::RUNX1* positiva per l'estudi de FISH, en utilitzar la sonda *ETV6/RUNX1 dual color dual fusion* (*ETV6* marcat en verd i *RUNX1* marcat en vermell).

Aquesta fusió es pot detectar en nadons fins i tot dins de l'úter, ja que s'ha confirmat la seva presència en sang de cordó umbilical i s'ha demostrat el seu origen prenatal en bessons idèntics^{74,75}. Tot i que l'alteració s'ha identificat en nounats sans (1-5%), la

incidència de leucèmia entre els portadors és molt menor (0,2-1%)⁸. La latència prolongada des del naixement fins a la manifestació de la leucèmia suggereix que la fusió *ETV6::RUNX1* requereix d'altres esdeveniments genètics cooperants per induir la leucemogènesi^{8,76}. Aquests “segon *hit*” o esdeveniments addicionals poden incloure deleccions en diverses regions cromosòmiques com 12p (afectant l'al·lel d'*ETV6* no reordenat), 6q, 9p (amb delecció focal de *PAX5*), 5q, 3p i 3q, 14q, 7p i 7q, i la pèrdua de cromosomes sencers com X, 8 i 13 sencers. A més, es poden observar duplicacions de 4q o trisomies del cromosoma 21 (guanys de *RUNX1*) i 16. Així mateix, són freqüents les mutacions de la via RAS o de *NSD2*^{8,70,77}.

Un estudi de Chen i col·laboradors⁷⁸ van demostrar que els gens que activen la recombinació (RAG) es trobaven particularment expressats en el casos de LLA-B amb *ETV6::RUNX1*, especialment la signatura de *RAG1*, associada amb alts nivells d'expressió de *ETV6*, *CLIC5*, *WBP1L*, *ANGPTL2* i *BIRC7*.

LLA-B amb característiques *ETV6::RUNX1-like*

La LLA-B amb característiques ***ETV6::RUNX1-like*** es refereix a un subgrup de pacients que comparteixen un perfil genètic d'expressió i de metilació semblant als pacients amb la t(12;21)/*ETV6::RUNX1*, però que no presenten aquesta fusió típica. Aquest subtipus constitueix aproximadament entre l'1-3% de les LLA-B pediàtriques i es caracteritza per presentar **alteracions concurrents en *ETV6* i *IKZF1***, ja sigui en forma de fusions o deleccions. Tant *IKZF1* com *RUNX1* són factors de transcripció fonamentals per a la maduració de les cèl·lules B, la qual cosa suggereix que les alteracions en *IKZF1* poden provocar els mateixos efectes que la funció alterada de *RUNX1* que es produeix clàssicament en la fusió *ETV6::RUNX1*⁷⁹. A més, s'han associat amb fusions gèniques alternatives o CNV dels factors de transcripció de la família ETS (*ERG*, *FLI1*) o *TCF3*³⁴.

Típicament presenten un immunofenotip similar als casos positius per *ETV6::RUNX1*, amb expressió de CD27+ i CD44baix-negatiu⁸⁰. També s'han trobat enriquides les deleccions intragèniques de *ARP21*⁸¹. A més, s'ha demostrat la sobreexpressió dels gens de la signatura *RAG1*, que es considera un bon marcador genètic per identificar aquest nou subtipus⁷⁸.

Encara que les dades sobre aquest subtipus són limitades i no s'han descrit series llargues d'*ETV6::RUNX1-like*, sembla que aquest grup de pacients podrien tenir un pronòstic relativament favorable, tot i que calen més estudis per confirmar-ho^{34,79}.

LLA-B amb fusió *BCR::ABL1*

La **translocació t(9;22)(q34;q11.2)** (Figura 13) dona lloc a la fusió ***BCR::ABL1*** (Filadèlfia o *Ph*), es troba en el 2-5% de les LLA-B pediàtriques i augmenta fins els 15-25% en adults joves^{34,82}. La fusió dels gens *BCR* i *ABL1* crea una proteïna quimèrica amb activitat tirosina cinasa constitutiva, que promou la proliferació i supervivència anòmala de les cèl·lules leucèmiques.

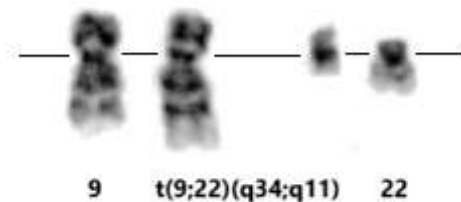


Figura 13. Imatge de la t(9;22)(q34;q11) observada al estudi de cariotip, que implica la fusió *BCR::ABL1*.

Històricament, la LLA-B amb la fusió *BCR::ABL1* es considerava un subtipus d'alt risc, però la incorporació d'inhibidors de la tirosina cinasa (TKi), en combinació amb la quimioteràpia, ha millorat significativament els resultats clínics d'aquests pacients⁸⁴. Així mateix, la predicció del risc ha millorat al considerar les dades la MMR i la hiperleucocitosis inicial⁸⁵. Tot i això, la supervivència a llarg termini continua sent un repte, amb aproximadament la meitat dels pacients morint dins dels 5 anys posteriors al diagnòstic, malgrat l'ús dels TKi⁸⁶.

Els pacients amb LLA-B amb *BCR::ABL1* solen presentar altres anomalies genètiques secundàries, incloent deleccions en els gens *IKZF1*, *EBF1*, *PAX5* i *CDKN2A/B*^{70,86}. Les alteracions en *IKZF1* s'han vinculat amb pronòstics desfavorables, independentment de l'ús de TKi, especialment quan coexisteixen amb deleccions en *CDKN2A/B*, *PAX5*, o ambdues⁷⁰.

LLA-B amb *BCR::ABL1-like*

La leucèmia limfoblàstica aguda B amb ***BCR::ABL1-like*** (o *Philadelphia-like*) mostra un patró d'expressió gènica molt similar al de la LLA-B amb t(9;22)(q34.1;q11.2)/*BCR::ABL1*, però sense presentar la fusió típica *BCR::ABL1*²⁶. Representen aproximadament el 15-20% de les LLA-B, tot i que la incidència varia amb l'edat; afecten aproximadament un 10-15% en nens, un 25-30% dels adults joves (21-39 anys), i un 20% dels adults (>40 anys)⁸⁷. La freqüència pot incrementar-se en pacients d'ascendència hispana i variants de *GATA3*⁸⁸.

A nivell biològic, s’ha descrit un ampli espectre d’alteracions genètiques (més de 60), incloses translocacions, reordenaments críptics, canvis en el nombre de còpies i mutacions que s’associen a la LLA *BCR::ABL1-like*^{87,89,90}. Totes aquestes alteracions genètiques convergeixen en una signatura d’expressió gènica comuna que es manifesta en l’activació de les vies de senyalització dels receptors de cinasa i citocines (Figura 14).

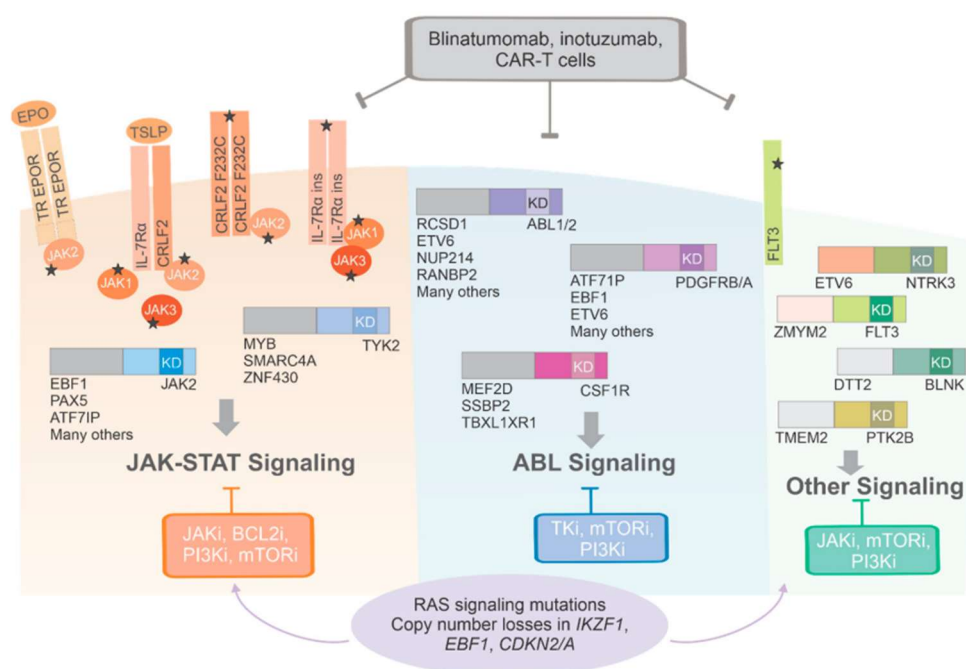


Figura 14. Esquema de les principals alteracions genòmiques en la LLA *BCR::ABL1-like*, incloent mutacions, reordenaments, fusions de gens i CNV, que impulsen la senyalització de citocines i la cinasa. Aquestes alteracions activen vies com les de la família JAK o la senyalització ABL, fent-les susceptibles als TKi. Abreviatures: TR: truncat; JAKi, inhibidors de JAK; BCL2i, inhibidors de *BCL2*; PI3Ki, inhibidor de la fosfoinosítid 3-cinasa; mTORi, inhibidors de mTOR; TKi, inhibidors de la tirosina cinasa. El signe * indica l'aparició d'una mutació. *Imatge extreta de Iacobucci i col·laboradors*⁸⁷.

Les alteracions en la LLA *BCR::ABL1-like* es poden classificar en:

- Alteracions de la via JAK/STAT: inclouen mutacions que activen receptor de citocina (p. ex., *CRLF2* i *IL7R*); fusions de gens que alteren l'expressió dels receptors de citocines (p. ex., *IGH::CRLF2* i *P2RY8::CRLF2*); fusions de gens i/o mutacions que activen cinases (p. ex., *JAK1*, *JAK2*, *JAK3*, *TYK2*); i reordenaments que alteren i trunquen l'expressió del receptor de citocines (p. ex., reordenaments d'*EPOR*).
- Fusions que impliquen gens de classe ABL: com *ABL1*, *ABL2*, *CSF1R*, *LYN*, *PDGFRA*, *PDGFRB*.
- Fusions menys comunes: com *FLT3*, *FGFR1*, *NTRK3*, *PTK2B*.

Els principals gens de fusió associats a cadascun dels gens que es troben freqüentment alterats en les LLA-B amb *BCR::ABL1-like* es recullen a la [Taula 6](#).

Taula 6. Recull dels gens associats al subtipus *BCR::ABL1-like*, junt amb els gens de fusió amb els quals es reordenen habitualment. Taula adaptada de Tasian i col·laboradors⁹¹.

Gen associat a <i>BCR::ABL1-like</i>	Gens de fusió associats
<i>ABL1</i>	<i>CENPC</i> , <i>ETV6</i> , <i>FOXP1</i> , <i>LSM14A</i> , <i>NUP153</i> , <i>NUP214</i> , <i>RANBP2</i> , <i>RCSD1</i> , <i>SFPQ</i> , <i>SNX1</i> , <i>SNX2</i> , <i>SPTNA1</i> , <i>ZMIZ1</i>
<i>ABL2</i>	<i>PAG1</i> , <i>RCSD1</i> , <i>ZC3HAV1</i>
<i>CSF1R</i>	<i>MEF2D</i> , <i>SSBP2</i> , <i>TBL1XR1</i>
<i>PDGFRA</i>	<i>FIP1L1</i>
<i>PDGFRB</i>	<i>ATF7IP</i> , <i>EBF1</i> , <i>ETV6</i> , <i>SNX29</i> , <i>SSBP2</i> , <i>TNIP1</i> , <i>ZEB2</i> , <i>ZMYND8</i>
<i>LYN</i>	<i>GATAD2A</i> , <i>NCOR1</i>
<i>CRLF2</i>	<i>CSF2RA</i> , <i>IGH</i> , <i>P2RY8</i>
<i>JAK2</i>	<i>ATF7IP</i> , <i>BCR</i> , <i>EBF1</i> , <i>ETV6</i> , <i>GOLGA5</i> , <i>HMBOX1</i> , <i>OFD1</i> , <i>PAX5</i> , <i>PCM1</i> , <i>PPFIBP1</i> , <i>RFX3</i> , <i>SMU1</i> , <i>SNX29</i> , <i>SSBP2</i> , <i>STRN3</i> , <i>TERF2</i> , <i>TPR</i> , <i>USP25</i> , <i>ZBTB46</i> , <i>ZNF274</i> , <i>ZNF340</i>
<i>EPOR</i>	<i>IGH</i> , <i>IGK</i> , <i>LAIR1</i> , <i>THADA</i>
<i>TSLP</i>	<i>IQGAP2</i>
<i>TYK2</i>	<i>MYB</i> , <i>SMARCA4</i> , <i>ZNF340</i>
<i>IL2RB</i>	<i>MYH9</i>
<i>NTRK3</i>	<i>ETV6</i>
<i>PTK2B</i>	<i>KDM6A</i> , <i>STAG2</i> , <i>TMEM2</i>
<i>FGFR1</i>	<i>BCR</i>
<i>FLT3</i>	<i>ZMYM2</i>
<i>DGKH</i>	<i>ZFAND3</i>
<i>BLNK</i>	<i>DNTT</i>
<i>CBL</i>	<i>KANK1</i>

La distribució del gens alterats en el subtipus de LLA amb *BCR::ABL1-like* pot variar segon l'edat⁹⁰, en general, la majoria de casos presenten l'activació de la via de senyalització de JAK/STAT: el 50% dels pacients tenen alteracions de *CRLF2* i 10-15% presenten altres alteracions que activen la via de senyalització⁹². D'altra banda, el 15-20% mostraran fusions dels gens de la classe *ABL*⁹². Així mateix, aquest subtipus habitualment presenta alteracions en factors de transcripció implicats en el desenvolupament de la cèl·lula B, com *IKZF1*, *EBF1*, *ETV6*, *ERG*, *TCF3* i *PAX5*^{89,90}.

Pel que fa a les alteracions de ***CRLF2***, aquestes es donen amb més freqüència en nens amb Síndrome de Down, individus hispànics i persones amb ascendència nativa americana. Les alteracions inclouen: un reordenament críptic que fusiona *CRLF2::IGH*; una deleció focal a la regió pseudoautosomal que resulta en la fusió *P2RY8::CRLF2*; i menys freqüentment, la mutació puntual *CRLF2* F232C^{70,93} (Figura 15). Habitualment, aquestes alteracions es presenten amb mutacions concomitants en *JAK2*, *JAK1*, *JAK3*, *FLT3*, en el coreceptor *IL7R*, i amb deleccions de *SH2B3*⁸⁹. Així mateix, s'ha descrit que els reordenaments de *CRLF2* poden coexistir amb iAMP21 o dic(9;20), així com amb l'alta hiperdiploidia⁹⁴.

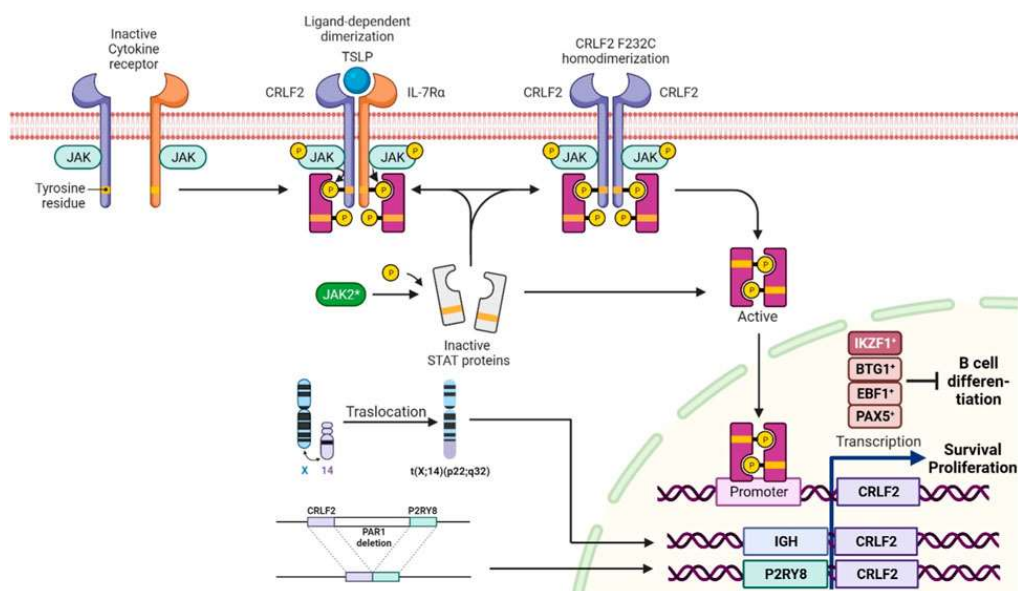


Figura 15. Alteracions associades al gen *CRLF2*. L'activació normal de *CRLF2* es produeix quan s'uneix a la timopòietina estromal limfoide (TSLP), la qual indueix un canvi conformacional que resulta en la dimerització del receptor. Els reordenaments de *CRLF2*, la variant p.F232C i les variants de *JAK2* promouen la fosforilació de STAT5 i l'activació de la via JAK/STAT, conduint a una sobreexpressió oncogènica de *CRLF2* i una activació aberrant de la senyalització. Les deleccions dels reguladors transcripcionals limfocític B, com *IKZF1*, *EBF1*, *BTG1* i *PAX5*, també augmenten l'expressió de *CRLF2*, conduint a una diferenciació cel·lular alterada. *Imatge extreta de Gil i col·laboradors*⁹³.

La LLA-B *BCR::ABL1-like* s'associa a pronòstics desfavorables, ja que presenta nivells elevats de MMR i taxes més altes de fallida del tractament^{70,92}. Tot i això, les alteracions descrites poden ser susceptibles de teràpies dirigides amb TKi en combinació amb la quimioteràpia citotòxica convencional⁹⁰. De fet, s'han descrit casos en què pacients refractaris a la quimioteràpia han respost als TKi⁹⁵.

LLA-B amb fusió *TCF3::PBX1*

La **translocació t(1;19)(q23;p13)** (Figura 16), que codifica la fusió *TCF3::PBX1*, defineix un subtipus de LLA-B present en el 5–6% de casos pediàtrics, i només en l'1% dels casos adults^{34,70}; sent més comú en afroamericans⁹⁶. Es relaciona amb un immunofenotip pre-B (CD19+/CD10+/CD33–/CD34–/slg–) i, majoritàriament, amb l'expressió de cadena pesada d'immunoglobulina citoplasmàtica, així com amb un nombre elevat de glòbuls blancs en sang perifèrica al diagnòstic^{70,97}.

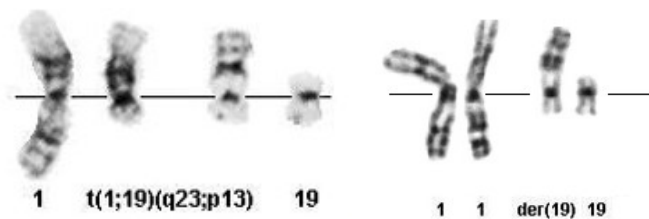


Figura 16. Imatge de la t(1;19)(q23;p13), que implica el reordenament de *TCF3::PBX1*, observada a l'estudi de cariotip. A l'esquerra, es mostra la translocació recíproca entre els cromosomes 1 i 19, mentre que a la dreta es veu la translocació desequilibrada amb el cromosoma derivatiu der(19)t(1;19), mantenint dos cromosomes 1 normals (fet que es produeix freqüentment en aquest subtipus de LLA-B⁹⁷). Imatge adaptada de l'*Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*⁸³.

Aquest subtipus havia estat històricament associat amb un mal pronòstic i un elevat risc de recaiguda del SNC⁶. L'ús de tractaments moderns adaptats al risc ha millorat significativament el pronòstic; per tant, l'estudi d'alguns factor pronòstics, com una MMR positiva després de la inducció o la infiltració testicular, és important per tractar adequadament aquests pacients⁹⁸.

LLA-B amb fusió *TCF3::HLF*

La translocació **t(17;19)(q22;p13)**, que dona lloc a la fusió ***TCF3::HLF***, defineix un subtipus rar de LLA (<1% de les LLA pediàtriques)^{34,70}. Es van determinar dos tipus de reordenaments possibles segons els exons implicats: translocació entre l'exó 13 de *TCF3* i l'exó 4 de *HLF*, associada amb un fenotip de coagulació intravascular disseminada greu; i la translocació entre l'exó 12 de *TCF3* i l'exó 4 de *HLF*, que indueixen un fenotip de hipercalcèmia severa^{99,100}. Aquesta fusió s'ha associat amb delecions intragèniques de *PAX5* i *VPREB1*, mutacions somàtiques en l'al·lel no translocat de *TCF3*, mutacions activadores en els gens de la via de senyalització RAS (*NRAS*, *KRAS* i *PTPN11*) i amb l'activació de la via de senyalització Notch. A més, es caracteritzen per l'expressió de marcadors de cèl·lules mare i mieloides¹⁰¹.

Els pacients amb LLA-B *TCF3::HLF* presenten un pronòstic extremadament desfavorable, ja que no responen a la quimioteràpia inicial i experimenten recaigudes primerenques (normalment dins dels dos anys posteriors al diagnòstic). Recerques preclíniques han identificat possibles teràpies dirigides, com la inhibició de *BCL2* o la inhibició de la cinasa Aurora A^{70,100}.

1.2.3.2. Leucèmia limfoblàstica aguda B-other

El 30% dels casos pediàtrics de LLA-B no presenten cap de les alteracions genètiques recurrents (veure apartat 1.2.3.1. *Leucèmia limfoblàstica aguda B amb alteracions genètiques recurrents*). Aquest subgrup, anomenat **B-other**, és àmpliament heterogeni, però amb l'anàlisi del transcriptoma complet i estudis d'agrupació de l'expressió gènica³⁴ es van poder descriure diferents perfil genètics definitoris. La identificació d'aquests és important ja que permeten una reassignació del pronòstic i del risc més precisa, sent rellevant en les noves teràpies adaptades al risc o en les teràpies dirigides.

LLA-B amb reordenament de *DUX4*

Els **reordenaments del gen *DUX4*** representen el 5-10% de les LLA-B^{34,70,79}, i es troben amb major freqüència en la població d'ascendència est-asiàtica⁹⁶. La translocació del gen provoca una sobreexpressió de la proteïna *DUX4* truncada, la qual provoca una desregulació transcripcional d'*ERG*¹⁰². El 50-70% dels casos amb reordenaments de *DUX4* presenten com esdeveniments secundaris delecions somàtiques de *ERG*⁸¹, una alteració restringida gairebé exclusivament a aquests subgrup de pacients^{103,104}. Els reordenaments de *DUX4* són citogenèticament críptics, generalment produïts per la inserció del gen en el locus de l'*IGH* o en un intró de *ERG*. La mida petita de les translocacions, la naturalesa repetitiva del gen *DUX4* i la seva localització subtelomèrica (en 4q/10q), són responsable de la dificultat en la identificació d'aquests reordenaments⁸¹.

Dins de les LLA-B amb reordenaments de *DUX4* s'han identificat dos grups amb expressió gènica diferent: un caracteritzat per alteracions en *ERG/TBL1XR1* i una elevada expressió de *NFATC4*; i l'altre associat amb mutacions en *NRAS*, *IKZF1* i *KMT2D* i sobreexpressió de *CEBPA/FLT3*⁵.

Les LLA-B amb reordenaments de *DUX4* presenten un perfil d'immunofenotip distintiu amb expressió de CD2 i CD371. A nivell genètic també s'associen a delecions de *IKZF1* (40%), però malgrat això, presenten un pronòstic molt favorable^{6,70}.

Actualment, la identificació fiable de la LLA-B amb aquests reordenaments requereix perfils d'expressió gènica o mètodes de seqüenciació de nova generació, els quals encara no són factibles per a estudis de cribratge a gran escala ni per a molts centres diagnòstics.

Com alternatives diagnòstiques, la detecció de CD371 a la superfície cel·lular mitjançant citometria de flux¹⁰⁵ o la detecció de la deleció d'*ERG*, poden ser bones aproximacions diagnòstiques. Tot i això, cal tenir en compte que, malgrat ser comuna, la deleció d'*ERG* és un esdeveniment secundari (sovint subclonal) que no està present en tots els casos; per tant, el seu estudi no permet diagnosticar un nombre rellevant de casos.

LLA-B amb reordenament de *MEF2D*

Els **reordenaments de *MEF2D*** es troben en l'1-4% de les LLA pediàtriques i en el 7-10% dels casos adults. Aquests reordenaments es caracteritzen per presentar característiques clíniques desfavorables, com ara una edat al diagnòstic més avançada (mediana que oscil·la entre els 9 i 14 anys) i un recompte elevat de glòbuls blancs. També mostren un perfil immunofenotípic distintiu, amb una expressió baixa o absent de CD10 i positiu per CD38; així com una major freqüència de deleccions de *CDKN2A/B* i, mutacions de *PHF6* i de la via de senyalització RAS (*NRAS*, *KRAS*, *NF1*, *PTPN11*)^{106,107}.

Fins ara, s'han descrit 11 gens de fusió associats amb *MEF2D*: *BCL9*, *BCL9L*, *CSF1R*, *DAZAP1*, *FOXJ2*, *HNRNPH1*, *HNRNPM*, *HNRNPUL1*, *PYGO2*, *SS18*, i *ARID1B*^{107,108}. Les reordenaments de *MEF2D* resulten en una activació augmentada de l'activitat transcripcional del gen i una expressió incrementada de HDAC9, i, en conseqüència, sensibilitat als inhibidors de les histones desacetilases¹⁰⁷.

Els pacients amb una fusió de *MEF2D* tenen un pronòstic desfavorable, amb alts nivells de MMR, una alta incidència de recaigudes primerenques i baixes taxes de supervivència^{70,108}.

LLA-B amb reordenament de *ZNF384*

Els reordenaments de *ZNF384* defineixen un subgrup de pacients present en l'1-6% dels casos de LLA-B pediàtrics i en un 5-15% dels casos adults^{70,81}, amb una freqüència més alta en pacients d'ascendència est-asiàtica⁹⁶. Habitualment, aquests casos presenten un immunofenotip distintiu: típicament LLA amb expressió baixa de CD10 i expressió aberrant dels marcadors mieloides CD13 i/o CD33; o leucèmia aguda de fenotip mixt B/mielode (MPAL), positiva per MPO^{109,110}. De fet, en el 48% dels casos de MPAL presenten

reordenaments de *ZNF384*¹¹¹. El fenotip ambigu del llinatge de la leucèmia amb reordenament de *ZNF384* pot canviar durant el curs de la malaltia, provocant la pèrdua de l'expressió CD19 i el fracàs teràpies CAR-T¹¹².

Fins ara, s'han identificat 19 socis de fusió diferents amb *ZNF384* en la LLA-B, com *AKAP8*, *ARID1B*, *ATP2C1*, *BMP2K*, *CLTC*, *CREBBP*, *DDX42*, *EHMT1*, *EP300*, *EWSR1*, *NCOA3*, *NIPBL*, *SMARCA2*, *SMARCA4*, *SPI1*, *SYNRG*, *TAF15*, *TCF3* i *TEX41*^{82,113,114}, sent els més comuns *EP300*, *TCF3* i *TAF15*³⁷. Totes les fusiones de *ZNF384* conserven tota la seva regió codificant, cosa que implica que les vies de senyalització de la resposta apoptòtica cel·lular, MAPK i JAK/STAT, estiguin significativament activades⁸². A més, fins al 60% dels pacients amb fusió de *ZNF384* mostren alteracions en molècules de senyalització com *NRAS* i *FLT3*, mentre que el 40% tenen mutacions epigenètiques, especialment en *SETD1B*, *CREBP* i *EZH2*⁸².

Aquesta alteració s'ha relacionat amb un pronòstic intermedi a favorable^{6,70,82}, tot i que aquest varia segons el soci de fusió: la fusió *EP300::ZNF384* està associada amb un resultat favorable, mentre que la fusió *TCF3::ZNF384* sovint s'associa amb recaigudes tardanes i un pronòstic desfavorable¹¹⁵.

LLA-B amb reordenaments de *NUTM1*

Els **reordenaments del gen *NUTM1*** s'observen en l'1-2% de les LLA-B pediàtriques, trobant-se amb més freqüència en infants menors d'un any que no presenten reordenaments de *KMT2A*. Els reordenaments de *NUTM1* defineixen un subtipus de LLA-B associat a un pronòstic favorable, tant en pacients pediàtrics com en infants menors d'un any¹¹⁶.

Les translocacions implicades en el reordenament de *NUTM1* poden ser visibles en el cariotip (s'observen alteracions en 15q14, on es localitza el gen) o críptiques segons el gen de fusió acompanyant. Per això, habitualment s'utilitzen tècniques de seqüenciació de l'ARN o FISH (amb sondes *break-apart*) per descartar la presència de reordenaments en aquest gen¹¹⁶. Fins ara, s'han identificat fusions de *NUTM1* amb gens que codifiquen diversos factors de transcripció i reguladors epigenètics, com *ACIN1*, *CUX1*, *AFF1*, *ATAD5*,

BRD9, *CHD4*, *IKZF1*, *BPTF*, *RUNX1*, *SLC12A6*, *ZNF618* i *KAT6A*^{34,82,114,116}. El gen concret amb el que es fusiona *NUTM1* varia segon l'edat de diagnòstic (Figura 17)¹¹⁶.

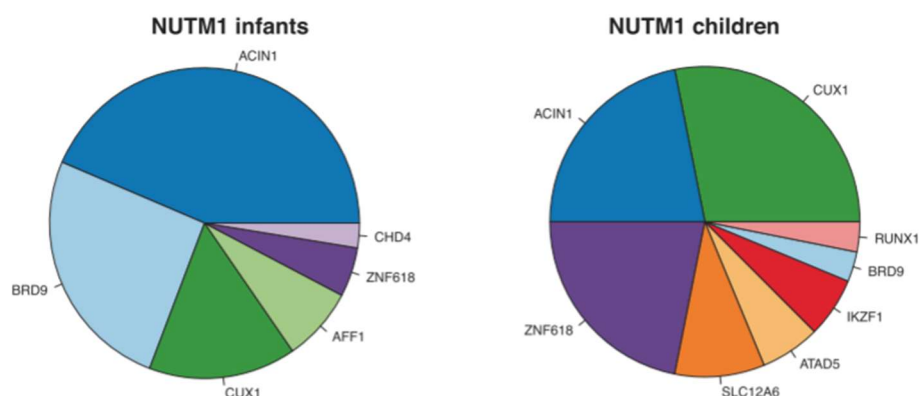


Figura 17. Diagrames amb els gens de fusió associats a *NUTM1* en funció de l'edat de diagnòstic de la malaltia. A l'esquerra es mostren els infants (<1 any) i a la dreta els casos pediàtrics (≥1 any). *Imatge extreta de Boer i col·laboradors*¹¹⁶.

En totes les fusions, es manté el domini NUT, i es pensa que això condueix a canvis globals en l'acetilació de la cromatina, així com a una sensibilitat als inhibidors de la histona deacetilasa o als inhibidors del bromodomini (especialment en les fusions amb *BRD9*)⁷⁰.

LLA-B amb reordenaments de *BCL2/MYC*

Les **alteracions cromosòmiques en *BCL2*, *MYC* i/o *BCL6*** 'associen comunament amb limfomes de cèl·lules B madurs agressius; no obstant això, també s'han observat en el 2-4% de LLA-B d'adults i, rarament, en LLA-B pediàtriques³⁷. Típicament els reordenaments d'aquest gens impliquen les immunoglobulines (*IGH*, *IGK* i *IGL*), i s'associen a respostes desfavorables als tractaments inicials i a resistència a la quimioteràpia^{34,82,117}.

Els **reordenament de *MYC*** (MYCr) són freqüentment la única alteració present, però també s'ha descrit que poden coexistir amb altres anomalies, com ara l'alta hiperdiploidia, reordenaments de *KMT2A*, *BCL2*, *BCL6*, *BCR::ABL1* i la iAMP21. Així mateix, també s'ha associat amb mutacions de *KRAS*.

És important tenir en compte que el *IG::MYC* pot causar confusió en el diagnòstic amb el limfoma/leucèmia de Burkitt, però s'ha demostrat que les LLA-B amb MYCr i els limfomes de cèl·lules B madures amb MYCr són genèticament diferents¹¹⁸. Les LLA-B es caracteritzen per no tenir mutacions en els gens IGVH, mentre que els limfomes mostren

signes d'hipermutació somàtica¹¹⁷. Tot i que l'expressió de marcadors com CD34 o TdT pot ajudar en el diagnòstic, no tots els casos presenten aquests marcadors. De fet, el diagnòstic pot ser encara més confús en pacients amb antecedents de limfoma de cèl·lules B madures, ja que aquests poden mostrar característiques immunofenotípiques d'immaduresa en cas de transformació. Per tant, s'hauria d'evitar el diagnòstic de LLA-B amb MYC en pacients amb aquests antecedents³⁷.

LLA-B amb alteracions de *PAX5*

La LLA-B amb **alteracions de *PAX5*** (*PAX5alt*) representa el 7-10% dels casos pediàtrics i s'associa amb un pronòstic intermedi, tot i que el pronòstic d'aquest subtipus és significativament pitjor que el de *PAX5 P80R*^{6,70,119}. Aquest subgrup inclou diverses alteracions de *PAX5*, com reordenaments, mutacions puntuals i amplificacions intragèniques focals:

- **Reordenaments:** s'han identificat més de 24 gens que es reordenen amb *PAX5* (p.ex., *AUTS2*, *CBFA2T3*, *DACH1*, *ETV6*, *FOXP1*, *NOL4L* i *ZNF521*)⁸². Les més freqüents són *ETV6* i *NOL4L*, que s'associen a les alteracions citogenètiques dic(9;12) i dic(9;20), respectivament³⁵.
- **Mutacions puntuals:** classifiquen els casos amb mutacions clonals (excepte *P80R*) i amb un VAF $\geq 35\%$, sense cap altra característica definitiva d'un altre subtipus³⁵. Habitualment s'han observat les mutacions de *PAX5* com *P32S*, *P34L*, *R38C/R38H* i *R140L/R140Q*^{82,119}. A més, més del 40% de les mutacions *PAX5* dins del subtipus *PAX5alt* són hemizigotes a causa de la pèrdua de l'al·lel *PAX5 wildtype*¹¹⁹.
- **Amplificacions intragèniques:** habitualment es produeixen per duplicacions internes en tàndem del exons 2–5³⁵. Sovint presenten pèrdues homozigotes *CDKN2A/B* i trisomia dels cromosoma 5¹¹⁹.
- **Altres:** les pèrdua de *PAX5*, junt amb la pèrdua bial·lèlica de *CDKN2A/B* i anomalies de *MTAP* (CNV o variants estructurals), en absència d'altres anomalies genètiques definidores de subtipus, s'ha associat al mateix perfil d'expressió gènica de *PAX5alt*³⁵.

A més, els casos amb *PAX5*alt presenten altres alteracions com deleccions que afecten gens de regulació del cicle cel·lular (*CDKN2A*, *RB1* i *BTG1*), gens de desenvolupament de cèl·lules B (*IKZF1*, *VPREB1* i *BTLA*), reguladors transcripcionals (*ZFP36L2*, *ETV6* i *LEF1*) i/o modificadors epigenètics (*KDM6A*, *KMT2A* i *ATRX*). S'observa un enriquiment de gens que codifiquen per reguladors de la senyalització dels receptors de citocines (com *PDGFRB* i *FLT3*), consistent amb l'elevada freqüència de mutacions de la via de senyalització RAS presents en aquest subtipus³⁴.

LLA-B amb mutació *PAX5* P80R

La mutació *missense* *PAX5* P80R (p.Pro80Arg) és la mutació més freqüent identificada en aquest gen¹¹⁹ i defineix un nou subtipus de pacients amb un perfil d'expressió gènica únic^{34,37,120}. Aquest subtipus representa aproximadament el 2% de la LLA-B pediàtrica⁶ i es caracteritza per presentar alteracions bial·lèliques de *PAX5*, deleccions homozigotes de *CDKN2A/B* i mutacions activadores en la via de senyalització de RAS¹²¹. Les alteracions bial·lèliques del gen es produeixen mitjançant deleccions, pèrdua d'heterozigositat o mutacions a l'altre al·lel de *PAX5*¹¹⁹. *PAX5* és un factor de transcripció imprescindible en el desenvolupament i manteniment de les cèl·lules del llinatge B, per la qual cosa, les alteracions del gen produeixen un decreixement d'aquesta activitat reguladora i desencadenen l'aparició de neoplàsies B¹¹⁹.

S'ha informat de diversos riscos en diferents cohorts, i, tot i que majoritàriament s'ha associat a un pronòstic intermig-favorable, el pronòstic d'aquesta entitat encara no està del tot definit^{6,119,120}. També s'ha observat freqüentment un canvi precoç al llinatge monocític i pèrdua del immunofenotip de cèl·lules B¹²².

LLA-B amb mutació *IKZF1* N159Y

Una mutació heterozigota en *IKZF1* N159Y (p.Asn159Tyr), mantenint l'expressió de l'al·lel d'*IKZF1* no mutat, defineix un nou subtipus de LLA que representa <1% dels casos^{6,34}. El perfil d'expressió gènica és molt diferent en comparació amb altres casos de LLA-B, incloent-hi altres casos amb alteracions d'*IKZF1*³⁴.

Les alteracions somàtiques d'*IKZF1* són un segell distintiu de LLA-B d'alt risc amb poca resposta a la teràpia⁸². *IKZF1* és un factor de transcripció crític relacionat amb la diferenciació i maduració del precursor cel·lular hematopoietic. La mutació en N159 es troba al domini d'unió a l'ADN d'*IKZF1*; s'ha demostrat que aquesta mutació *missense* pertorba la funció normal de la proteïna, amb una localització nuclear errònia i una inducció de l'adhesió intercel·lular aberrant, que és característica de moltes alteracions d'*IKZF1*³⁴.

Aquest subtipus es relaciona amb guanys del cromosoma 21³⁷ i amb l'expressió augmentada de gens implicats en l'oncogènesi (*YAP1*), la remodelació de la cromatina (*SALL1*) i factors de senyalització (*ARHGEF28*). També presenten recurrentment mutacions de *KRAS* i la senyalització del receptor de cèl·lules B; així mateix, les vies de senyalització JAK/STAT (especialment els gens *FLT3*, *FLT4* i *STAT5*) estan regulades a la baixa en pacients amb *IKZF1* N159Y^{34,82}.

Actualment el nombre de pacients descrits i publicats amb *IKZF1* N159Y és molt limitat. Són necessaris més estudis per poder determinar les característiques d'aquest nou subtipus de pacients, tot i que actualment s'associa a un pronòstic intermig³⁷.

LLA-B amb mutació *ZEB2* H1038R/*IGH::CEBPE*

S'ha definit un nou subgrup de pacients amb LLA-B amb un perfil genètic característic, que presenta alhora la **fusió *IGH::CEBPE*** i la **mutació *ZEB2* H1038R**^{37,123}. No obstant això, aquestes alteracions no són úniques i exclusives d'aquest grup, ja que també es poden trobar per si soles en altres subtipus de LLA^{70,124}. La coexistència de *ZEB2* H1038R/*IGH::CEBPE* representa <1% de les LLA-B³⁷ i sovint s'acompanya de mutacions de *NRAS* (>50% dels casos), sobreexpressió de *LMO1* i subregulació de *SMAD1* i *BMP2*^{37,82}. Tot i que les sèries són limitades, sembla que s'associen a un pronòstic desfavorable³⁷.

LLA-B amb reordenaments de *UBTF::ATXN7L3/PAN3,CDX2*

S'ha identificat un nou subtipus de LLA-B que presenten un perfil genètic molt concret, associat amb una deleció focal *downstream* de *PAN3* (13q21.2), que resulta en la **desregulació de *CDX2***; i una microdeleció del exons 18-21 de *UBTF* (17q21.31), que resulta en la **fusió *UBTF::ATXN7L3***^{36,125}.

Aquests pacients mostren una alta expressió de *NTRK3*, reordenament o una expressió elevada de *PAX5*³⁶, guanys en 1q i mutacions activadores de *CXCR4*¹²⁵. Presenten un fenotip pro-B, caracteritzat per l'absència de CD10 i CD20. Els pacients són més freqüentment adults joves, amb una edat mitjana de 35 anys (rang 12-70 anys), i majoritàriament de sexe femení. S'associen amb un alt risc, presentant resistència al tractament i elevades taxes de recaiguda^{36,125}.

LLA-B amb característiques *ZNF384-like*

Els casos ***ZNF384-like*** es defineixen per presentar una signatura d'expressió gènica molt similar a la dels reordenaments de *ZNF384*, però sense fusions d'aquest gen. S'han descrit reordenaments de *ZNF362* en alguns casos, habitualment amb *SMARCA2* i *TAF15*. Tant les LLA amb reordenaments de *ZNF384* com amb *ZNF384-like* presenten aquests gens de fusió, així com les mutacions en *ZEB2*, *CREBBP* i *SETD1B*⁸². Representen <1% de las LLA-B³⁴ i s'associen a un pronòstic intermedi^{70,126,127}. Pel que fa a les característiques clíniques i biològiques, aquests casos presenten l'expressió de marcadors mieloides com CD13 i CD33; també s'ha observat que expressen CD66c, un marcador que poques vegades s'expressa a la LLA amb reordenaments de *ZNF384*. A més, s'han detectat alguns casos *ZNF384-like* amb expressió febles del marcador CD10^{37,128}.

LLA-B amb característiques *KMT2A-like*

Els casos de ***KMT2A-like*** presenten un perfil genètic similar als casos amb reordenament de *KMT2A*, però sense el reordenament d'aquest gen. S'han descrit fusions de gens *MED12::HOXA9* i *AFF1::TMEM156*³⁴. Els casos de LLA-B *KMT2A-like* són rars (<1%) i el pronòstic encara no s'ha pogut definir, ja que les series de casos són molt curtes^{34,123}.

1.2.3.3. Alteracions genètiques secundàries en la LLA-B

La leucèmia limfoblàstica aguda es caracteritza per l'adquisició seqüencial d'alteracions genètiques que impulsen la iniciació i el manteniment del clon leucèmic. Les **anomalies primàries**, com les translocacions cromosòmiques i aneuploïdies, són esdeveniments iniciadors que defineixen les característiques clau de la leucèmia i estan presents en totes les cèl·lules leucèmiques. Per contra, les **anomalies secundàries**, com les CNV i les mutacions puntuals, solen estar presents en un subconjunt de les cèl·lules leucèmiques (subclonals) i poden ser adquirides durant la progressió de la malaltia^{129,130}. La prevalença, el gen i el tipus d'alteració varien entre subtipus i tenen diferents rellevàncies pronòstiques (Figura 18)^{131,132}.

Tanmateix, en la majoria dels casos, les anomalies primàries són responsables de la iniciació del clon pre-leucèmic, però aquest es pot mantenir latent durant anys, sent insuficient per al desenvolupament de la leucèmia. Així, l'adquisició d'esdeveniments genètics secundaris cooperants són els desencadenants de la transformació i manifestació de la leucèmia⁷⁶.

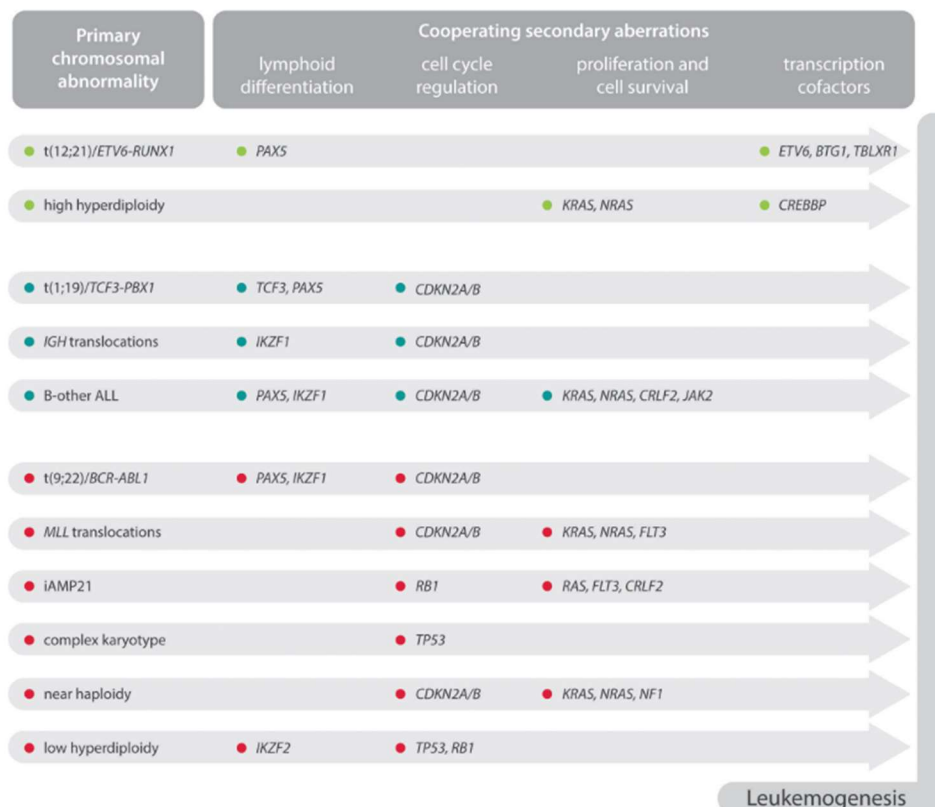


Figura 18. Visió general dels esdeveniments cooperatius secundaris associats a cada subtipus genètic de la LLA-B, classificats en funció del risc: pronòstic favorable (verd), intermedi (verd fosc-turquesa) i desfavorable (vermell). *Imatge extreta de Moorman¹²⁹.*

Les alteracions secundàries més comuns en la LLA pediàtrica són CNV no aleatòries, majoritàriament delecions, que poden ser des de pèrdues d'exons simples fins a regions grans i visibles citogenèticament. Els gens més freqüentment afectats inclouen factors de transcripció limfoide (*IKZF1*, *PAX5*, *EBF1*), reguladors del cicle cel·lular i supressors de tumors (*CDKN2A/B* i *RB1*), reguladors de l'apoptosi, regulació transcripcional i coactivació (*ETV6*, *ERG*), reguladors de la senyalització limfoide (*BTLA* i *CD200*), modificadors de la cromatina (*CREBBP*, *SETD2*, *EZH2* i *NSD2*) i alteracions epigenètiques^{130,131,133}. Així, les vuit regions més freqüentment delecionades en la LLA pediàtrica són:

- *EBF1* (5q33.3): les delecions d'*EBF1* s'associen a nivells més alts de MMR després de la teràpia d'inducció i a un risc més elevat de recaiguda⁴¹.
- *IKZF1* (7p12.2): les delecions es produeixen en un 15% dels casos de LLA pediàtrica i en un 30% dels casos adults; i són encara més prevalents en pacients amb *BCR::ABL1* i *BCR::ABL1-like*¹²⁹. Les alteracions d'*IKZF1* estan associades a un augment del risc de recaiguda¹³⁴, sent un factor pronòstic negatiu en la majoria de leucèmies (sobretot *BCR::ABL1* i *BCR::ABL1-like*), però no en les LLA amb reordenaments de *DUX4*^{42,135}. En absència de delecions d'*ERG* i en combinació amb delecions de *CDKN2A/B*, *PAX5* i *PAR1*, les delecions d'*IKZF1* (**perfil IKZF1-plus**) s'associen a un pronòstic molt desfavorable¹³⁵.
- *CDKN2A/CDKN2B* (9p21.3): les delecions de *CDKN2A/B* s'observen en un 15-35% de la LLA-B pediàtrica, sent més freqüent en la LLA-B d'adults (30-45%) i encara més freqüent en la LLA-T (50-81%)¹³⁶. Habitualment es troben en pacients d'alt risc; i les delecions homozigotes de *CDKN2A/B* són més prevalents en la recaiguda que en el diagnòstic¹³⁷.
- *PAX5* (9p13.2): les delecions de *PAX5* estan presents en un 30% dels casos de LLA-B i fins en un 50% dels casos de LLA *BCR::ABL1*^{44,82}; en general s'associen a pronòstics desfavorables³⁸.
- *ETV6* (12p13.2): les delecions d'*ETV6* són freqüents en la LLA-B (51%)¹³², especialment en els casos d'*ETV6::RUNX1*. El pronòstic que confereixen les delecions de *ETV6* varien segon l'anomalia genètica primària, per exemple, en els

casos d'*ETV6::RUNX1* s'associen en un millor pronòstic (alta sensibilitat al tractament amb vincristina)⁴¹.

- ***BTG1*** (12q21.33): les delecions de *BTG1* són més freqüents en els casos de LLA d'alt risc (p.e. *BCR::ABL1*), així com en les LLA amb *ETV6::RUNX1*, i sovint es combinen amb altres delecions^{138,139}. A més, es detecten amb alta freqüència en pacients amb LLA i síndrome de Down¹⁴⁰.
- ***RB1*** (13q14.2): les delecions de *RB1* són més freqüents en casos de LLA d'alt risc i sovint coexisteixen amb altres canvis en el nombre de còpies, especialment *iAMP21*^{41,132,138}.
- **Regió *PAR1*** (Xp22.33/Yp11.32): aquesta regió està composta per *SHOX*, *CRLF2*, *CSF2RA*, *IL3RA* i *P2RY8*. Les delecions de *CSF2RA/IL3RA* són freqüents en la LLA (7% dels casos de LLA; fins al 55% en la LLA associada a la síndrome de Down); donant lloc a la fusió *P2RY8::CRLF2*¹⁴¹.

En base a el perfil de CNV d'aquests vuit gens, es van definir el **perfil CNA-UKALL**⁴², el qual s'aplica en l'estratificació de risc en els protocols més moderns. Aquest perfil separa els pacients en diferents subgrups segons els resultats de l'evolució de la malaltia: pronòstic favorable (casos sense delecio de cap del gens estudiats, amb delecio aïllada en *ETV6/PAX5/BTG1*, i amb delecio en *ETV6* acompanyada per un delecio en *BTG1/CDKN2A/B/PAX5*) o pronòstic desfavorable (casos amb delecions aïllades de *IKZF1/RB1/PAR1*, i delecions de *IKZF1/PAX5/CDKN2A/B*)⁴².

En les **recaigudes de la LLA**, les alteracions primàries habitualment es mantenen, mentre que la majoria mostren noves alteracions genètiques secundàries o, sovint, enriquiments d'alteracions que es trobaven en un clon menor en el diagnòstic. Les alteracions adquirides més comunes en la recaiguda inclouen mutacions en el gen *CREBBP* (20% de les LLA recaigudes; redueixen la sensibilitat a la teràpia amb glucocorticoides) i en *NT5C2* (confereixen una major resistència als anàlegs de purina). També s'observen delecions de *MSH6* i *NR3C1*, així com mutacions en *SETD2*, *KDM6* i *MLL2*. D'altra banda, les mutacions en la via RAS sovint són seleccionades o adquirides durant el tractament i, per tant, predominen en el clon leucèmic de la recaiguda, associant-se a un mal pronòstic¹³⁰.

1.3. Tractament de la leucèmia limfoblàstica aguda

Els pacients pediàtrics amb leucèmia limfoblàstica aguda solen rebre un tractament que s'ajusta a grups de risc definits per característiques clíniques i biològiques. La intensitat i la durada de la teràpia varia segons el subgrup de LLA, amb tractaments menys intensius per als pacients amb alt potencial de curació i tractaments més intensius per als pacients amb menor probabilitat de supervivència a llarg termini, malgrat el risc de major toxicitat associada^{28,142,143}.

Fins ara, a Espanya, la Societat Espanyola d'Hematologia i Oncologia Pediàtrica (SEHOP) tracta els casos pediàtrics de LLA amb la guia de tractaments **SEHOP-PETHEMA 2013**³². Aquesta classifica els pacients en diferents grups de risc basant-se en factors clínics com l'edat i el recompte de glòbuls blancs (GB) al diagnòstic, les característiques de les cèl·lules leucèmiques i la resposta al tractament mitjançant la detecció de la malaltia residual mesurable (MMR) al final de la inducció, i en alguns casos, en moments posteriors. També és important l'estatus d'afectació del SNC, definit en funció de les troballes clíniques, d'imatge, i la citomorfologia del líquid cefalorraquidi (LCR):

- I. SNC-1: absència de blasts en LCR.
- II. SNC-2: blasts en LCR amb menys de 5 leucòcits/ μ l i/o punció lumbar traumàtica (>10 eritròcits/ μ l) o hemorràgica amb blasts.
- III. SNC-3: blasts en LCR amb més de 5 leucòcits/ μ l i/o afectació de pars cranials i/o massa tumoral en el cervell o meninges detectat a través d'imatges.

Així doncs, els grups de risc del protocol SEHOP-PETHEMA 2013 es classifiquen segons tots aquests factors de la següent manera:

Risc estàndard - Pacients que reuneixin tots i cadascun dels següents criteris:

- Edat entre 1 i 10 anys.
- Recompte de GB $<20 \times 10^9/L$ al moment del diagnòstic.
- Citogenètica amb alta hiperdiploidia (51-67 cromosomes) amb índex de DNA 1,16-1,48 o t(12;21)/ETV6::RUNX1 positiva.

- Presència de <1.000 blasts/ mm^3 en sang perifèrica el dia +8 de la inducció; i $<5\%$ de blasts i $<0,1\%$ de MMR en MO el dia +15 de la inducció.
- No tenir:
 - Immunofenotip tipus T.
 - Infiltració leucèmica en el SNC o en els testicles.
 - Característiques genètiques adverses, com $t(9;22)(q34;q11.2)/BCR::ABL1$; $t(1;19)(q23;p13)/TCF3::PBX1$; reordenaments de *KMT2A* o hipodiploidia (<44 cromosomes).

Risc intermedi - Pacients que no compleixin els criteris de risc estàndard o alt.

Alt risc - Pacients que compleixin qualsevol dels següents criteris:

- Pacients $t(9;22)(q34;q11.2)$ o fusió *BCR::ABL1*.
- Lactants amb $t(4;11)(q21;q23)$ o reordenaments de *KMT2A*.
- Hipodiploidia (<44 cromosomes) o índex de DNA $<0,81$.
- Presència de ≥ 1.000 blasts el dia +8 de la inducció en sang perifèrica; $>25\%$ de blasts i $>10\%$ de MMR en MO en dia +15 de la inducció.

A partir de l'assignació del risc, tots els pacients es sotmeten a la teràpia convencional de la LLA, que es basa en un tractament inicial, anomenat **tractament d'inducció**, amb quimioteràpia intensiva. Després, segueix un **tractament de consolidació**, i finalment, un **tractament de manteniment** que consisteix en una quimioteràpia d'intensitat baixa basada en medicació oral que permet, en la majoria dels casos, fer una vida pràcticament normal. En els casos on el risc de recaiguda sigui més alt (pacients d'alt risc), en lloc d'un tractament de manteniment es pot optar per realització d'un trasplantament de progenitors hematopoètics³².

La supervivència en aquests pacients ha millorat progressivament gràcies a l'efectivitat dels nous règims de quimioteràpia multifarmacològica, l'estratificació de la intensitat de tractament segons el grup de risc, i a l'aparició de nous tractaments. Com a resultat, la taxa de supervivència a llarg termini en pacients pediàtrics amb LLA ha passat de menys de 10% a la dècada de 1960 al $85-90\%$ en l'actualitat^{142,144}. No obstant això, s'ha arribat a un punt en què augmentar la dosi de les teràpies citotòxiques tradicionals ja no millora la supervivència, sinó que augmenta els efectes adversos, com ara la cardiotoxicitat

associada a l'ús d'antraciclins, el deteriorament cognitiu causat per la radiació cranial, la desregulació neuroendocrina i la morbiditat relacionada amb el trasplantament; tot això tenint un impacte de llarga durada en la qualitat de vida dels supervivents. En resposta a aquestes limitacions, la recerca s'ha centrat en desenvolupar tractaments menys tòxics, més segurs i més efectius; com la **medicina de precisió** i la **immunoteràpia**. La medicina de precisió consisteix en l'administració d'un tractament dirigit i personalitzat per a cada pacient, tenint en compte les alteracions genètiques específiques; un exemple és l'imatinib, que actua com a inhibidor de la tirosina cinasa (TKi) en pacients amb el cromosoma Filadèlfia (per la fusió *BCR::ABL1*). Per altra banda, la immunoteràpia es basa en tractaments que potencien el sistema immunitari del pacient perquè aquest pugui lluitar contra les cèl·lules cancerígenes. Això inclou teràpies amb anticossos o teràpies cel·lulars, com els limfòcits CAR-T, que són limfòcits T del propi pacient modificats genèticament per reconèixer i destruir les cèl·lules B leucèmiques^{28,145,146}.

Malgrat la millora en la supervivència, un 15-30% dels pacients solen recaure després d'assolir la remissió completa durant els primers 5 anys des del diagnòstic¹⁴⁷. D'aquests, només el 50% dels nens amb la primera recaiguda de la LLA sobreviuen a llarg termini; i els resultats són molt pitjors amb la segona o posterior recaiguda¹⁴².

1.4. Tècniques citogenètiques i moleculars aplicades a l'estudi de la LLA

Com hem vist, la leucèmia limfoblàstica aguda presenta una gran heterogeneïtat genètica. A la pràctica clínica, la identificació del subtipus genètic és crucial per determinar biomarcadors diagnòstics, pronòstics i predictius de la resposta al tractament.

Per detectar totes aquestes alteracions genètiques presents en las LLA, s'utilitza una combinació de diferents **tècniques citogenòmiques**: citogenètica, FISH (hibridació *in situ* fluorescent), qPCR (reacció en cadena de la polimerasa a temps real), MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), arrays genòmics i seqüenciació massiva, entre d'altres. Cadascuna d'aquestes tècniques presenta especificacions particulars (Taula 7) que permeten el diagnòstic precís de les anomalies genètiques.

Taula 7. Resum de les tècniques citogenòmiques aplicades al diagnòstic genètic de les neoplàsies hematològiques. Adaptada de Duncavage i col·laboradors¹⁴⁸.

Tècnica	CG	FISH	Arrays	OGM	NGS	RNA-Seq
Cèl·lules viables	Si	No	No	No	No	No
Resolució	5-10Mb	100-200kb	20-100kb	5-50kb	1pb	1pb
Cobertura	Genoma	Dirigida	Genoma	Genoma	Genoma, Exoma, dirigida	Genoma, dirigida
Alteracions	VE, CNV	VE, CNV	CNV, LOH	VE, CNV	VE, CNV, SNV, indel, LOH	Expressió gènica, VE
Sensibilitat (VAF)	5-10%	1-5%	30%	5%	2-10%	5%
Temps (dies)*	2-14	1-3	3-14	5-14	5-14	5-14
Cost*	€	€	€€	€€€	€€€	€€€
Ús global*	Alt	Alt	Baix	Baix	Mig	Baix

CG: citogenètica; CNV: variació en el nombre de còpies; FISH: hibridació *in situ* fluorescent; indel: insercions i delecions; LOH: pèrdua d'heterogozitat; NGS: seqüenciació massiva de nova generació; OGM: *Optical Genome Mapping*; RNA-seq: seqüenciació de l'ARN (transcriptoma); SNV: variants d'un únic nucleòtid; VE: variants estructurals.

* El temps que es triga en tenir un resultat, el cost i l'ús és aproximat; depèn de cada laboratori.

1.4.1. Citogenètica convencional

L'anàlisi citogenètic es basa en l'**estudi del cariotip**, és a dir, del procés d'aparellament i ordenació de tots els cromosomes d'un organisme segons la seva mida i el patró de bandes, proporcionant una imatge del genoma complet de l'individu. Els cariotips es preparen mitjançant procediments de tinció estandarditzats (generalment bandes G), que generen patrons de bandes característiques per als diferents cromosomes segons les seves característiques estructurals (Figura 19). Es generen bandes més fosques o més clares (les regions més fosques són riques en A-T i les bandes més clares són riques en G-C), amb una resolució de 5-10 Mb que inclou centenars de gens. Això permet detectar canvis en el nombre de cromosomes o canvis estructurals, com delecions, duplicacions, translocacions o inversions¹⁴⁹.

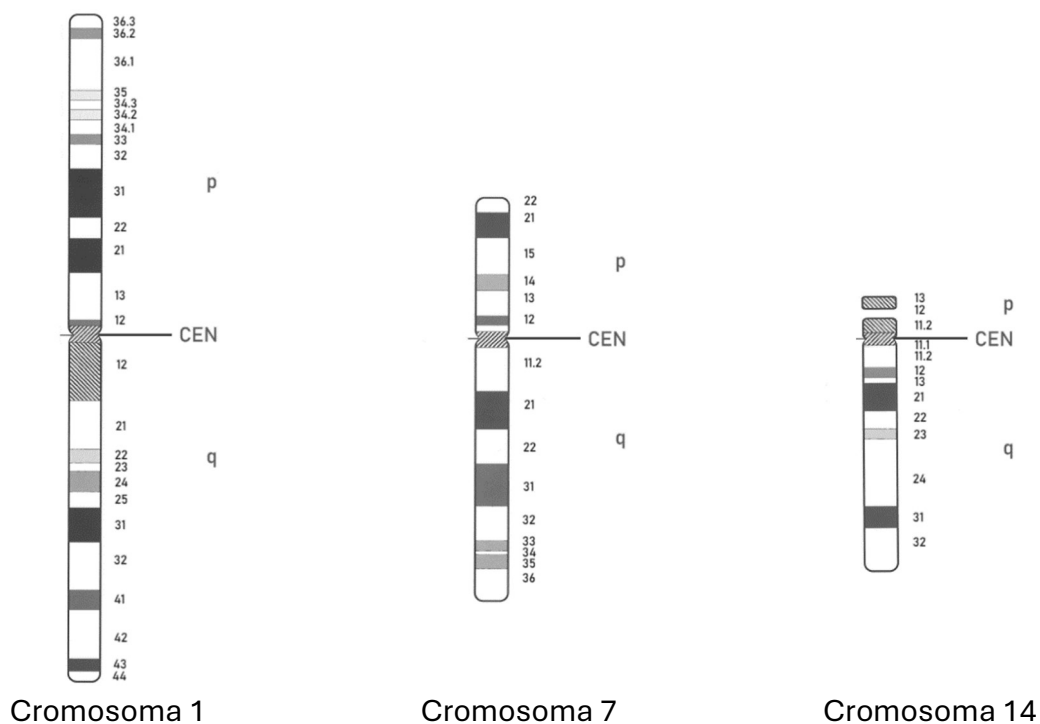


Figura 19. Exemple d'ideograma amb bandes G de diversos cromosomes, on es mostren el cromosoma 1 (metacèntric), el 7 (submetacèntric) i el 14 (acrocèntric). *Imatge adaptada de l'ISCN¹⁵⁰.*

El cariotip humà es compon de 23 parells de cromosomes, dels quals 22 són autosomes i els altres corresponen als cromosomes sexuals X i Y. Es considera que un cariotip és normal quan s'analitzen un mínim de 20 metafases sense alteracions. Així mateix, per confirmar que una alteració és clonal, s'han de trobar dues o més metafases amb els

mateixos guanys de cromosomes o alteracions estructurals, i tres o més metafases amb monosomies de cromosomes. La nomenclatura emprada per descriure els cariotips, tant normals com patològics, ha estat estandarditzada a nivell internacional segons l'ISCN¹⁵⁰.

Així, l'estudi de cariotip continua sent un dels mètodes més utilitzats per avaluar anomalies cromosòmiques, ja que és una tècnica sensible i específica que ofereix informació global del genoma en un sol anàlisi, cèl·lula a cèl·lula. No obstant això, presenta algunes limitacions: la necessitat de cèl·lules vives (teixit fresc) i cultivables, la baixa resolució (no detecta indel <5 Mb o reordenaments críptics) i la baixa sensibilitat (detecta anomalies presents en el 5-10% de les cèl·lules). A més, requereix personal altament qualificat i format per a la seva interpretació¹⁴⁸.

1.4.2. Hibridació *in situ* fluorescent (FISH)

La **hibridació *in situ* fluorescent (FISH)** és un procediment que permet localitzar seqüències d'ADN específiques en els cromosomes. Sovint s'utilitza per complementar l'anàlisi del cariotip i detectar anomalies genètiques concretes, i es pot aplicar tant en cèl·lules en divisió cultivades (metafase) com en cèl·lules fixades (interfase). La FISH es basa en la hibridació molecular, de manera que requereix d'un pas de desnaturalització que permet la formació de nous enllaços d'hidrogen entre l'ADN del pacient (objectiu) i les seqüències d'ADN marcades amb fluorescència (sondes). Així, la sonda s'hibrida específicament amb la seva seqüència complementària en el genoma, i aquest híbrid es pot detectar mitjançant un microscopi de fluorescència¹⁵¹.

En general, hi ha tres tipus de sondes, cadascuna amb un rang diferent d'aplicacions: sondes de locus específic, sondes de seqüències repetitives (centròmers i telòmers) i sondes per al pintat de cromosomes complets (Figura 20). Aquest últim grup és particularment útil per detectar reordenaments estructurals com ara translocacions, inversions o delecions cromosòmiques específiques.

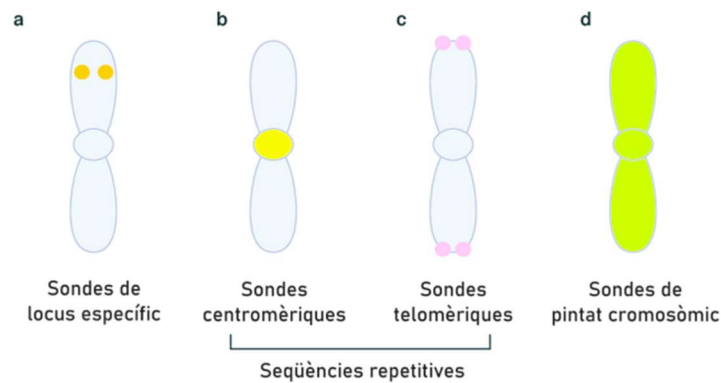


Figura 20. Esquema dels principals tipus de sondes emprades en l'estudi de neoplàsies hematològiques. a) Hibridació de les sondes de seqüència única i específica de locus; b) Hibridació de les sondes centromèriques; c) Hibridació de les sondes telomèriques; d) Hibridació de sondes de pintat cromosòmic. *Imatge adaptada de Mitrakos i col·laboradors¹⁵².*

Les sondes específiques de locus poden classificar en:

Sondes de doble fusió (*dual-fusion*): s'utilitzen per detectar translocacions recurrents que involucren dos gens coneguts. Cadascun d'aquests gens es marca amb una sonda específica, amb fluorocroms de colors diferents. En cèl·lules normals (sense la fusió), es veuran dues senyals per cada color separades; mentre que en cèl·lules patològiques s'observaran dues senyals de fusió i una senyal de cada color, corresponents als al·lels translocats i els al·lels *wildtype* (Figura 21). També permet detectar altres patrons variants (p.ex., delecions dels gens estudiats).

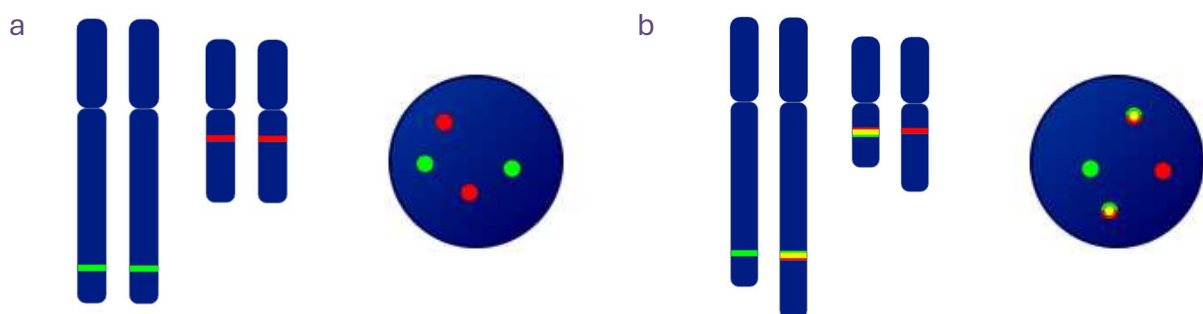


Figura 21. Representació de la hibridació d'una sonda de locus específic de doble fusió sobre cromosomes en metafase i nucli en interfase. a) Patró d'hibridació normal, amb dues senyals verdes i vermelles; b) Patró alterat, amb dues senyals de fusió (groques), una vermella i una verda.

Sondes de trencament (*break-apart*): s'utilitzen en gens que habitualment estan involucrats en molts reordenaments diferents, és a dir, aquells que es poden associar amb múltiples gens per produir diferents translocacions relacionades amb el càncer. En lloc d'utilitzar una sonda específica per a un reordenament concret, s'utilitza una sonda

que indica si el gen d'interès està involucrat en alguna fusió, encara que no reveli amb quin altre gen s'ha reordenat exactament. Un extrem del gen està marcat amb un fluorocrom de color de vermell i l'altre extrem s'etiqueta amb un fluorocrom de color verd. Si el gen no està translocat, es veurà com una senyal fusionada verd-vermell (grogues); mentre que si es produeix una translocació, el gen es parteix i es veurà una senyal vermella i una senyal verda separades (Figura 22).

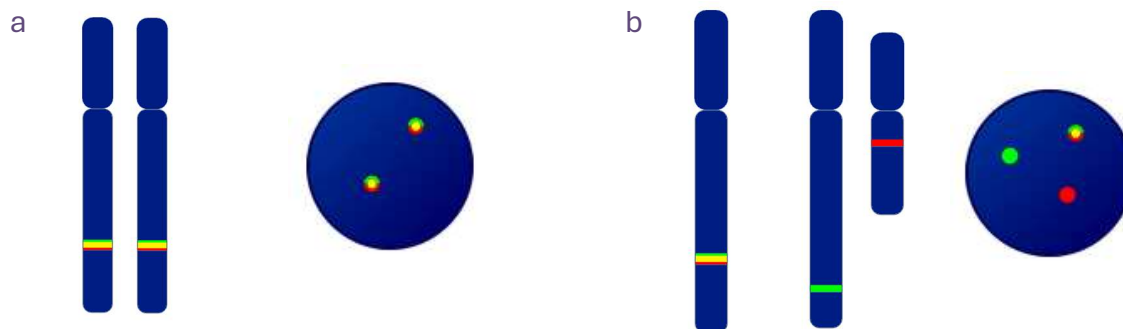


Figura 22. Representació de la hibridació d'una sonda de locus específic de trencament (*break-apart*) sobre cromosomes en metafase i nuclis en interfase. a) Patró d'hibridació normal, amb dues senyals de fusió verd-vermell (grogues); b) Patró alterat, amb una senyal de fusió (grogues), una vermella i una verda.

En resum, les sondes FISH només poden identificar esdeveniments genòmics en regions específiques, però són més sensibles que la citogenètica (detecta anomalies presents en un 1-5% de les cèl·lules) i poden detectar anomalies críptiques que no es poden descriure en l'estudi de cariotip¹⁴⁸.

1.4.3. Microarrays cromosòmic

Un **microarray cromosòmic (CMA)** és capaç de detectar variacions en el nombre de còpies (CNV), polimorfismes de nucleòtid únic (SNPs), anomalies cromosòmiques desequilibrades, regions de pèrdua d'heterozigositat (LOH) i perfils d'expressió gènica.

El procediment dels CMA es basa en la utilització de xips sobre els quals es fixen milers de fragments d'ADN coneguts, en posicions específiques, i aquests actuen com a sondes que poden hibridar-se amb seqüències d'ADN complementàries. El procés implica l'extracció i l'etiquetatge de l'ADN de les cèl·lules que es volen analitzar, la hibridació d'aquest ADN marcat amb les sondes del xip, i un rentat posterior per eliminar l'ADN no unit específicament. El xip s'examina mitjançant un escàner que detecta l'etiquetatge

(normalment senyals de fluorescència): la intensitat del senyal en cada punt del xip correspon a la quantitat d'ADN que s'ha unit a les sondes en aquell lloc, permetent així la identificació de l'expressió gènica o la presència de variacions genètiques^{153,154}.

Els CMA poden detectar anomalies a tot el genoma, es realitzen a partir d'ADN tumoral sense necessitat de cèl·lules vives i poden detectar petites anomalies (20-100 kb) presents en un 20-30% de les cèl·lules tumorals. Malgrat això, no detecten reordenaments equilibrats i, a diferència del cariotip, no poden distingir canvis que es produeixen en clons separats¹⁴⁸.

1.4.4. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA)

El ***Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA)** és una tècnica semi-quantitativa que s'utilitza per determinar el nombre de còpies relatives de fins a 60 seqüències d'ADN en una única reacció basada en la reacció en cadena de la polimerasa (PCR). Aquesta tècnica permet detectar CNV específiques, incloent esdeveniments que afecten un únic exó, però requereix una infiltració mínim del 20-30% de cèl·lules patològiques¹⁵⁵.

La procediment del MLPA consta de diverses etapes: primer es realitza una desnaturalització, seguida d'una reacció d'hibridació, i després es produeix la lligació de les sondes a la regió d'interès. Aquestes sondes seran posteriorment amplificades per PCR i analitzades mitjançant una anàlisi de fragments. Aprofitant la diferència de mida de cadascuna de les sondes, es poden identificar canvis en el nombre de còpies (Figura 23)¹⁵⁶. S'utilitzen sondes de dos oligonucleòtids que reconeixen llocs adjacents de l'ADN i que contenen una seqüència universal que permet l'amplificació simultània per PCR de totes les sondes amb només una parella d'encebadors. A més, un dels oligonucleòtids conté una seqüència de longitud variable (seqüència *stuffer*), que permet fer l'anàlisi de diverses regions genòmiques alhora, ja que la diferència de mida permetrà la separació dels fragments amplificats durant l'electroforesi (Figura 23). L'encebador de PCR està

marcat amb fluorescència, cosa que permet visualitzar els productes d'amplificació per la separació de fragments en un instrument d'electroforesi capil·lar.

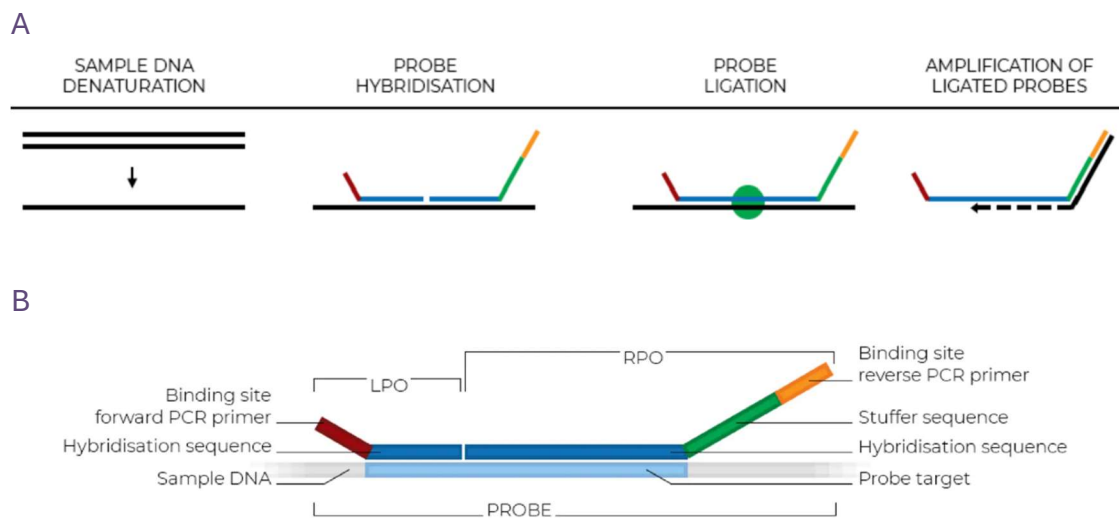


Figura 23. Esquema del procediment MLPA i del disseny de les sondes utilitzades. (A) Passos del procediment MLPA: desnaturalització del DNA, hibridació de les sondes, lligació i amplificació. (B) Disseny de les sondes utilitzades en el procediment MLPA, que consisteixen en dos oligonucleòtids que reconeixen seqüències adjacents de l'ADN, una seqüència universal que permet la PCR i una regió "stuffer" que facilita la diferenciació entre les diferents sondes en un mateix estudi gràcies a la diferència de mida final del producte amplificat. *Imatge adaptada del protocol de MCR Holland¹⁵⁶.*

El MLPA és una tècnica relativa: només es poden detectar diferències relatives comparant els patrons de les mostres amb controls (mostres de referència). La inclusió de mostres de referència és essencial, ja que és l'alçada relativa de cada pic individual, en comparació amb les altures del pic de diverses mostres d'ADN de referència, és la que reflecteix el nombre de còpies relatiu de la seqüència diana i permet detectar delecions o duplicacions.

1.4.5. *Optical Genome Mapping (OGM)*

L'*Optical Genome Mapping (OGM)* és una tècnica recent d'alta resolució que permet detectar anomalies estructurals i canvis en el nombre de còpies en el genoma.

El procediment de l'OGM es basa en diverses etapes. Primer, s'aïlla ADN de gran pes molecular (UHMW) de mostres com sang, medul·la òssia, cèl·lules cultivades, teixit o biòpsies tumorals. Aquest ADN s'etiqueta amb fluorocroms en llocs específics a través d'una reacció enzimàtica, en la qual la metiltransferasa DLE-1 reconeix i s'uneix a la

seqüència 'CTTAAG' (generant aproximadament 14-15 etiquetes per cada 100 kbp). A continuació, l'ADN etiquetat es linearitza i es col·loca en nanocanals d'un xip, on es visualitza mitjançant una càmera d'alta resolució. L'ADN marcat genera un mapa òptic que es compara amb un mapa de referència, permetent identificar variants estructurals i canvis en el nombre de còpies (Figura 24)^{157,158}.

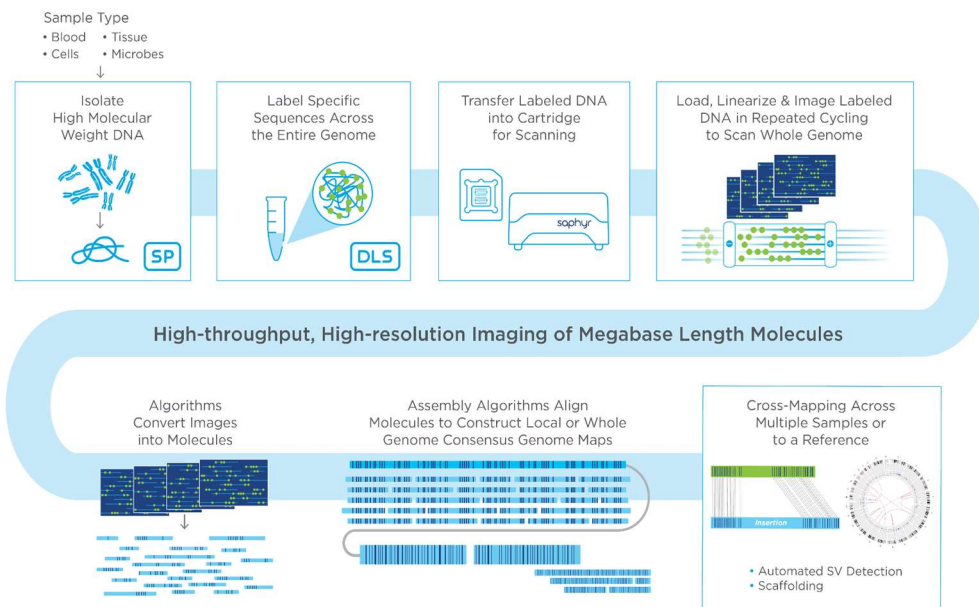


Figura 24. Esquema del procediment de l'OGM¹⁵⁷. Passos del procés: aïllament d'ADN d'alt pes molecular; etiquetatge mitjançant reacció enzimàtica; càrrega en un xip on les molècules es linearitzen uniformement i es separen mitjançant electroforesi en nanocanals; les imatges obtingudes es transformen en molècules; el mapa genòmic òptic únic de la mostra es compara amb el genoma de referència, i les diferències es detecten automàticament, permetent la identificació de variacions estructurals a nivell de genoma.

L'OGM permet detectar variacions de fins a 500pb i no requereix cultius cel·lulars, a diferència del cariotip. A més, no és necessari conèixer prèviament les variacions a estudiar, a diferència de la FISH, i permet diferenciar translocacions tant balancejades com no balancejades, a diferència dels arrays. Aquesta tècnica pot descriure pràcticament totes les variacions (sensibilitat del 5%), incloent aneuploïdies, variacions en el nombre de còpies i variants estructurals (excepte la LOH o les SNV <500pb)^{148,157,158}.

1.4.6. Seqüenciació massiva de nova generació (NGS)

La **seqüenciació massiva de nova generació (NGS)** és una tècnica avançada que permet detectar i identificar fusions, mutacions puntuals i nivells d'expressió a partir d'ADN i ARN. Es pot classificar en tres tipus principals segons l'abast de l'anàlisi: la **seqüenciació dirigida**, que es focalitza en regions específiques del genoma d'interès, oferint alta precisió i profunditat de cobertura amb un cost relativament baix; la **seqüenciació de l'exoma**, que analitza totes les regions codificants del genoma (representen l'1-2% del genoma total); la **seqüenciació del genoma complet**, que proporciona una visió integral de tot el genoma, incloent-hi regions codificants i no codificants, permetent una detecció exhaustiva de variants genètiques, tot i que implica un cost més elevat i una major complexitat d'anàlisi^{148,159,160}.

El procés de NGS comença amb la fragmentació de l'ADN genòmic en petits fragments, seguit de la preparació de llibreries mitjançant amplificació per PCR o captura de regions d'interès. Aquests fragments es lliguen a superfícies sòlides per a la seqüenciació, que pot ser realitzada per síntesi (SBS), identificació d'ions (Ion Torrent) o nanoporus (Nanopore Sequencing). Les lectures obtingudes es processen alineant-les amb un genoma de referència per identificar i analitzar variants genètiques. Aquestes tècniques permeten una detecció precisa de variacions, tot i que cada plataforma presenta un cert nivell d'error (0,1-15%), especialment en regions d'homopolímers. Cada plataforma de seqüenciació massiva utilitza principis químics diferents, cosa que implica variacions quantitatives i qualitatives. Això afecta en la selecció del tipus d'alteració a detectar, la mida de la regió a seqüenciar, la profunditat de cobertura requerida, el volum de mostres, el temps total del procés i el cost final per mostra. Tot i això, en conjunt, les NGS són una eina potent per a la recerca genòmica i la medicina clínica¹⁵⁹.

Concretament, en aquest treball, per a l'anàlisi de leucèmia limfoblàstica aguda pediàtrica, s'ha utilitzat el panell comercial de NGS dirigida *Oncomine Childhood Cancer Research Assay* (ThermoFisher), basat en la tecnologia d'Ion Torrent (Figura 25).

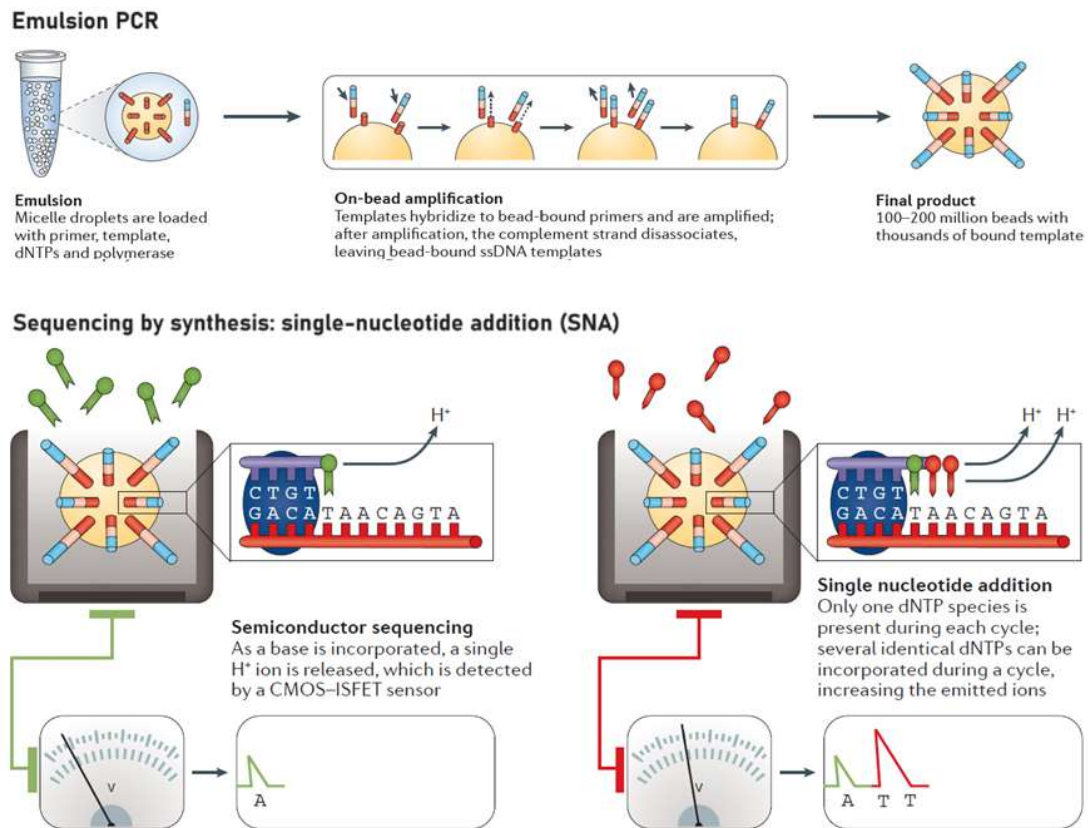


Figura 25. Processos d'amplificació i seqüenciació en el procés de la NGS segon les tecnologies d'Ion Torrent (Thermo Fisher). En la PCR en emulsió, l'ADN fragmentat es replica dins de micelles amb boles cobertes d'adaptadors, generant milers de còpies idèntiques per bola. En la seqüenciació per síntesi mitjançant l'addició d'un únic tipus de nucleòtid, les boles amb ADN es col·loquen en una placa de microtitulació, i la incorporació de nucleòtids genera ions H^+ , provocant un canvi de pH que és detectat per sensors, permetent determinar quants nucleòtids s'han afegit. *Imatge adaptada de Goodwin i col·laboradors¹⁵⁹.*

Aquest sistema utilitza boles (*beads*) per a l'amplificació de l'ADN, les quals es col·loquen en una placa de microtitulació i cadascuna ocupa un pocell de reacció individual. Els nucleòtids es sumen successivament als pocells, generant un ion H^+ com a subproducte amb cada incorporació de base, que provoca canvi de pH que es detecta mitjançant sensors i permet determinar quants nucleòtids s'han afegit. Així, aquest sistema es basa en la seqüenciació per síntesi mitjançant l'addició d'un únic tipus de nucleòtid (SNA), el qual, encara que és efectiu, pot presentar una precisió limitada en regions d'homopolímers i una major freqüència d'error en la lectura d'insercions i delecions¹⁵⁹.

D'altra banda, també es pot realitzar la **seqüenciació del transcriptoma complet** (WTS o RNA-seq). Aquest mètode detecta tant les reorganitzacions cromosòmiques com els canvis en l'expressió de l'ARN missatger (mRNA) i l'ARN micro (miRNA). Es basa en l'extracció de ARN total de les cèl·lules o teixits, la seva conversió en cDNA, i la seqüenciació d'aquest cDNA per obtenir dades sobre les seqüències transcrites. Les lectures obtingudes es comparen amb un genoma de referència per quantificar l'expressió gènica i identificar els patrons d'expressió. L'anàlisi d'aquestes dades revela quins gens són actius, les seves quantitats relatives i les variacions en l'expressió¹⁶¹.

El seu ús està principalment limitat a la recerca, però ha estat una eina molt útil en aquest àmbit, ja que en la leucèmia limfoblàstica aguda ha permès identificar nous subtipus genètics (veure apartat 1.2.3.2. *Leucèmia limfoblàstica aguda B-other*) i desenvolupar i dissenyar panells dirigits per a ús clínic. La disminució dels costos, l'augment de la disponibilitat i les evidències de la utilitat clínica poden acabar fomentant la integració d'aquestes tecnologies en les proves clíniques rutinàries^{114,148}.

2. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

2.1. Hipòtesis

En els darrers anys, la supervivència casos pediàtrics amb leucèmia limfoblàstica aguda ha millorat significativament, però un percentatge important de pacients encara pateix recaigudes. A més, els tractaments convencionals amb quimioteràpia semblen haver arribat al seu màxim potencial, ja que l'augment de la dosi no millora les taxes de supervivència i, en canvi, incrementa els efectes adversos a llarg termini. Aquesta situació subratlla la **necessitat d'una millor estratificació dels pacients**, amb l'objectiu d'identificar aquells que podrien beneficiar-se d'una reducció de la intensitat del tractament per minimitzar els efectes secundaris, així com aquells amb un alt risc de recaiguda que necessiten noves teràpies per millorar la seva supervivència.

En aquest sentit, per refinar l'avaluació del risc, s'han incorporat criteris com la resposta al tractament basada la MMR en funció de l'alteració primària i l'estat de les alteracions genètiques secundàries. Concretament, l'estudi dels gens comunament delecionats en la LLA permet establir perfils com l'IKZF1-plus¹³⁵ o el CNA-UKALL⁴², que s'ha demostrat que són molt rellevants per a l'avaluació del risc i el refinament del pronòstic dels pacients. Tot i això, la part més crucial continua sent la caracterització de les alteracions genètiques primàries, amb especial atenció a la categorització de les LLA B-other. Aquest subgrup, que representa aproximadament el 30% dels pacients, és genèticament molt heterogeni. No obstant això, les tècniques de seqüenciació massiva de nova generació (NGS) i d'expressió gènica han permès identificar nous subgrups genètics dins d'aquest grup, cosa que facilita una estratificació més precisa dels pacients segons el risc associat i permet dissenyar teràpies dirigides adaptades a les necessitats específiques de cada cas.

Malgrat això, la **identificació d'aquests nous subgrups genètics representa un repte significatiu per als laboratoris de diagnòstic rutinari**, que sovint no disposen de les eines o els recursos necessaris per implementar les tècniques utilitzades per identificar aquests subtipus, com ara l'expressió gènica (RNA-seq) o els estudis de seqüenciació del genoma complet. A més, els panells de NGS comercials disponibles no inclouen totes les noves alteracions identificades. Per aquest motiu, molts estudis subratllen la necessitat de dur a terme més investigacions per determinar quines metodologies són més adequades per a la caracterització d'aquestes alteracions.

En aquest context, la hipòtesi d'aquesta tesi és que, **mitjançant una combinació de diferents metodologies accessibles i aplicables en els laboratoris de rutina, es pot identificar de manera ràpida i eficient la majoria de les noves alteracions descrites en les LLA B-other**, millorant així el diagnòstic i la classificació del risc d'aquests pacients.

2.2. Objectius

Identificar les noves alteracions genètiques en el subgrup de LLA B-other i establir les metodologies més adequades per a la seva detecció en una cohort de pacients pediàtrics amb LLA-B tractats de manera homogènia en un únic centre segons el protocol LLA/SEHOP-PETHEMA 2013.

Objectius específics:

1. Avaluar l'impacte pronòstic de les noves alteracions genètiques identificades en la nostra sèrie de pacients.
2. Caracteritzar genèticament les LLA amb fenotip B madur i reordenament de *KMT2A*, per determinar si constitueixen una nova entitat genètica.
3. Realitzar una caracterització detallada de les LLA-B amb amplificació intracromosòmica (iAMP21), identificant les seves particularitats genètiques i establint el seu impacte clínic.

3. RESULTATS

Article I. *How to Combine Multiple Tools for the Genetic Diagnosis Work-Up of B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia*

Aquest estudi va investigar la importància del diagnòstic genètic exhaustiu en la leucèmia limfoblàstica aguda de cèl·lules B pediàtrica (LLA-B). Es van analitzar 175 casos de LLA-B mitjançant cariotip, FISH, MLPA, seqüenciació massiva de nova generació dirigida (t-NGS) i mapeig òptic del genoma (OGM). Aquest enfocament va aconseguir una taxa de classificació del 83%, identificant 17 subtipus genètics diferents. Concretament, dins del subtipus B-other, es van identificar set subgrups diferents (reordenaments *ZNF384*, *IGH*, *DUX4*, *NUTM1*, alteracions *PAX5*, *PAX5* P80R i *IKZF1* N159Y). Es van observar alteracions genètiques secundàries, amb alteracions en el nombre de còpies (CNA), presents en el 60% dels casos, i mutacions, detectades en el 70,6%; aquestes alteracions van mostrar associacions específiques amb certs subtipus genètics. Les CNA no semblaven impactar significativament el pronòstic dins d'aquests grups genètics. L'alta hiperdiploïdia, *ETV6::RUNX1*, *ZNF384r* i *PAX5* P80R van presentar pronòstics excel·lents, en contrast amb els pronòstics desfavorables observats en *KMT2Ar*, hipodiploïdia i *CRLF2r* (la supervivència global a 5 anys va ser del 50%, 50% i 52%, respectivament). Aquests resultats subratllen el valor dels diagnòstics genètics integrats per a una classificació precisa, estratificació del risc i guia del tractament personalitzat en la LLA-B pediàtrica. Per tant, és crucial optimitzar els fluxos de treball diagnòstics per a la pràctica clínica rutinària. El nostre estudi confirma la utilitat de les tècniques convencionals (cariotip i FISH), combinades amb t-NGS i OGM, per al diagnòstic genètic complet.

A continuació es presenta l'article enviat per la seva revisió (versió "For Peer Review").

HOW TO COMBINE MULTIPLE TOOLS FOR THE GENETIC DIAGNOSIS WORK-UP OF B-CELL ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

Gloria Hidalgo-Gómez¹⁻², Bárbara Tazón-Vega¹, Carlos Palacio¹, Silvia Saumell¹, Noemi Martínez-Morgado¹, Víctor Navarro³, Laura Murillo⁴, Pablo Velasco⁴, Thais Murciano⁴, Cristina Díaz de Heredia⁴, Francesc Bosch¹, Gemma Armengol², Margarita Ortega¹

Author affiliations:

¹Hematology Service, Vall d'Hebron Hospital Universitari, Experimental Hematology, Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain.

²Unit of Biological Anthropology, Department of Animal Biology, Plant Biology, and Ecology, Faculty of Biosciences, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Barcelona, Catalonia, Spain.

³Oncology Data Science (ODysSey) Group, Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain.

⁴Pediatric Oncology and Hematology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain.

Corresponding author:

Margarita Ortega

Vall d'Hebron Hospital Universitari | Hematology Service

Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain

Tel: +34 93 274 6205

Email: margarita.ortega@vallhebron.cat

Data sharing: For original data, please contact gloria.hidalgo@vallhebron.cat

Abstract word count: 189

Total word count: 3.125

Figures and Tables: 8 (6 figures and 2 tables)

Supplemental files: 1

Abstract

This study investigated the importance of comprehensive genetic diagnosis in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL). We analyzed 175 B-ALL employing karyotyping, FISH, MLPA, targeted next-generation sequencing (t-NGS), and Optical Genome Mapping (OGM). This approach achieved an 83% classification rate, identifying 17 distinct genetic subtypes. Specifically, within B-other subtype, seven different subgroups were identified (*ZNF384*, *IGH*, *DUX4*, *NUTM1* rearrangements, *PAX5* alterations, *PAX5* P80R, and *IKZF1* N159Y). Secondary genetic alterations were observed, with copy number alterations (CNA) present in 60% of cases and mutations detected in 70.6%. While these alterations exhibited specific associations with certain genetic subtypes, CNAs did not appear to significantly impact the prognosis within these genetic groups. HeH, *ETV6::RUNX1*, *ZNF384r*, and *PAX5* P80R exhibited excellent outcomes, contrasting with the poor prognoses observed in *KMT2Ar*, hypodiploidy, and *CRLF2r* (5-year overall OS were 50%, 50%, and 52%, respectively). These findings underscore the value of integrated genetic diagnostics for accurate subtyping, risk stratification, and guiding personalized treatment in pediatric B-ALL. Therefore, optimizing diagnostic workflows for routine clinical practice is crucial. Our study confirms the utility of conventional techniques (karyotyping and FISH), combined with t-NGS and OGM, for comprehensive genetic diagnosis.

Keywords: acute lymphoblastic leukemia, B-other, genetic diagnosis, multiple-technique approach

Introduction

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common childhood malignancy, and its characteristic genetic profile plays a crucial role in determining the prognosis and treatment stratification. Approximately 70% of B-cell precursor ALL (B-ALL) can be categorized using standard genetic analyses into well-established recurrent genetic abnormality[1, 2]. The remaining 30% of pediatric B-ALL, referred to as “B-other”, encompasses 15 distinct genetic entities[3–6].

Current diagnostic strategies require multiple techniques. Karyotyping is the most widely used method for assessing chromosomal abnormalities, including numerical and structural variants. Fluorescence in situ hybridization(FISH) and reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) detect classical fusions. Chromosomal microarrays and multiplex ligation-dependent probe amplification(MLPA) identify specific copy number alterations(CNA), commonly observed in B-ALL patients[6]. Next generation sequencing(NGS), such as targeted NGS(t-NGS) or whole genome sequencing(WGS), detects actionable/prognostic mutations and fusions[7]. Optical Genome Mapping(OGM) is a new technology that comprehensively detects CNA, structural variants, and fusion genes[8].

Accurately defining leukemia genetics requires a complex workflow utilizing diverse techniques; however, their accessibility varies significantly among laboratories. Our study presents a single-center cohort of ALL employing an integrated approach, which classifies patients into 17 genetic subtypes, elucidating their frequency and clinical significance. Furthermore, we aim to identify the most relevant techniques for a comprehensive genetic diagnosis.

Materials and methods

This study included 217 patients (≤ 18 years) with ALL treated at Vall d'Hebron University Hospital from 2014 to 2023 according to the Spanish SEHOP-PETHEMA 2013 protocol[9] or a similar risk-adapted regimen. Leukemia diagnosis was established based on morphology, immunophenotype, cytogenetics, FISH and RT-PCR as part of routine clinical diagnostics. For this study, MLPA, t-NGS, and OGM analyses were performed retrospectively following the standardized protocols (see **Supplementary File**).

The differences between groups were compared by the chi-square, Fisher's exact, and Mann–Whitney tests, as appropriate. Values of $p < 0.05$ were considered to be statistically significant. Survival analysis focused on overall survival (OS), event-free survival (EFS), and relapse incidence were calculated using Kaplan–Meier methods. Materials, procedures and statistical analyses are detailed in the **Supplementary File**.

This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

Results

Evaluation of diagnostic techniques for B-ALL subtype classification

A total of 217 patients with ALL were included in this study, comprising 175 (80.6%) with B-ALL and 42 (19.4%) with T-ALL. The median age at diagnosis was 5.5 years (interquartile range [IQR] 3.1–10.6 years), the median white blood cell count was $15.52 \times 10^9/L$ (IQR 5.137–61.18), and there was a male predominance (62.7%).

Utilizing all the employed techniques, 145 out of 175 (83%) B-ALL patients could be classified into 17 genetic subtypes. Karyotyping and FISH studies were performed on all patients, yielding evaluable results in 92% (n=161) and 93.1% (n=163) of cases (**TableS1**). MLPA using the P335 kit was retrospectively performed on 120 patients, and the P327 kit was specifically used for 26 B-other patients lacking a defined genetic subtype. The t-NGS study was conducted on 84 patients with a particular focus on *BCR::ABL1*-like (n=16/17) and B-other (n=37/51) subtypes. Additionally, an OGM study was performed on 11 patients who remained undiagnosed and had cryopreserved material available. In 12 patients, samples were unavailable for complete genetic diagnosis.

The combination of karyotyping and FISH allowed us to classify 73% of the cases. NGS and OGM further improved classification by an additional 10% (**Figure1A**). Complementary techniques were often required for a definitive diagnosis (**Figure1B**). However, limitations were observed for each technique. FISH missed specific cases, including *P2RY8::CRLF2* (4/10), *ZNF384* rearrangements (3/6), and *KMT2A::AFF3* fusion (1/1). NGS also had limitations, missing *IGH::CRLF2* (1/1), *KMT2A::UPS2* (1/1), and a *ZNF384* rearrangement (1/6).

MLPA and OGM were used to detect CNA in this study. We analyzed 10 cases in parallel using OGM and the P335 MLPA probe kit, identifying two discrepancies: one case had an *IKZF1* deletion (exons 4 to 7) detected by MLPA but not by OGM, and another case had an *EBF1* deletion (349 kb) detected only by OGM. No cases were analyzed using both the P327 MLPA kit and OGM. However, *ERG* deletions were identified exclusively by OGM in this analysis.

Frequency and clinical significance of primary recurrent genetic in B-ALL

Among the 145 patients with a defined genetic diagnosis, 124 patients (71%) harbored a classical recurrent abnormality: high hyperdiploidy (HeH) (n=46), *t*(12;21)/*ETV6::RUNX1* (n=36), *BCR::ABL1*-like (n=17), *KMT2A* rearrangements (*KMT2Ar*) (n=8), *t*(1;19)/*TCF3::PBX1* (n=6), *t*(9;22)/*BCR::ABL1*

(n=4), iAMP21 (n=4), and hypodiploid (n=3). The remaining patients were classified as B-other (29%) (**Table1, Figure2**).

High hyperdiploidy (HeH) was the most prevalent genetic subtype, diagnosed primarily through karyotyping (39/46). FISH using specific probes (e.g., XCE 4/10/17 from MetaSystems) was employed in patients without informative karyotype. The median number of chromosomes was 56 (IQR 55–60 chromosomes). Trisomies most frequently involved chromosomes X, 4, 10, 17, 18, and 21, rarely involving chromosomes 1, 13, 16, or 20. Additionally, 43.6% of cases had structural variants, most commonly a duplication in chromosome 1. Notably, HeH patients were typically younger (1-10 years old, $p<0.001$) with lower WBC counts ($<50 \times 10^9/L$, $p<0.001$) at diagnosis.

The second most prevalent genetic subtype was *ETV6::RUNX1* rearrangement, detected by FISH in all 36 patients, and further confirmed by PCR or NGS when available. Among these patients, 75% presented an altered karyotype, with a median of 2 aberrations (IQR 1-5). Common accompanying alterations were trisomy 21 (36%) and deletion of 12p (33%). One case exhibited a hyperdiploid karyotype. Notably, patients with *ETV6::RUNX1* were typically younger at diagnosis (1-10 years old, $p=0.005$).

Seventeen patients (10%) harbored *BCR::ABL1*-like abnormalities, categorized as JAK-STAT abnormalities (7%) and ABL-class fusions (3%) (**Table2**). JAK-STAT abnormalities included *P2RY8::CRLF2* (n=10), *IGH::CRLF2* (n=1), and *PAX5::JAK2* (n=1). ABL-class fusions included *PDGFRBr* (n=3) and *ABL1r* (n=2). Partner genes were identified in three out of five cases (*EBF1::PDGFRB*, *ETV6::ABL1*, and *NUP214::ABL1*). Remarkably, patients with *BCR::ABL1*-like were typically older at diagnosis ($p=0.033$) and more likely to be male ($p=0.03$). Patients with *CRLF2r* were significantly associated with Down syndrome (60% of patients with Down syndrome, $p<0.001$), particularly in *P2RY8::CRLF2* fusions, and was higher WBC at diagnosis ($p=0.018$).

Eight patients harbored KMT2Ar, with the partner gene identified in all cases: *AFF1*(n=3), *MLLT3*(n=3), *AFF3*(n=1), and *USP2*(n=1). Patients with KMT2Ar were diagnosed considerably at a younger age than the others, with 4/8 diagnosed within the first year of life ($p<0.001$). This subtype also exhibited a high risk of central nervous system (CNS) involvement (5/7, $p<0.001$) and high WBC at diagnosis (5/8, $p=0.003$). Notably, the KMT2Ar B-ALL immunophenotype was specific, with five patients presenting as Pro-B and three as mature B ($p<0.001$). Interestingly, all three cases with *KMT2A::MLLT3* were associated with a mature B cell phenotype, displaying particular characteristics and outcomes[10].

TCF3::PBX1 (n=6), *BCR::ABL1* (n=4), and iAMP21 (n=4) were detected. *TCF3::PBX1* and *BCR::ABL1* displayed unbalanced translocations [*der(19)t(1;19)* or *der(22)t(9;22)*] in 4/6 and 1/4 of cases, respectively. Interestingly, patients with *TCF3::PBX1* harbored at least three karyotypic

alterations ($p=0.029$). Regarding hypodiploidy, two cases presented near haploidy and one case had low hypodiploidy.

No cases of *KMT2Ar*, *TCF3::PBX1*, *BCR::ABL1*, or hypodiploidy exhibited any other recurrent accompanying alterations (**Tables 1 and Table 2**).

B-other Subtype: Genetic and Clinical Features

Any recurrent genetic abnormality was observed in 51 patients (29%), comprising the B-other subtype. Particularly, B-other patients were diagnosed at a significantly older age compared to the entire B-ALL cohort ($p<0.001$), with nearly half (47%) being diagnosed after age 10. This subgroup also had a significantly higher MRD positivity rate ($p=0.04$), accounting for 62.5% of all MRD-positive cases within the study cohort (**Table 2**).

A specific genetic subtype was identified in 21 patients (**Figure 2**). Six patients (12% of B-other) harbored *ZNF384* rearrangements, with partner genes identified in most cases: *EP300* ($n=2$) and *TCF3* ($n=3$). Four patients (8%) displayed *PAX5alt*, concretely two harbored *PAX5* rearrangements and two presented a unique clonal *PAX5* mutation. Three patients (6%) displayed the defining *PAX5* P80R mutation and another three presented *IGH* rearrangements. Notably, both *PAX5* P80R and *IGHr* patients were typically diagnosed at an older age (>10 years old, $p=0.016$) compared to the entire B-ALL cohort. Additionally, patients with *IGH* rearrangements exhibited a higher prevalence of CNS involvement ($p=0.001$). *ERG* deletions were identified in three patients (6%), being classified as *DUX4* rearrangements since the intragenic *ERG* deletion are found exclusively in those cases [11, 12]. Finally, one case with *NUTM1* rearrangement (2%) and another case with the *IKZF1* N159Y mutation (2%) were identified. Interestingly, the *IKZF1* mutation was observed in the Pre-B ALL phenotype ($p=0.004$).

Frequency of copy number alterations in correlation with primary chromosomal abnormalities

Copy number alterations (CNAs) affecting *IKZF1*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, *BTG1*, *ETV6*, *EBF1*, *RB1*, and the PAR1 region were determined by P335 MLPA in 120 patients. No detectable CNVs were observed in 26% of the patients. The median number of deletions in the cohort was 1. Among patients with deletions, 73 (60%) had one or more deletions, with 26%, 17%, and 18% exhibiting 1, 2, or ≥ 3 deletions, respectively. The most frequently deleted genes were *ETV6* (26%), *CDKN2A/B* (25%), *PAX5* (22%), and *IKZF1* (18%). Deletions in other investigated genes (*BTG1*, *EBF1*, *RB1*, and PAR1) were observed in less than 10% of patients. Among patients with *IKZF1* deletions, the most frequent

type involved canonical intragenic deletions encompassing exons 4-7 (42%). Notably, 53% of patients with *CDKN2A/B* deletions exhibited biallelic loss, a phenomenon observed only in this particular gene pair. Pairwise testing revealed a non-random pattern in CNAs (**FigureS1**). *IKZF1* deletions frequently co-existed with *PAR1* deletions ($p=0.009$). *CDKN2A/B*, and *PAX5*, which are co-located on chromosome 9p, were also frequently co-deleted ($p<0.001$).

CNA profiles could be classified in as good-risk (CNA-GR; $n=69$) or poor-risk (CNA-PR; $n=51$) according to Hamadeh et al.[13]. The deletion pattern varied significantly depending on the underlying primary chromosomal abnormality (**Figure3**). HeH patients frequently presented a CNA-GR ($p<0.0012$). *ETV6::RUNX1* cases presented the majority of *ETV6* deletions (representing the 65% of all *ETV6* deletions; $p<0.0012$) and *PAR1* deletions ($p=0.004$). Deletions were detected in all *BCR::ABL1*-like cases (median 2), associated with a CNA-PR in the majority of cases ($p<0.001$). The most common deletions in this subtype were *IKZF1* (75%), *CDKN2A/B* (58%) and *PAX5* (50%). *IKZF1* and *PAR1* region were significantly deleted in *BCR::ABL1*-like patients compared to overall B-ALL ($p<0.001$). All patients with CRLF2r exhibited deletions (median 2.5), frequently in *IKZF1*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, and *PAR1* ($p<0.01$). KMT2Ar or *TCF3::PBX1* subtypes were not associated with any specific deletions, and most patients had a normal CNA profile.

The B-other subgroup displayed a higher frequency of deletions (52.8%), with a median of 1 deletion. Most patients presented deletion of *PAX5* (30.6%), *CDKN2A/B* (25%), *IKZF1* and *RB1* (19.4% both). Patients with *PAX5alt* and *ZNF384r* consistently presented with multiple deletions (median 3 and 2.5, respectively). *PAX5alt* and *PAX5 P80R* presented *JAK2* deletion significantly enriched ($p<0.001$). Also, all patients with *PAX5alt* had deletions in *CDKN2A/B* and *PAX5* itself ($p<0.01$). Finally, deletions of *EBF1* and *RB1* were more frequent in patients with *ZNF384r* compared to the overall cohort ($p<0.05$).

Frequency of mutations in correlation with primary chromosomal abnormalities

Pathogenic mutations were identified in 70.6% of patients. The most frequently mutated genes were *KRAS* (23.8%), *NRAS* (15.5%), and *PAX5* (8.3%). These were followed by mutations in *TP53*, *FLT3*, *NF1*, *PTPN11*, and *KMT2D* (around 6%). Mutations in *IKZF1*, *JAK1*, *NSD2*, *CBL*, and *ARID1A* (around 4.8%) were also observed, along with less frequent mutations (1-2.5%) in 22 other genes. Overall, the median number of mutations per patient was 1.5 (IQR 0–3 mutations).

The specific chromosomal abnormalities of a patient significantly influenced their mutation profile (**Figure4**). Patients with HeH displayed a high number of mutations (median 3) and frequently harbored concurrent mutations in *NT5C2*, *FLT3*, and *PTPN11*. *ETV6::RUNX1* cases often had mutations in *KRAS*, *ARID1A*, and *KMT2D*. The *BCR::ABL1*-like patients had the highest overall

mutation frequency (63%), with mutations commonly involving *KRAS*, *NRAS*, *CBL*, *JAK1*, and *JAK2*. Notably, all *JAK2* mutations occurred in patients with CRLF2r.

In the B-other subtype *KRAS* and *NRAS* mutations were highly prevalent, accounting for 70% and 62% of the total mutated gene, respectively. Similarly, *PAX5* and *IKZF1* mutations were also common (71.4% and 75% of mutations, respectively). Furthermore, co-occurring mutations in *TP53*, *FLT3*, *NF1*, *CBL*, *NSD2*, *JAK1*, and *PTPN11* were frequently observed within this subtype. The PAX5alt group displayed the highest number of mutations (median 3.5), with all *PAX5* mutations co-occurring with *MTOR* mutations. Furthermore, the *PAX5* P80R specific mutation frequently co-occurred with other mutations (median 2). Patients with ZNF834r harbored mutations of *EGFR* and *EZH2* genes in all cases.

Outcome of patients by genetic subtype and prognostic impact of secondary abnormalities

A total of 144 B-ALL patients in this study were treated according to the SEHOP-PETHEMA 2013 treatment guidelines, which use risk-adapted treatment regimens (see **supplementary data**). Patients were classified as standard (n=5), intermediate (n=98), or high-risk (n=41). The 5-years overall survival (OS) rates were 100%, 97.0%, and 68.6% respectively; and event-free survival (EFS) rates were 75%, 89.6%, and 54.1% (**FigureS2**). The entire B-ALL cohort showed high OS and EFS rates of 88.9% and 78.9%, respectively, with a relapse rate of 17.4% (**Table1**).

The distinct genetic subtypes of B-ALL patients exhibited distinct survival and relapse rates (**Table1**, **FigureS3**). HeH patients had a significantly lower relapse rate (only 9%, $p=0.016$) and all are currently alive ($p=0.004$). In contrast, *BCR::ABL1*-like patients displayed a high relapse rate (53%, $p=0.001$) and mortality rate (29%, $p=0.02$); specifically, the CRLF2r subgroup showing poorer outcomes, with a significantly higher relapse rate (63%, $p<0.001$) and mortality rate (36%, $p=0.01$). Similarly, KMT2Ar patients also had high relapse rate (63%, $p=0.004$) and mortality rate, with all relapses in this group resulting in death ($p<0.001$). Therefore, *BCR::ABL1*-like and KMT2Ar, along with hypodiploid and *BCR::ABL1* patients, exhibited the worst outcomes. B-other patients demonstrated an intermediate-risk profile, with a 5-years OS of 87.8% and an EFS of 66.8% (**Table2**). Interestingly, among the B-other subgroup, ZNF384r and *PAX5* P80R patients exhibited the lowest mortality and relapse rates.

Based on genetic prognosis profiles, we classified patients into three distinct risk groups: good (GEN-GR, n=73, characterized by HeH and *ETV6::RUNX1*), poor (GEN-PR, n=7, with KMT2Ar, *BCR::ABL1* and hypodiploidy), and intermediate (GEN-IR, n=64, encompassing other genetic subtypes). GEN-GR, GEN-IR, and GEN-PR presented at 5-years an OS rates of 98.5%, 83.0%, and 38.1%; an EFS of 94.9%, 64.1%, and 42.9%; and a relapse incidence of 3.7%, 32.7%, and 37.5%, respectively (**Figure5**). Despite differences in survival rates between genetic risk groups, GEN-IR and GEN-PR

patients exhibited similar relapse rates. Furthermore, incorporating CNAs data with these genetic groups did not significantly affect patient prognosis in our study (**FigureS4**).

Discussion

With our comprehensive approach, combining karyotyping, FISH, MLPA, t-NGS, and OGM, we had been able to classify 83% of patients into 17 distinct genetic subtypes (**Figure6**). Traditional techniques effectively detected common abnormalities like aneuploidies, iAMP21, and most recurrent translocations, such as *ETV6::RUNX1*, *t(1;19)/TCF3::PBX1* and *t(9;22)/BCR::ABL1*. However, rearrangements involving *KMT2A* often required confirmation from multiple techniques due to their complexity. Similarly, the high heterogeneity of *BCR::ABL1*-like and B-other subtypes necessitates utilizing other available techniques for accurate diagnosis. While 58% of B-other cases (17% of all B-ALL) in our study remained unclassified, this is comparable to other large studies like Schwab et al.[14], where even using WGS 53% were left unclassified. Therefore, karyotyping and FISH remain robust, cost-effective, and widely accessible for rapid chromosomal abnormality assessment. NGS and OGM significantly improve diagnostic yield, especially in cases with incomplete cytogenetic results. This study highlights the importance of integrating multiple diagnostic techniques for an accurate genetic diagnosis of pediatric B-ALL.

The distribution of most identified genetic subtypes aligned well with previous studies[15, 16]. However, *DUX4r*, *ZNF384r*, and *PAX5alt*, were observed at a lower frequency in our study compared to the reported range (2%vs5-10%, 3%vs6%, and 2%vs10%, respectively)[14–17]. No cases of *MEF2D* rearrangements or *ETV6::RUNX1*-like fusions were identified despite using techniques with sufficient coverage. This difference in frequency and identification of the subtypes could be due to variations in the studied populations, as geographic location or ethnicity might influence the prevalence of certain subtypes. Importantly, we identified patients with potential *DUX4r* based solely on *ERG* deletions. Currently, directly detecting *DUX4* rearrangements remains challenging with the employed methods.

Moreover, the study acknowledges the presence of concurrent recurrent genetic alterations alongside the primary genetic abnormalities, consistent with previous observations[17]. The recognition of concurrent alterations, such as *CRLF2* rearrangements with iAMP21, *ETV6::RUNX1* or other *BCR::ABL1*-like fusions, or hyperdiploid karyotype in *ETV6::RUNX1* and *BCR::ABL1*, is crucial for making a correct classification of the patients and assigning appropriate risk stratification.

Regarding secondary alterations, deletions in genes relevant were observed in 60% of our cohort. The most common CNAs included deletions in *ETV6* and 9p (encompassing *CDKN2A/B* and *PAX5*) and *IKZF1* deletions, similar to previous reports[18, 19]. The association between the deleted genes and the underlying genetic subtype is also consistent with the literature[19], with *IKZF1*, *PAX5*, and *PAR1* deletions observed in *BCR::ABL1*-like patients, *PAX5* and *CDKN2A/B* deletions in B-other patients, and *ETV6* deletions in *ETV6::RUNX1* patients. Interestingly, our study also identified an association between *RB1* deletion and the ZNF384r subgroup, which did not lead to a poorer prognosis, unlike previous reports[19].

B-ALL in our study displayed a low number of mutations (median 2), which is fewer than the median of four putative somatic driver alterations described by Brady et al.[17]. *PAX5alt*, HeH, and *DUX4* showed the highest number of mutations (median 3.5-3). The most frequent mutations found in our B-ALL cohort were *KRAS*, *NRAS*, and *PAX5*, similar to previous reports[17]. Furthermore, we found a specific association between the genetic subtype and mutations, such as CRLF2r with *JAK2* and ZNF384r with *EGFR* and *EZH2*. *TP53* and *NT5C2* mutations were found in 16% of relapsed patients, even though the majority had a favorable prognosis genetic group (HeH and *ETV6::RUNX1*), corroborating the association of these mutations with resistance to chemotherapy[20, 21].

Our analysis confirms the critical role of genetics in prognosis. Patients with good-risk (GEN-GR) genetics had excellent survival rates, while poor-risk (GEN-PR) patients had worse outcomes. Interestingly, the intermediate risk group within SEHOP-PETHEMA2013 protocol had a high OS (97%), regardless of genetics, suggesting accurate patient stratification based on response to treatment (MRD) and age. However, within this group, the CRLF2r subgroup had a poorer prognosis with a lower EFS and higher relapse rate, while ZNF384r and *PAX5* P80R subgroups showed excellent outcomes, differing from previously described intermediate risk cases[14]. Despite what is described in the literature[13, 18], CNAs did not show significant prognostic differences in survival rates in our cohort. Furthermore, unlike in adults[22], CK presence did not exhibit independent prognostic significance in our pediatric cohort.

In conclusion, this study reinforces the importance of integrated genetic diagnostics for accurate subtyping and prognostication in pediatric B-ALL. Identification of a novel subtype and characterization of secondary abnormalities, provide deeper insights into B-ALL biology, paving the way for personalized treatment approaches. The development of cost-effective strategies to incorporate comprehensive genetic profiling into routine clinical practice is essential. Our study confirms that the use of conventional techniques, together with t-NGS, allows for accurate genetic diagnosis.

Declarations

Ethical Approval: All patients provided informed consent in accordance with protocols approved by Institutional Ethics Committee of Vall d'Hebron University Hospital and in compliance with the Declaration of Helsinki.

Data Availability: Due to concerns regarding patient privacy, the datasets employed in this study are not accessible to the public; however, upon reasonable request to the corresponding, they may be made accessible.

Fundings: This work was supported by the FERO Foundation under Grant 3281.

Conflict of Interest: No conflicts of interest to disclose.

Contributions: G.HG. and M.O. was responsible for the conception and design of the study. G.HG., B.TV., C.P., S.S., N.MM. and M.O. conducted the laboratory work. G.HG. and B.TV. performed and interpreted the NGS analysis. V.N. performed and revised the statistical analysis. L.M., P.V., T.M. and C.D. were responsible for the patients and performed clinical evaluations. G.HG., M.O., G.A. and F.B. discussed the results. G.HG. prepared the final manuscript for publication. All authors read and approved the final manuscript.

References

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al (2016) The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127:2391–2406. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>.The
2. Schwab C, Harrison CJ (2018) Advances in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia genomics. *Hemasphere* 2:1–9. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000053>
3. Zaliouva M, Stuchly J, Winkowska L, et al (2019) Genomic landscape of pediatric B-other acute lymphoblastic leukemia in a consecutive European cohort. *Haematologica* 104:1396–1406. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.204974>
4. Kimura S, Montefiori L, Iacobucci I, et al (2022) Enhancer retargeting of CDX2 and UBTF::ATXN7L3 define a subtype of high-risk B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 139:3519–3531. <https://doi.org/doi.org/10.1182/blood.2022015444>
5. Gu Z, Churchman ML, Roberts KG, et al (2019) PAX5-driven subtypes of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 51:296–307. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0315-5>
6. Schwab CJ, Murdy D, Butler E, et al (2022) Genetic characterisation of childhood B-other-acute lymphoblastic leukaemia in UK patients by fluorescence in situ hybridisation and Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification. *Br J Haematol* 196:753–763. <https://doi.org/10.1111/bjh.17869>
7. Duncavage EJ, Bagg A, Hasserjian RP, et al (2022) Genomic profiling for clinical decision making in myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 140:2228–2247. <https://doi.org/10.1182/blood.2022015853>
8. Rack K, De Bie J, Ameye G, et al (2022) Optimizing the diagnostic workflow for acute lymphoblastic leukemia by optical genome mapping. *Am J Hematol* 97:548–561. <https://doi.org/10.1002/ajh.26487>
9. Badell I, Díaz de Heredia C, Dapena JL, et al (2014) Recomendaciones terapéuticas LAL/SEHOP-PETHEMA 2013
10. Hidalgo-Gómez G, Palacio-García C, Gallur L, et al (2021) Is acute lymphoblastic leukemia with mature B-cell phenotype and KMT2A rearrangements a new entity? A systematic review and meta-analysis. *Leuk Lymphoma* 62:2202–2210. <https://doi.org/10.1080/10428194.2021.1907375>
11. Zaliouva M, Potuckova E, Hovorkova L, et al (2019) ERG deletions in childhood acute lymphoblastic leukemia with DUX4 rearrangements are mostly polyclonal, prognostically relevant and their detection rate strongly depends on screening method sensitivity. *Haematologica* 104:1407–1416. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.204487>
12. Rehn JA, O'connor MJ, White DL, Yeung DT (2020) DUX hunting—clinical features and diagnostic challenges associated with DUX4-rearranged leukaemia. *Cancers (Basel)* 12:1–15

13. Hamadeh L, Enshaei A, Schwab C, et al (2019) Validation of the United Kingdom copy-number alteration classifier in 3239 children with B-cell precursor ALL. *Blood Adv* 3:148–157. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018025718>
14. Schwab C, Cranston RE, Ryan SL, et al (2023) Integrative genomic analysis of childhood acute lymphoblastic leukaemia lacking a genetic biomarker in the UKALL2003 clinical trial. *Leukemia* 37:529–538. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01799-4>
15. Iacobucci I, Kimura S, Mullighan CG (2021) Clinical Medicine Biologic and Therapeutic Implications of Genomic Alterations in Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Med* 10:3792. <https://doi.org/10.3390/jcm>
16. Inaba H, Mullighan CG (2020) Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 105:2524–2539
17. Brady SW, Roberts KG, Gu Z, et al (2022) The genomic landscape of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 54:1376–1389. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01159-z>
18. Song Y, Fang Q, Mi Y (2022) Prognostic significance of copy number variation in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Front Oncol* 12
19. Steeghs EMP, Boer JM, Hoogkamer AQ, et al (2019) Copy number alterations in B-cell development genes, drug resistance, and clinical outcome in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Sci Rep* 9:. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41078-4>
20. Hof J, Krentz S, Van Schewick C, et al (2011) Mutations and deletions of the TP53 gene predict nonresponse to treatment and poor outcome in first relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 29:3185–3193. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.34.8144>
21. Dieck CL, Ferrando A (2019) Genetics and mechanisms of NT5C2-driven chemotherapy resistance in relapsed ALL
22. Moorman A V., Barretta E, Butler ER, et al (2022) Prognostic impact of chromosomal abnormalities and copy number alterations in adult B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: a UKALL14 study. *Leukemia* 36:625–636. <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01448-2>

Figure 1. Diagnostic performance of cytogenetic techniques in pediatric B-ALL diagnosis. (A) Proportion of patients classified into a defined genetic subtype using different cytogenetic techniques, ordered by increasing complexity (Karyotype < FISH < t-NGS < OGM). (B) Venn diagram representing the diagnostic capacity of each cytogenetic technique used. The diagram distinguishes diagnoses made by individual techniques and those confirmed by overlapping techniques. K: karyotype; FISH: fluorescence in situ hybridization; t-NGS: targeted next generation sequencing; OGM: optical genome mapping.

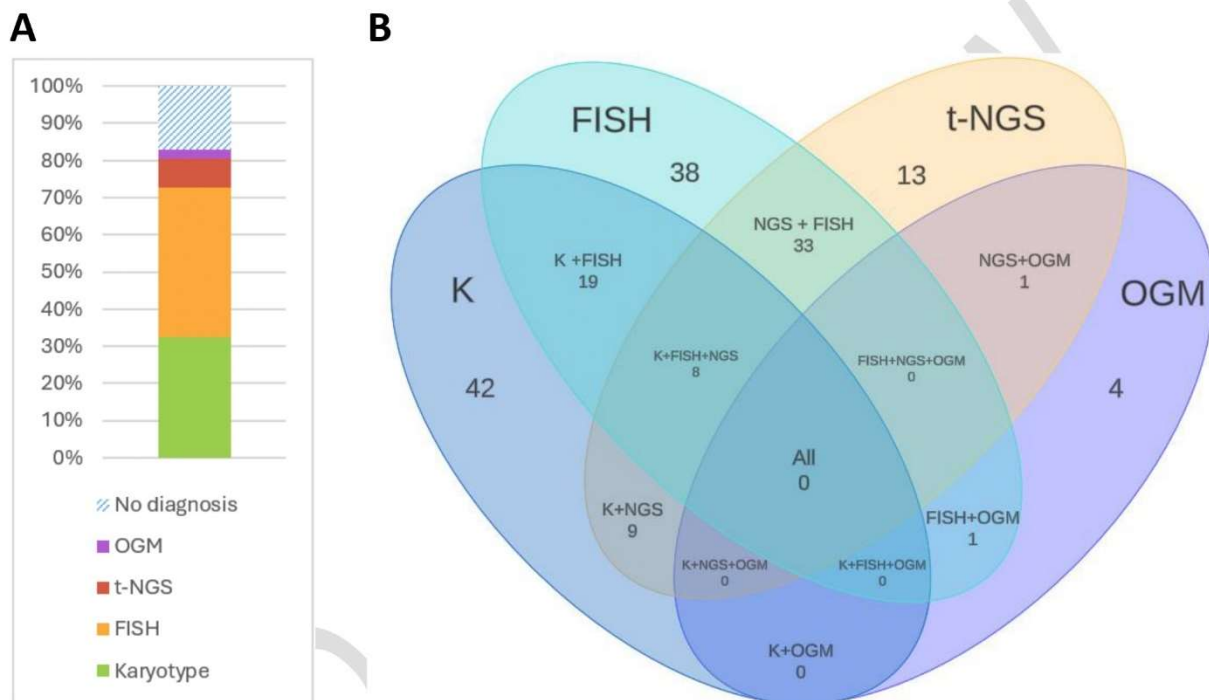


Figure 2. Genetic distribution of 175 pediatric B-ALL patients in our series. Pie chart segments display the proportion of patients within each genetic subtype. The B-other group is further subdivided based on the specific identified subtypes. alt: alterations; r: rearrangements; del: deletion.

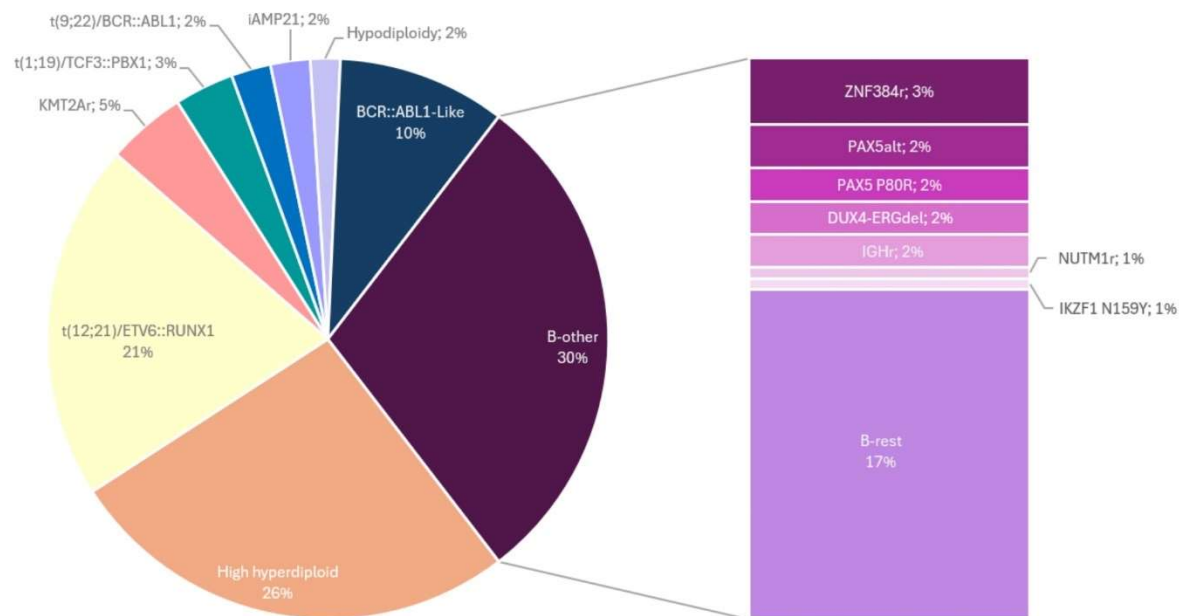


Figure 3. Copy number alteration (CNA) pattern across the underlying genetic subtype in our cohort of B-ALL. Oncoplot showing the pattern of individual copy number alterations, deletions (red) and duplication (blue), and the risk group profile of CNA per case according to genetic subtype. Risk groups were established based on UKALL-CNA profile established by Hamadeh et al.[13]. CNA-GR (green): do not present any deletion of the regions studied, isolated deletions of *ETV6*, *PAX5* or *BTG1*, or cases with *ETV6* deletions with single additional deletion of *BTG1*, *PAX5* or *CDKN2A/B*; CNA-PR (red): any deletion of *IKZF1*, *PAR1*, *EBF1*, *RB1*, or any other CNA-profile not mentioned above.

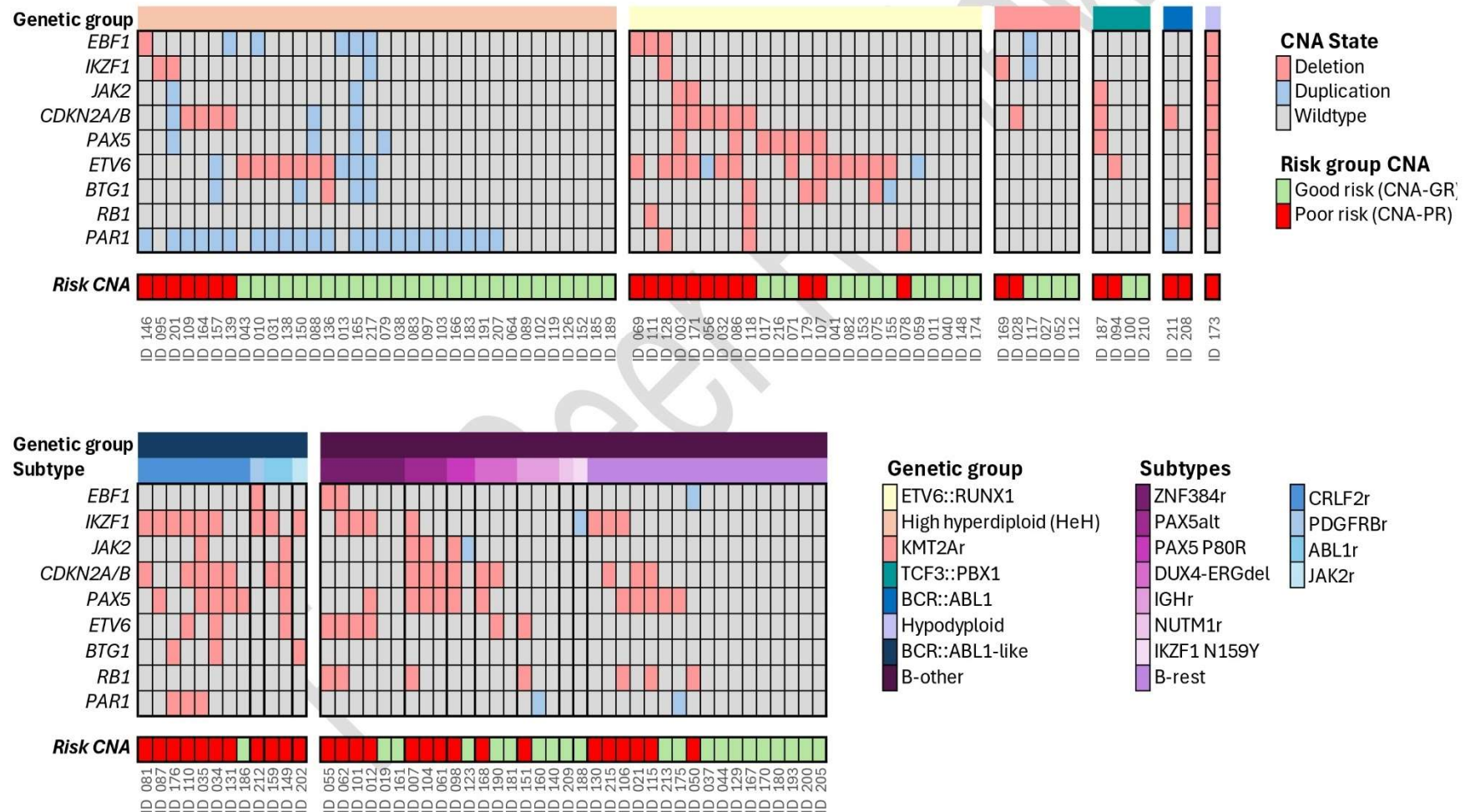


Figure 5. Outcomes according to the genetic risk classification for our cohort of pediatric B-ALL. (A–C) Kaplan–Meier survival curves showing the overall survival, event-free survival and relapse incidence according to genetic classification. GEN-GR: HeH and *ETV6::RUNX1*; GEN-PR: *KMT2Ar*, *BCR::ABL1* or hypodiploidy; GEN-IR: other genetic subtypes.

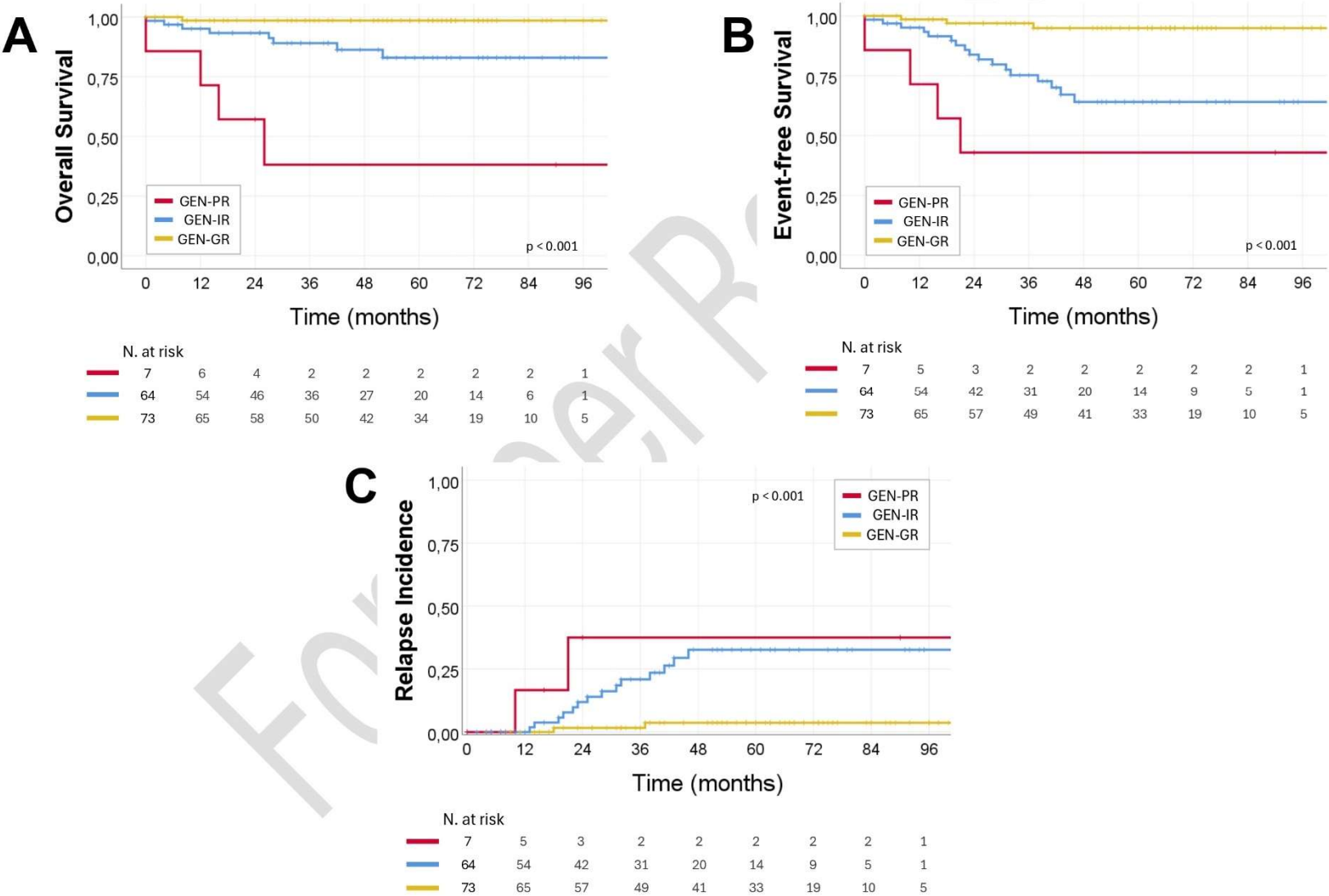


Figure 6. Genetic Diagnostic Algorithm Approach for B-ALL. In suspected cases of B-ALL, for an accurate genetic diagnosis, the following approach is recommended: karyotyping, FISH screening for *ETV6::RUNX1*, *KMT2A*, *TCF3*, and *ABL*-Class fusions, and MLPA. If no definitive abnormality is identified, complete FISH study using probes for *CRLF2*, *EPOR*, *JAK2*, *PAX5*, *IGH*, *MEF2D*, and *ZNF384*. If still negative, the study may be continued with t-NGS; and if genetic diagnosis remains elusive, an OGM may be performed.

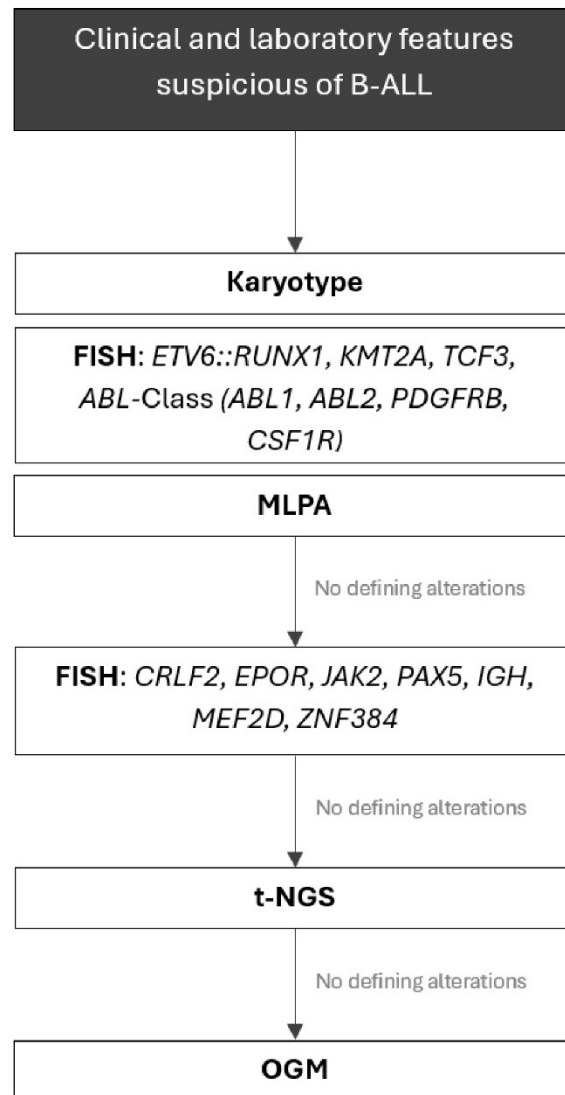


Table 1. Demographic, Clinical, Genetic Features and Outcome of Patients with B-ALL according to genetic abnormalities.

	Total cohort	Principal genetic subtype									p-value
	HeH	ETV6::RUNX1	KMT2Ar	TCF3::PBX1	BCR::ABL1	iAMP21	Hypodiploid	BCR::ABL1-Like	B-other		
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)		
	175	46 (26)	36 (21)	8 (5)	6 (3)	4 (2)	4 (2)	3 (2)	17 (10)	51 (29)	
Demographics features											
Sex											
Male	101 (58)	22 (48)	23 (64)	4 (50)	4 (67)	3 (75)	3 (75)	1 (33)	14 (82)	27 (53)	0.325
Female	74 (42)	24 (52)	13 (36)	4 (50)	2 (33)	1 (25)	1 (25)	2 (67)	3 (18)	24 (47)	
Age											
<10	128 (73)	45 (98)	33 (92)	7 (88)	3 (50)	1 (25)	2 (50)	2 (67)	8 (47)	27 (53)	0.000
≥10	47 (27)	1 (2)	3 (8)	1 (12)	3 (50)	3 (75)	2 (50)	1 (33)	9 (53)	24 (47)	
White cell count (x10 ⁶ /L)											
<50x10 ⁶ /L	134 (79)	41 (93)	30 (83)	3 (37)	6 (100)	3 (75)	4 (100)	3 (100)	10 (63)	34 (71)	0.004
≥50x10 ⁶ /L	35 (21)	3 (7)	6 (17)	5 (63)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	6 (37)	14 (29)	
Immunophenotype											
Pro B	8 (4)	0 (0)	0 (0)	5 (63)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (6)	0.000
Common B	151 (87)	44 (96)	34 (94)	0 (0)	5 (83)	3 (75)	4 (100)	3 (100)	15 (88)	43 (86)	
Pre B	12 (7)	2 (4)	2 (6)	0 (0)	1 (17)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	2 (12)	4 (8)	
Mature B	3 (2)	0 (0)	0 (0)	3 (37)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Outcomes											
MDR status (+15 days)											
Negative (<0,1%)	39 (24)	13 (29)	9 (26)	2 (33)	2 (40)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (8)	12 (25)	0.557
Positive (≥0,1%)	121 (76)	31 (71)	26 (74)	4 (67)	3 (60)	3 (100)	4 (100)	3 (100)	12 (92)	35 (75)	
MDR status (+33 days)											
Negative (<1%)	155 (95)	43 (98)	34 (100)	6 (100)	6 (100)	3 (100)	4 (100)	2 (67)	13 (93)	44 (90)	0.166
Positive (≥1%)	8 (5)	1 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (33)	1 (7)	5 (10)	
Complete remission											
No	7 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (33)	0 (0)	0 (0)	2 (12)	4 (8)	0,145
Yes	164 (96)	45 (100)	35 (100)	8 (100)	6 (100)	2 (67)	4 (100)	3 (100)	14 (88)	47 (92)	
Relapse											
No	135 (78)	41 (91)	30 (86)	3 (38)	4 (67)	4 (100)	3 (75)	2 (67)	8 (47)	40 (80)	0.001
Yes	37 (22)	4 (9)	5 (14)	5 (62)	2 (33)	0 (0)	1 (25)	1 (33)	9 (53)	10 (20)	

Death											
No	154 (88)	46 (100)	35 (97)	3 (37)	5 (83)	2 (50)	4 (100)	2 (67)	12 (71)	45 (88)	0.000
Yes	21 (12)	0 (0)	1 (3)	5 (63)	1 (17)	2 (50)	0 (0)	1 (33)	5 (29)	6 (12)	
Outcome rates at 5 years *											
Relapse (%)	17,4%	3,0%	4,4%	50,0%	No relapse	-	25,0%	33,3%	73,5%	28,0%	
Event free (%)	78,9%	97,0%	92,5%	50,0%	No events	-	75,0%	66,7%	26,5%	66,8%	
Overall survival (%)	88,9%	No death	98,7%	50,0%	No deaths	-	No death	50,0%	51,1%	87,8%	
Genetic characteristics											
Concurrent primary alterations		-	2 P2RY8::CRLF2 1 Hyperdiploidy	-	1 Hyperdiploidy	2 Hyperdiploidy	2 P2RY8::CRLF2	-	Δ	Δ	
Secondary alterations (CNA)											
EBF1 deletion (N;%)	8	1 (12)	3 (38)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-	1 (12)	1 (13)	2 (25)	0.027
IKZF1 deletion (N;%)	21	2 (9)	1 (5)	1 (5)	0 (0)	0 (0)	-	1 (5)	9 (43)	7 (33)	0.000
JAK2 deletion (N;%)	9	0 (0)	2 (22)	0 (0)	1 (11)	0 (0)	-	1 (11)	2 (22)	3 (34)	0.087
CDKN2A/B deletion (N;%)	30	4 (14)	6 (20)	1 (3)	1 (3)	1 (3)	-	1 (3)	7 (24)	9 (30)	0.100
PAX5 deletion (N;%)	26	0 (0)	7 (27)	0 (0)	1 (4)	0 (0)	-	1 (4)	6 (23)	11 (42)	0.004
ETV6 deletion (N;%)	31	7 (23)	13 (42)	0 (0)	1 (3)	0 (0)	-	1 (3)	3 (10)	6 (19)	0.035
BTG1 deletion (N;%)	9	1 (11)	4 (45)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-	1 (11)	3 (33)	0 (0)	0.003
RB1 deletion (N;%)	11	0 (0)	2 (18)	1 (9)	0 (0)	1 (9)	-	1 (9)	0 (0)	7 (64)	0.001
PAR1 deletion (N;%)	6	0 (0)	3 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-	0 (0)	3 (50)	0 (0)	0.000
Median number of deletions	1	0	1	0	0,5	1	-	8	2	1	
Median number of mutations	2	3	1	2	1	0	0	2,5	1,5	2	
Diagnosis methods (N/total analyzed)											
Karyotype	66	39 /41	NA	6 /7	5 /5	4 /4	4 /4	3 /3	NA	NA	
FISH	82	45 /46	36 /36	7 /8	6 /6	4 /4	4 /4	NA	12 /16	8 /35	
t-NGS	49	NA	11 /11	4 /5	4 /4	3 /3	NA	NA	14 /16	12 /37	
OGM	6	-	-	-	-	-	-	-	1 /1	5 /10	

* Only patients treated homogeneously with the SEHOP-PETHEMA 2013 protocol (144/175).

Δ See Table 2

NA: not applicable.

Table 2. Demographic, Clinical, Genetic Features and Outcome of Patients with B-other and *BCR::ABL1*-Like subtypes.

	Total B-OTHER	B-OTHER subtypes								Total <i>BCR::ABL1</i> - LIKE	<i>BCR::ABL1</i> -LIKE subtypes			
		ZNF384r	PAX5alt	PAX5 P80R	IGHr	DUX4- ERGdel	NUTM1r	IKZF1 N159Y	B-rest		CRLF2r	PDGFRBr	ABL1r	JAK2r
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)
	51	6 (12)	4 (8)	3 (6)	3 (6)	3 (6)	1 (2)	1 (2)	30 (58)	17	11 (65)	3 (17)	2 (12)	1 (6)
Demographics features														
Sex														
Male	27 (53)	2 (33)	4 (100)	3 (100)	3 (100)	1 (33)	1 (100)	1 (100)	12 (40)	14 (82)	2 (18)	3 (100)	1 (50)	1 (100)
Female	24 (47)	4 (67)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (67)	0 (0)	0 (0)	18 (60)	3 (18)	9 (82)	0 (0)	1 (50)	0 (0)
Age														
<10	27 (53)	4 (67)	2 (50)	0 (0)	0 (0)	1 (33)	1 (100)	1 (100)	18 (60)	8 (47)	7 (64)	1 (33)	0 (0)	0 (0)
≥10	24 (47)	2 (33)	2 (50)	3 (100)	3 (100)	2 (67)	0 (0)	0 (0)	12 (40)	9 (53)	4 (36)	2 (67)	2 (100)	1 (100)
White cell count (x10⁹/L)														
<50x10 ⁹ /L	34 (71)	3 (50)	2 (50)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	1 (100)	1 (100)	18 (67)	10 (63)	5 (50)	2 (67)	2 (100)	1 (100)
≥50x10 ⁹ /L	14 (29)	3 (50)	2 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	9 (33)	6 (37)	5 (50)	1 (33)	0 (0)	0 (0)
Immunophenotype														
Pro B	3 (6)	1 (17)	0 (0)	1 (33)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Common B	43 (86)	5 (83)	4 (100)	2 (67)	3 (100)	2 (67)	1 (100)	0 (0)	26 (90)	15 (88)	10 (91)	3 (100)	1 (50)	1 (100)
Pre B	4 (8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (33)	0 (0)	1 (100)	2 (7)	2 (12)	1 (9)	0 (0)	1 (50)	0 (0)
Mature B	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Outcomes														
MDR status (+15 days)														
Negative (<0,1%)	12 (25)	0 (0)	2 (67)	1 (33)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	1 (100)	7 (26)	1 (8)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	0 (0)
Positive (≥0,1%)	35 (75)	6 (100)	1 (33)	2 (67)	3 (100)	3 (100)	0 (0)	0 (0)	20 (74)	12 (92)	8 (100)	3 (100)	1 (50)	1 (100)
MDR status (+33 days)														
Negative (<1%)	44 (90)	5 (83)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	1 (100)	1 (100)	25 (88)	13 (93)	9 (100)	3 (100)	1 (50)	0 (0)
Positive (≥1%)	5 (10)	1 (17)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (14)	1 (7)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	1 (100)
Complete remission														
No	4 (8)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	1 (33)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (7)	2 (12)	1 (9)	1 (33)	0 (0)	1 (100)
Yes	47 (92)	6 (100)	3 (75)	3 (100)	2 (67)	3 (100)	1 (100)	1 (100)	29 (93)	14 (88)	10 (91)	2 (67)	2 (100)	0 (0)
Relapse														
No	40 (80)	6 (100)	3 (75)	3 (100)	2 (67)	3 (100)	1 (100)	0 (0)	22 (78)	8 (47)	4 (36)	2 (67)	2 (100)	0 (0)
Yes	10 (20)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	1 (33)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	7 (24)	9 (53)	7 (64)	1 (33)	0 (0)	1 (100)

Death														
No	45 (88)	5 (83)	3 (75)	3 (100)	3 (100)	2 (67)	1 (100)	1 (100)	27 (90)	12 (71)	7 (64)	2 (67)	2 (100)	1 (100)
Yes	6 (12)	1 (17)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	1 (33)	0 (0)	0 (0)	3 (10)	5 (29)	4 (36)	1 (33)	0 (0)	0 (0)
Outcome rates at 5 years *														
Relapse rate	28,0%	No relapse	33,3%	No relapse	**	**	**	**	34,1%	73,5%	72,7%	**	**	**
Event free	66,8%	83,3%	50,0%	No events	**	**	**	**	85,9%	26,5%	27,3%	**	**	**
Overall survival	87,8%	83,3%	75,0%	No death	**	**	**	**	90,9%	51,1%	52,5%	**	**	**
Genetic characteristics														
Concurrent primary alterations		1 IGHr	-	-	-	1 IGHr	-	-	-		1 MYH9::IL2RB	1 P2RY8::CRLF2	1 P2RY8::CRLF2	-
Secondary alterations (CNA)														
EBF1 deletion (N;%)	2	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)
IKZF1 deletion (N;%)	7	3 (43)	1 (14)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (43)	9	6 (67)	1 (11)	1 (11)	1 (11)
JAK2 deletion (N;%)	3	0 (0)	2 (67)	1 (33)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2	1 (50)	0 (0)	1 (50)	0 (0)
CDKN2A/B deletion (N;%)	9	0 (0)	3 (33)	1 (11)	0 (0)	2 (23)	0 (0)	0 (0)	3 (33)	7	5 (71)	0 (0)	2 (29)	0 (0)
PAX5 deletion (N;%)	11	1 (9)	3 (27)	1 (9)	0 (0)	1 (9)	0 (0)	0 (0)	5 (46)	6	5 (83)	0 (0)	1 (17)	0 (0)
ETV6 deletion (N;%)	6	4 (66)	0 (0)	0 (0)	1 (17)	1 (17)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3	2 (67)	0 (0)	1 (33)	0 (0)
BTG1 deletion (N;%)	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3	2 (67)	0 (0)	0 (0)	1 (33)
RB1 deletion (N;%)	7	2 (29)	1 (14)	0 (0)	1 (14)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (43)	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
PAR1 deletion (N;%)	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3	3 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Median number of deletions	1	2,5	3	1,5	0	2	0	0	0	2	2,5	2	3	2
Median number of mutations	2	2	3,5	2	1	3	0	2	1	1,5	2,5	1	3	0
Diagnosis methods (N/total analyzed)														
Karyotype	3	NA	2/2	NA	1/2	NA	NA	NA	NA	2	NA	NA	NA	NA
FISH	8	3/6	2/2	NA	3/3	NA	0/0	NA	0/20	12	7/10	3/3	1/2	1/1
t-NGS	12	5/6	3/4	3/3	0/3	NA	0/0	1/1	0/16	14	10/10	1/3	2/2	1/1
OGM	5	-	1/1	-	-	3	1/1	-	0/5	1	-	-	1/1	-

* Only patients treated homogeneously with the SEHOP-PETHEMA 2013 protocol.

** Outcome rates could not be estimated because a 5-year follow-up was not reached.

NA: not applicable.

Article II. *Is Acute Lymphoblastic Leukemia with Mature B Cell Phenotype and KMT2A Rearrangements A New Entity? A Systematic Review And Meta-Analysis*

L'associació entre el fenotip de cèl·lules B madures i els reordenaments de *KMT2A* en la leucèmia limfoblàstica aguda és una troballa molt rara. Aquesta identificació identifica un grup de pacients amb característiques clíniques i biològiques similars, clarament diferents de l'entitat leucèmia/limfoma limfoblàstic de cèl·lules B amb t(v;11q23)/*KMT2A* reordenat, que típicament presenta un fenotip de cèl·lules pro B immadures.

Descrivim les característiques clíniques i biològiques, l'evolució de la malaltia de tres pacients pediàtrics amb LLA amb aquestes característiques tractats en el nostre centre, i revisem 28 casos prèviament descrits a la literatura. La majoria dels casos es produeixen en nens menors de 2 anys, presentant un fenotip de cèl·lules B madures que expressen uniformement IgM citoplasmàtica i de superfície amb restricció de cadena lleugera lambda, amb una coexpressió heterogènia d'antígens d'immaduresa. Els pacients no presenten reordenaments de *MYC* i tots mostren anomalies de *KMT2A*, amb un 76% presentant t(9;11)(p21;q23)/*MLLT3::KMT2A*. Aquests pacients tenen un pronòstic clínic desfavorable i una taxa de recaiguda del 48%.

Hidalgo-Gómez, G., Palacio-Garcia, C., Gallur, L., Blanco, A., Tazón-Vega, B., Saumell, S., Martínez, N., Murillo, L., Murciano, T., Velasco, P., Bosch, F., Diaz-Heredia, C., & Ortega, M. (2021). Is acute lymphoblastic leukemia with mature B-cell phenotype and *KMT2A* rearrangements a new entity? A systematic review and meta-analysis. *Leukemia & lymphoma*, 62(9), 2202–2210

DOI: [10.1080/10428194.2021.1907375](https://doi.org/10.1080/10428194.2021.1907375)

Article III. *Clonal Heterogeneity and Genomic Evolution in Intrachromosomal Amplification of Chromosome 21: A Case Report*

L'amplificació intracromosòmica del cromosoma 21 (iAMP21) és una anomalia genètica rara present en el 2% de la leucèmia limfoblàstica aguda de cèl·lules B en nens, que es defineix per la presència de tres o més còpies del gen *RUNX1* en un únic cromosoma 21 alterat. Tradicionalment, es considera que iAMP21 és una alteració genètica primerenca i persistent. Tot i que la seva heterogeneïtat és ben coneguda, hi ha pocs casos en els quals s'han estudiat mostres longitudinals des del diagnòstic fins a la recaiguda en els mateixos pacients. Els casos reportats no mostren canvis en el perfil genòmic entre aquests dos estats. Es descriu un cas que presenta un escenari únic on el nombre de còpies de iAMP21 disminueix en la recaiguda en comparació amb el diagnòstic, qüestionant les nocions anteriors sobre la seva amplificació progressiva.

Aquest cas destaca la complexitat i l'evolució del iAMP21 en la LLA, suggerint que la definició actual de iAMP21 pot necessitar ser ampliada per a incloure una gamma més àmplia de perfils genòmics. La disminució en l'estat de còpia de iAMP21 en la recaiguda subratlla la importància de realitzar anàlisis genòmiques exhaustives per a comprendre la dinàmica clonal i adaptar les estratègies de tractament.

Hidalgo-Gómez, G., Mingueta, A., Tazón-Vega, B., Ribera, J., Galián, J. A., Martínez-Banaclocha, H., García-Garay, M., Velasco, P., Fuster-Soler, J. L., Armengol, G., & Ortega, M. (2024). Clonal heterogeneity and genomic evolution in intrachromosomal amplification of chromosome 21: A case report. *British journal of haematology*, 204(6), 2512–2515

DOI: [10.1111/bjh.19485](https://doi.org/10.1111/bjh.19485)

4. DISCUSSió

Els resultats presentats en aquesta tesi permeten aprofundir en el coneixement de la genètica de la leucèmia limfoblàstica aguda B pediàtrica. En el primer treball (actualment en revisió), s'estudia d'una sèrie de pacients pediàtrics diagnosticats de LLA-B al nostre centre (n=175) mitjançant tècniques de citogenètica convencional, FISH, MLPA, NGS i OGM. Es van poder classificar la gran majoria dels pacients (83%), cosa que va permetre proposar un algoritme diagnòstic idoni per a l'estudi de les LLA-B. A més, es va estudiar l'evolució d'aquesta sèrie de pacients, analitzant les taxes de supervivència de cadascun dels subtipus genètics i el paper de les alteracions secundàries, observant algunes diferències respecte a les dades prèviament publicades.

En el segon treball¹⁶², s'estudia un grup de pacients molt concret amb característiques clíniques i biològiques específiques: pacients amb leucèmia limfoblàstica aguda amb fenotip B madur i reordenaments de *KMT2A*. A més de publicar els resultats dels nostres pacients amb aquestes característiques úniques, es realitza una revisió bibliogràfica i un metaanàlisi sobre l'evolució d'aquest grup de pacients.

En el tercer treball¹⁶³, s'investiga el subtipus específic de LLA-B amb *iAMP21*. A partir d'un cas concret, s'apliquen diferents tècniques genètiques per fer un estudi complet dels clons presents en el diagnòstic i la recaiguda, obtenint una visió detallada de la dinàmica de l'evolució genòmica durant la progressió de la malaltia.

4.1. Avaluació de les tècniques diagnòstiques empleades en la classificació genètica de la LLA-B

El nostre estudi destaca la importància d'integrar múltiples tècniques per aconseguir un diagnòstic genètic precís de la LLA-B pediàtrica. La combinació de cariotip, FISH, MLPA, NGS dirigida (t-NGS) i OGM va permetre classificar el 83% dels pacients en 17 subtipus genètics diferents.

Dels 175 casos de LLA-B estudiats, es va realitzar cariotip i FISH en tots els pacients, obtenint resultats avaluable en el 92% i el 93,1% dels casos, respectivament. El MLPA es va dur a terme retrospectivament en 120 pacients amb el kit P335 i en 26 pacients amb LLA-B sense un subtipus genètic definit amb el kit P327. L'estudi t-NGS es va realitzar en

84 pacients, centrant-se en els subtipus *BCR::ABL1-like* i B-other. L'OGM es va aplicar a 11 pacients sense diagnòstic i amb material criopreservat disponible. Mentre que, en 12 pacients no hi havia mostres disponibles per completar l'estudi i realitzar un diagnòstic genètic complet.

Classificant les tècniques per complexitat creixent (cariotip < FISH < t-NGS < OGM), les tècniques més senzilles, cariotip i FISH, van permetre classificar el 73% dels pacients en un subtipus genètic definit. La NGS i l'OGM van poder determinar un 10% adicional dels casos, millorant significativament el rendiment diagnòstic, especialment en casos amb resultats citogenètics incomplets.

Les tècniques tradicionals van ser efectives per detectar anomalies comunes com aneuploidies, iAMP21 i la majoria de translocacions recurrents, com *ETV6::RUNX1*, *t(1;19)/TCF3::PBX1* i *t(9;22)/BCR::ABL1*. No obstant això, cada tècnica té les seves limitacions. Per exemple, la FISH no va detectar alguns casos de *P2RY8::CRLF2* (4/10), reordenaments de *ZNF384* (3/6) i la fusió *KMT2A::AFF3* (1/1); mentre que la t-NGS tampoc va detectar reordenaments com *IGH::CRLF2* (1/1), *KMT2A::UPS2* (1/1) o de *ZNF384* (1/6). Això subratlla que els reordenaments que impliquen *KMT2A* requereixen la confirmació mitjançant múltiples tècniques a causa de la seva complexitat. De manera similar, l'alta heterogeneïtat dels subtipus *BCR::ABL1-like* i B-other fa que sigui necessari utilitzar diverses tècniques per a un diagnòstic precís.

Tot i això, encara que el 58% dels casos de B-other van romandre sense classificar, aquest resultat és comparable al d'altres estudis grans, com el de Schwab i col·laboradors³⁵, on fins i tot utilitzant WGS, el 53% van quedar sense classificar.

En resum, el cariotip i la FISH són tècniques robustes i accessibles que permeten una avaluació ràpida de la majoria de les anomalies cromosòmiques, permeten la classificació genètica de la majoria de pacients. No obstant això, tècniques més avançades com la NGS, tot i tenir un cost més elevat i no estan disponibles en tots els laboratoris, són necessàries per completar l'estudi genètic i detectar biomarcadors que només es poden determinar mitjançant tècniques moleculars (com *PAX5* P80R o *IKZF1* N159Y). L'OGM és relativament nova i encara no està implementada en la majoria de laboratoris, té un cost elevat i requereix formació especialitzada, però ofereix bons

resultats en l'estudi de variants estructurals i CNV en un sol anàlisi. Malgrat això, no detecta tots els biomarcadors presents en la LLA^{164,165}, especialment aquells que afecten regions centromèriques o telomèriques¹⁶⁶, com els reordenaments de *DUX4* o *CRLF2*.

En definitiva, cap mètode és capaç de capturar tota la complexitat genètica de la LLA-B de forma única. Per tant, és fonamental adoptar un enfocament combinat per analitzar de manera exhaustiva tot el perfil genètic de la leucèmia, establir un diagnòstic precís i comprendre la dinàmica i evolució clonal de la malaltia. Una bona estratègia, accessible i ràpida per a tots els laboratoris, podria ser començar amb cariotip i FISH, i si no es detecten anomalies genètiques definidores, continuar l'estudi amb NGS. Si és necessari, es podria ampliar amb OGM o tècniques més avançades com el WGS o RNA-seq.

4.2. Alteracions citogenètiques primàries de la LLA-B

Tal com es descriu a la literatura, el 71% dels pacients de la nostra sèrie van presentar anomalies recurrents primàries clàssiques, mentre que el 29% restant es van classificar com a B-other. En concret, les anomalies es van distribuir, per freqüència, de la següent manera: alta hiperdiploïdia (26%), *ETV6::RUNX1* (21%), *BCR::ABL1-like* (10%), reordenaments de *KMT2A* (5%), *TCF3::PBX1* (3%), *BCR::ABL1* (2%), *iAMP21* (2%) i hipodiploïdia (2%). Dins del grup B-other, es van identificar set subtipus genètics concrets, ordenats per freqüència: reordenaments de *ZNF384* (3%), alteracions de *PAX5* (2%), *PAX5 P80R* (2%), reordenaments d'*IGH* (2%), reordenaments de *DUX4* amb deleció d'*ERG* (2%), reordenaments de *NUTM1* (<1%) i la mutació *IKZF1 N159Y* (<1%). La distribució de la majoria dels subtipus genètics identificats va coincidir amb estudis previs^{5,6,35,70,167}. No obstant això, *DUX4r*, *ZNF384r* i *PAX5alt* es van observar amb una freqüència més baixa en el nostre estudi en comparació amb l'interval reportat (2% vs 4-7%, 3% vs 6% i 2% vs 10%, respectivament)^{5,6,35,70,167}. Cal destacar que els reordenaments de *DUX4* no es van identificar directament amb cap de les tècniques utilitzades; tots els casos detectats es van inferir a partir de la deleció d'*ERG*.

A més, no es van identificar casos de reordenaments de *MEF2D* ni fusions *ETV6::RUNX1-like*, malgrat que habitualment es troben en el 2-4% i el 2-3% de les LLA-B pediàtriques^{5,35}. Tot i utilitzar tècniques amb cobertura suficient, la falta d'identificació d'aquests subtipus

podria ser deguda a variacions en les poblacions estudiades, ja que la ubicació geogràfica o l'ètnia poden influir en la prevalença de certs subtipus¹⁶⁸. Tampoc es van identificar casos de *TCF3::HLF*, *ZNF384-like*, *BCL/MYC*, *ZEB2 H1038R/IGH::CEBPE* ni *CDX2/UBTF*, però tots ells es troben en molt baixa freqüència (<1%)^{5,35}, per la qual cosa no és d'estranyar que no estiguin presents en la nostra sèrie.

L'estudi també identifica la presència d'alteracions genètiques recurrents concurrents, fet que coincideix amb observacions prèvies¹⁶⁷. El reconeixement d'aquestes alteracions concurrents, com els reordenaments de *CRLF2* amb *iAMP21*, *ETV6::RUNX1* o amb altres fusions *BCR::ABL1-like*, així com el cariotip hiperdiploide amb *ETV6::RUNX1* i *BCR::ABL1*, és crucial per garantir un diagnòstic genètic precís i una estratificació de risc adequada. En aquests casos, tant els reordenaments de *CRLF2* com el cariotip hiperdiploide són de naturalesa subclonal.

4.2.1. LLA-B amb iAMP21

En la nostra sèrie es van identificar quatre casos d'iAMP21, la majoria en pacients de sexe masculí (4:1), amb una edat mediana de 9,5 anys i un baix recompte de glòbuls blancs (mediana de $4,4 \times 10^9/L$), concordant amb el que es descriu a la literatura^{6,25,39}. Només un pacient va recaure, i amb una mediana de seguiment de 83 mesos, actualment tots estan vius i sense malaltia activa. Habitualment, l'iAMP21 s'ha associat a un mal pronòstic i a altes taxes de recaiguda, tot i que s'ha observat una millora amb tractaments intensius^{54,55}. No obstant això, en el protocol SEHOP-PETHEMA 2013³², aquest subtipus genètic es classifica dins del grup de risc intermedi. En concret, els nostres pacients es van tractar segons el risc intermedi (n=2) i alt (n=2, classificats per la MMR a dia +14 superiors al 20%). Malgrat això, sembla que la intensitat del tractament de risc intermedi ha estat suficient per tractar eficientment aquests pacients.

La LLA-B amb iAMP21 presenta la mediana més alta de variants estructurals i càrrega mutacional respecte a la resta de subtipus de LLA⁶⁴. No obstant això, no hem pogut confirmar aquest fet en la nostra sèrie, ja que només disposàvem de material per a l'estudi d'un únic pacient, el qual, de fet, no presentava cap mutació acompanyant.

A nivell del grup cooperatiu espanyol, vam col·laborar en l'estudi d'un cas clínic que es descriu al tercer treball¹⁶³, on s'introdueix un aspecte interessant de iAMP21 en la leucèmia limfoblàstica aguda pediàtrica. Es presenta una situació no descrita prèviament, on l'estat del nombre de còpies de iAMP21 disminueix en la recaiguda en comparació amb el diagnòstic. Tradicionalment, es considera que l'iAMP21 és una alteració genètica primària i persistent^{25,58}, associada a un perfil genètic característic⁵⁶, on l'estat del número de còpies pot variar a mesura que progressa la malaltia, però sempre descrivint-se un increment del CNV en la zona amplificada⁵⁷. Així, les troballes del nostre cas, amb la disminució del nombre de còpies a la recaiguda, planteja preguntes sobre el clon original i la dinàmica de l'evolució genòmica durant la progressió de la malaltia, qüestionant la consistència de iAMP21 com un esdeveniment impulsor en la leucemogènesi.

L'extensa heterogeneïtat observada en l'iAMP21 suggereix que aquesta alteració no és fixa, sinó que pot evolucionar amb el temps. En el nostre cas, tot i que la disminució del número de còpies en la recaiguda, els punts d'amplificació i deleció del cromosoma 21 es mantenen, suggerint la persistència del clon iAMP21, però amb un perfil de CNV baix. Això, junt amb el fet que l'iAMP21 i l'alta hiperdiploïdia es situen adjacents en els estudis d'expressió gènica^{34,56}, pot indicar que els guanys del cromosoma 21 tenen un paper crucial en la leucemogènesi. Així, la presència de tres còpies de la regió 21q, juntament amb altres alteracions secundàries, pot ser suficient per contribuir a la manifestació de la leucèmia tal i com hem pogut veure al nostre cas.

Amb tot això, la definició original de iAMP21 de l'OMS necessita ser ampliada. Tot i que la citogenètica i el FISH per *RUNX1* ajuda a identificar amb èxit la majoria dels casos típics de iAMP21, el perfil del nombre de còpies obtingut mitjançant tècniques com el SNP-array identifica amb èxit la gamma més extensa de perfils genòmics del cromosoma 21, permeten fer un diagnòstic més precís d'aquests casos.

4.2.2. LLA amb reordenaments de *KMT2A* i fenotip B madur

Dins dels pacients amb LLA-B i reordenaments de *KMT2A*, es va identificar un subgrup molt concret de tres pacients amb la $t(9;11)(p22;q23)/KMT2A::MLLT3$ i un fenotip B madur. Es va dur a terme una recerca bibliogràfica, trobant pocs casos prèviament descrits amb les mateixes característiques ($n=28$) i, juntament amb els casos de la nostra sèrie, es va fer una revisió extensa¹⁶². Aquest grup de pacients presenta característiques clíniques i biològiques distintives: són nens menors de 2 anys, amb cèl·lules blàstiques de morfologia FAB L1-L2 i expressió d'IgM citoplasmàtica i de superfície, predominantment tenen la fusió *KMT2A::MLLT3*, i s'associen amb un pronòstic molt desfavorable i altes taxes de recaiguda.

En comparació, cap dels casos mostra una morfologia FAB-L3 típica de la leucèmia/limfoma de cèl·lula B madura amb reordenament *MYC*, els quals poden mostrar una expressió variable de d'immunoglobulines de superfície i antígens immadurs¹⁶⁹. Tampoc tenen el fenotip pro-B típic de la LLA-B amb reordenament de *KMT2A*, ni el reordenament més comú d'aquestes leucèmies, la $t(4;11)/AFF1::KMT2A$. En canvi, el nostre grup de pacients presenta típicament el reordenament $t(9;11)/MLLT3::KMT2A$, que és més freqüent en la LMA i menys comú en la LLA (1% dels casos, predominant en nens majors d'un any i adults)⁶⁷. El pronòstic dels pacients amb reordenaments de *KMT2A* és dolent, especialment els infants i lleugerament millor en els casos pediàtrics (SG 48% i 69,8%, SLE 36,4% i 58,2%, respectivament)^{170,171}. Els nostres casos, independentment de l'edat, presentaven altes taxes de fracàs al tractament i un elevat risc de recaiguda (SG 46,8%, SLE 47,5% i IAR 74,3% als 2 anys).

En resum, el nostre estudi suggereix que els casos de LLA amb fenotip B madur i reordenaments de *KMT2A* són una entitat diferenciada que es distingeix tant de la LLA-B amb reordenaments de *KMT2A* com de la leucèmia/limfoma de Burkitt amb reordenaments de *MYC*. És molt important identificar correctament aquests pacients, ja que presenten un pronòstic extremadament desfavorable; malgrat que l'estratègia terapèutica òptima encara no està clara, essent necessaris més estudis per millorar el coneixement d'aquesta malaltia.

4.3. Alteracions secundàries de la LLA-B

Es van observar deleccions de gens rellevants en el 60% de la nostra cohort (mediana: 1 deleció). Les CNV més comunes van incloure deleccions en *ETV6* i 9p (incloent *CDKN2A/B* i *PAX5*) i deleccions *IKZF1*, similar al descrit en estudis previs^{41,172}. Es van observar certes deleccions coexistents, com *IKZF1* amb *PAR1* o *CDKN2A/B* amb *PAX5*.

L'associació entre els gens deleccionats i el subtipus genètic subjacent també és coherent amb la literatura⁴¹, amb deleccions d'*IKZF1*, *PAX5* i *PAR1* observades en pacients *BCR::ABL1-like*, deleccions de *PAX5* i *CDKN2A/B* en pacients B-other i deleccions d'*ETV6* en pacients *ETV6::RUNX1*. Curiosament, el nostre estudi també va identificar una associació entre la deleció *JAK2* i els subtipus d'alteracions de *PAX5* i *PAX5 P80R*; així com la deleció de *RB1* i el subgrup *ZNF384r*, la qual no va conduir a un pronòstic més desfavorable, a diferència del reportat anteriorment a la literatura⁴¹.

La nostra sèrie va presentar una mediana de dues mutacions per pacient, inferior a la mediana de quatre alteracions somàtiques descrites per Brady i col·laboradors¹⁶⁷. Els subtipus amb alteracions de *PAX5*, alta hiperdiploïdia i reordenaments de *DUX4* van mostrar el nombre més alt de mutacions (mediana 3-3,5). Les mutacions més freqüents trobades en la nostra cohort van ser en els gens *KRAS*, *NRAS* i *PAX5*, similar amb estudis previs¹⁶⁷. A més, vam trobar associacions específiques entre subtipus genètics i mutacions, com les fusions *CRLF2* amb mutacions en *JAK2* i els reordenaments de *ZNF384* amb mutacions en *EGFR* i *EZH2*.

Les mutacions de *TP53* i *NT5C2* es van trobar en el 16% dels pacients amb recaiguda, tot i que la majoria tenia un grup genètic de bon pronòstic (hiperdiploïdies elevades i *ETV6::RUNX1*), corroborant l'associació d'aquestes mutacions amb la resistència al tractament^{173,174}.

4.4. Pronòstic associats a les alteracions citogenètiques

En la leucèmia limfoblàstica aguda B pediàtrica s'han aconseguit excel·lents taxes de curació gràcies a l'aplicació de protocols adaptats al risc, a la detecció de la malaltia residual mesurable, i a la integració de noves teràpies dirigides i immunoteràpia amb els

règims de quimioteràpia tradicionals. Això ha millorat les taxes de supervivència, amb una supervivència global als 5 anys del 92% en nens⁵. A la nostra sèrie de pacients amb LLA-B tractats homogèniament segons les guies de tractament SEHOP-PETHEMA 2013, es van obtenir bones dades de supervivència als 5 anys, amb una SG del 88,9%, una SLE del 78,9% i una taxa de recaiguda del 17,4%.

Els resultats varien considerablement segons el grup de risc, amb resultats similars en els pacients de grup estàndard i intermedi, i pitjors taxes de supervivència en pacients d'alt risc. A més, el nostre anàlisi confirma el paper crític de la genètica en el pronòstic de la leucèmia limfoblàstica aguda. Els pacients van ser classificats en tres grups basats en el risc genètic: favorable (GEN-GR: hiperdiploïdia alta i *ETV6::RUNX1*), desfavorable (GEN-PR: hipodiploïdia, reordenaments de *KMT2A*, *BCR::ABL1*) i intermedi (GEN-IR: la resta d'alteracions genètiques no classificades). Les diferències entre aquests grups van ser significatives, amb excel·lents taxes de supervivència als 5 anys en els pacients de bon pronòstic i molt desfavorables en els pacients de mal pronòstic (GEN-GR: SG 98,5% i SLE 94,9%; GEN-IR: SG 83,0% i SLE 64,1%; GEN-PR: SG 38,1% i SLE 42,9%), similar als resultats prèviament descrits en la literatura^{5,6,70,175}.

Les taxes de supervivència dels grups de pronòstic favorable i desfavorable es van alinear amb els grups de risc del protocol SEHOP-PETHEMA 2013. En canvi, la supervivència del grup GEN-IR va ser notablement inferior a la del grup de risc intermedi del protocol (SG 83% vs SG 97%), suggerint que, independentment de la genètica, l'estratificació precisa basada en la resposta al tractament i l'edat afavoreix l'evolució d'aquest grup de pacients.

Globalment, els pacients classificats com a B-other tenien taxes de supervivència pròpies d'un risc intermedi (SG 87,8% i SLE 66,8% als 5 anys), però aquests resultats van variar segons el subgrup genètic específic. Per exemple, els subgrups *ZNF384r* i *PAX5 P80R* van mostrar resultats excel·lents, diferint del risc intermedi descrits prèviament per aquests subtipus³⁵. D'altra banda, els pacients amb *BCR::ABL1-like* amb reordenament de *CRLF2* van presentar un pronòstic molt desfavorable (SG 52,5% i SLE 26,5% als 5 anys), similar a subtipus típicament associats a mal pronòstic, com *KMT2Ar* i hipodiploïdia (SG del 50% als 5 anys).

Malgrat el que es descriu a la literatura^{42,172}, i probablement a causa de la mida reduïda de la mostra, les CNV no van mostrar diferències pronòstiques significatives en les taxes de supervivència en la nostra cohort. A més, a diferència dels adults³⁸, la presència de cariotip complexa no va mostrar rellevància pronòstica independent en la nostra cohort pediàtrica.

4.5. Limitacions i fortaleces de l'estudi

El nostre estudi presenta diversos punts forts i febles que val la pena destacar. Entre els punts forts, cal esmentar que la cohort de pacients és homogènia i ha estat tractada seguint el mateix protocol (SEHOP-PETHEMA 2013), cosa que ha permès una uniformitat en les dades i una comparació fiable entre els subgrups genètics. Un altre avantatge important ha estat la integració de múltiples tècniques diagnòstiques, com el cariotip, FISH, MLPA, t-NGS i OGM, la qual cosa ha permès una classificació genètica precisa de la LLA-B. A més, s'han pogut caracteritzar subgrups genètics rars, com els pacients amb reordenaments de *KMT2A* i fenotip B madur, proporcionant informació valuosa sobre la seva biologia i pronòstic. La combinació d'anàlisi prospectiva i retrospectiva ha permès verificar la viabilitat de les tècniques utilitzades en un laboratori diagnòstic de rutina, i els resultats obtinguts han estat en línia amb la literatura existent, la qual cosa reforça la validesa de l'estudi. A més, s'ha demostrat que l'ús de tècniques diagnòstiques més assequibles i àmpliament disponibles, com el cariotip i FISH, permet una aplicació pràctica en la majoria de laboratoris clínics, facilitant la transferència dels resultats a la pràctica diària.

No obstant això, l'estudi també presenta algunes limitacions. La mida de la mostra no és prou elevada per detectar alteracions genètiques poc freqüents ni per obtenir resultats estadísticament significatius en certs subgrups genètics, cosa que limita la generalització dels resultats. A més, no tots els pacients disposaven de material genètic suficient per completar l'estudi amb totes les tècniques disponibles, fet que ha provocat que un total de 12 pacients quedessin sense diagnòstic genètic complet. També s'ha d'esmentar que el panell comercial de NGS utilitzat (*Oncomine Childhood Cancer Research Assay*, ThermoFisher) no permet la detecció de certs reordenaments crítics, com els de *DUX4* o

IGH, limitant la capacitat de diagnòstic en alguns casos. Així mateix, l'OGM no detecta tots els reordenaments que es produeixen en regions subtelomèriques (p.e. *DUX4* o *CRLF2*), i no està disponible en tots els laboratoris i presenta un cost elevat, la qual cosa restringeix la seva utilització generalitzada. Finalment, tot i l'ús de tècniques avançades, l'estudi no incorpora anàlisis més àmplies com el WGS o RNA-seq, que podrien haver aportat una millor comprensió de l'evolució clonal i la complexitat genètica de la LLA-B.

4.6. Perspectives de futur

Aquest treball obre possibles noves línies d'investigació:

- ✓ **Aplicació de noves tècniques diagnòstiques per identificar correctament determinats biomarcadors genètics**, especialment en grups difícils d'identificar, com són els reordenament d'*IGH* o *DUX4*.
- ✓ **Col·laboració amb altres grups** per ampliar el nombre de casos estudiats i establir amb més precisió l'impacte pronòstic dels subtipus genètics.
- ✓ **Estudis d'expressió en pacients amb LLA amb reordenaments de *KMT2A* i fenotip B madur**, per tal d'entendre quins gens estan sobre o infraexpressats i identificar les vies cel·lulars alterades, cosa que permetria definir estratègies clíniques més apropiades.
- ✓ **Ampliar la sèrie de casos amb guanys de 21q** per confirmar si es tracta d'una iAMP21 segons els perfil de CNV.

5. CONCLUSIONS

1. La LLA-B pediàtrica presenta una elevada heterogeneïtat genètica. En el nostre estudi hem identificat 17 subtipus genètics diferents utilitzant una combinació de tècniques citogenètiques i moleculars.
2. L'aplicació de tècniques diagnòstiques com el cariotip, FISH, MLPA, t-NGS i OGM és fonamental per obtenir un diagnòstic genètic precís en la LLA-B. Cap tècnica és suficient per si sola, per tant, cal un enfocament integrat.
 - I. El cariotip i la FISH són tècniques robustes i accessibles que permeten una avaluació ràpida de la majoria d'anomalies cromosòmiques. Ens han permès classificar el 73% dels pacients.
 - II. La NGS és necessària per aconseguir una classificació genètica completa, però té limitacions per detectar algunes alteracions, com *DUX4* i *IGH*.
 - III. L'OGM té gran potencial per identificar variants estructurals complexes, però encara no està àmpliament implementat i té limitacions per detectar anomalies en regions centromèriques i telomèriques, com les alteracions de *CRLF2*.
 - IV. Específicament, els reordenaments de *KMT2A* requereixen confirmació amb diverses tècniques, ja que cap d'elles és prou precisa per detectar tots els casos.
3. El 71% dels pacients presentaven anomalies recurrents primàries clàssiques. El 29% restant es van classificar com a B-other, dins dels quals es van identificar set subtipus genètics.
 - I. Un 58% dels pacients amb LLA B-other no s'ha pogut classificar en cap dels subtipus genètics coneguts, un resultat que s'alinea amb altres sèries més àmplies.
4. Els pacients van presentar un nombre baix d'alteracions secundàries, amb una mediana d'una CNV i de dues mutacions per pacient. Aquestes alteracions no han mostrat un impacte pronòstic significatiu.
5. S'han detectat mutacions de *TP53* i *NT5C2* en el 16% dels pacients amb recaiguda, la majoria amb genètica de bon pronòstic, confirmant el paper d'aquestes mutacions en la resistència al tractament.

6. Els pacients amb reordenaments de *KMT2A* i fenotip B madur representen un subgrup distintiu. Són nens menors de 2 anys amb cèl·lules blàstiques FAB L1-L2, expressió IgM, i tenen la fusió *KMT2A::MLLT3*. Estan associats a mal pronòstic i altes taxes de recaiguda.
7. La definició original de iAMP21 necessita ser ampliada i incloure el perfil genòmic complet de la regió dels 21q.
8. Els resultats de supervivència de la nostra cohort són comparables a altres estudis. El pronòstic està fortament influenciat per les alteracions genètiques, amb grans diferències segons el subtipus genètic.
 - I. Destacar els casos de *BCR::ABL1-like* amb reordenaments *CRLF2*, que han presentat taxes de supervivència significativament inferiors, semblants als subtipus d'alt risc amb reordenament de *KMT2A* i hipodiploïdia.

6. BIBLIOGRAFIA

1. PDQ Pediatric Treatment Editorial Board. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ®): Health Professional Version. *PDQ Cancer Information Summaries* <https://www.cancer.gov/types/leukemia/hp/child-all-treatment-pdq> (2023).
2. Chang, J. H. C., Poppe, M. M., Hua, C. H., Marcus, K. J. & Esiashvili, N. Acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* **68**, (2021).
3. Nieto Cañete, A. et al. *Cáncer Infantil En España. Estadísticas 1980-2022. Registro Español de Tumores Infantiles (RETI-SEHOP)*. <http://www.uv.es/rnti> (2023).
4. Hu, Y. et al. Global burden and attributable risk factors of acute lymphoblastic leukemia in 204 countries and territories in 1990–2019: Estimation based on Global Burden of Disease Study 2019. *Hematol Oncol* **40**, 93–105 (2022).
5. Pagliaro, L. et al. Acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers* **10**, (2024).
6. Inaba, H. & Mullighan, C. G. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* vol. 105 2524–2539 Preprint at <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.247031> (2020).
7. Malouf, C. & Ottersbach, K. Molecular processes involved in B cell acute lymphoblastic leukaemia. *Cellular and Molecular Life Sciences* **75**, 417–446 (2017).
8. Rüchel, N. et al. In Utero Development and Immunosurveillance of B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Current Treatment Options in Oncology* vol. 23 543–561 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s11864-022-00963-3> (2022).
9. Bloom, M., Maciaszek, J. L., Clark, M. E., Pui, C. H. & Nichols, K. E. Recent advances in genetic predisposition to pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Expert Review of Hematology* vol. 13 55–70 Preprint at <https://doi.org/10.1080/17474086.2020.1685866> (2020).
10. Klcó, J. M. & Mullighan, C. G. *Advances in Germline Predisposition to Acute Leukaemias and Myeloid Neoplasms*. *Nature Reviews Cancer* vol. 21 (2021).
11. Wagener, R., Elitzur, S., Brozou, T. & Borkhardt, A. Functional damaging germline variants in ETV6, IKZF1, PAX5 and RUNX1 predisposing to B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Med Genet* **66**, (2023).
12. Arber, D. A. et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia: Integrating Morphological, Clinical, and Genomic Data. *Blood* (2022).
13. Järviäho, T. et al. Microdeletion of 7p12.1p13, including IKZF1, causes intellectual impairment, overgrowth, and susceptibility to leukaemia. *British Journal of Haematology* vol. 185 354–357 Preprint at <https://doi.org/10.1111/bjh.15494> (2019).
14. Churchman, M. L. et al. Germline Genetic IKZF1 Variation and Predisposition to Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell* **33**, 937–948.e8 (2018).

15. Auer, F. *et al.* Inherited susceptibility to pre B-ALL caused by germline transmission of PAX5 c.547G>A. *Leukemia* vol. 28 1136–1138 Preprint at <https://doi.org/10.1038/leu.2013.363> (2014).
16. Shah, S. *et al.* A recurrent germline PAX5 mutation confers susceptibility to pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* **45**, 1226–1231 (2013).
17. Duployez, N. *et al.* Germline PAX5 mutation predisposes to familial B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **137**, 1424–1428 (2021).
18. Nishii, R. *et al.* Molecular basis of ETV6-mediated predisposition to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **137**, (2021).
19. Brown, A. L., Hahn, C. N. & Scott, H. S. Secondary leukemia in patients with germline transcription factor mutations (RUNX1, GATA2, CEBPA). *Blood* **136**, 24–35 (2020).
20. Six, K. A. *et al.* B-cell acute lymphoblastic leukemia in patients with germline RUNX1 mutations. *Blood Adv* **5**, 3199–3202 (2021).
21. Latger-Cannard, V. *et al.* Haematological spectrum and genotype-phenotype correlations in nine unrelated families with RUNX1 mutations from the French network on inherited platelet disorders. *Orphanet J Rare Dis* **11**, (2016).
22. Li, Y. *et al.* Germline RUNX1 variation and predisposition to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Investigation* **131**, (2021).
23. Baruchel, A. *et al.* Down syndrome and leukemia: from basic mechanisms to clinical advances. *Haematologica* vol. 108 2570–2581 Preprint at <https://doi.org/10.3324/haematol.2023.283225> (2023).
24. Li, Y. *et al.* Constitutional and somatic rearrangement of chromosome 21 in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **508**, 98–102 (2014).
25. Harrison, C. J. Blood Spotlight on iAMP21 acute lymphoblastic leukemia (ALL), a high-risk pediatric disease. *Blood* **125**, 1383–1386 (2015).
26. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. (vol.2, 2017).
27. Alaggio, R. *et al.* The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* (2022) doi:10.1038/s41375-022-01620-2.
28. National Cancer Institute. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment–Health Professional Version. <https://www.cancer.gov/types/leukemia/hp/child-all-treatment-pdq> (2024).
29. Woessner Casas, S. & Florensa Brichs, L. *La Citología Óptica En El Diagnóstico Hematológico*. (2006).

30. Bennett, J. M. *et al.* The Morphological Classification of Acute Lymphoblastic Leukaemia: Concordance among Observers and Clinical Correlations. *Br J Haematol* **47**, 553–561 (1981).
31. Béné, M. C. *et al.* Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: A consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia* vol. 25 567–574 Preprint at <https://doi.org/10.1038/leu.2010.312> (2011).
32. SEHOP & PETHEMA. *Protocolo Para Leucemia Aguda Linfoblástica de La Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátricas (SEHOP) En Colaboración Con El Grupo PETHEMA LAL/SEHOP-PETHEMA 2013.* (2013).
33. Borowitz, M. J. *et al.* Comparison of diagnostic and relapse flow cytometry phenotypes in childhood acute lymphoblastic leukemia: Implications for residual disease detection: A report from the Children's Oncology Group. *Cytometry B Clin Cytom* **68B**, 18–24 (2005).
34. Gu, Z. *et al.* PAX5-driven subtypes of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* **51**, 296–307 (2019).
35. Schwab, C. *et al.* Integrative genomic analysis of childhood acute lymphoblastic leukaemia lacking a genetic biomarker in the UKALL2003 clinical trial. *Leukemia* **37**, 529–538 (2023).
36. Kimura, S. *et al.* Enhancer retargeting of CDX2 and UBTF::ATXN7L3 define a subtype of high-risk B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **139**, 3519–3531 (2022).
37. Duffield, A. S., Mullighan, C. G. & Borowitz, M. J. International Consensus Classification of acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Virchows Archiv* **482**, 11–26 (2023).
38. Moorman, A. V. *et al.* Prognostic impact of chromosomal abnormalities and copy number alterations in adult B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: a UKALL14 study. *Leukemia* **36**, 625–636 (2022).
39. Schwab, C. & Harrison, C. J. Advances in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia genomics. *Hemasphere* **2**, 1–9 (2018).
40. Lee, S. H. R., Li, Z., Tai, S. T., Oh, B. L. Z. & Yeoh, A. E. J. Genetic alterations in childhood acute lymphoblastic leukemia: Interactions with clinical features and treatment response. *Cancers* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cancers13164068> (2021).
41. Steeghs, E. M. P. *et al.* Copy number alterations in B-cell development genes, drug resistance, and clinical outcome in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Sci Rep* **9**, (2019).
42. Hamadeh, L. *et al.* Validation of the United Kingdom copy-number alteration classifier in 3239 children with B-cell precursor ALL. *Blood Adv* **3**, 148–157 (2019).
43. Ueno, H. *et al.* Landscape of driver mutations and their clinical impacts in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood Adv* **4**, 5165–5173 (2020).

44. Lejman, M., Chałupnik, A., Chilimoniuk, Z. & Dobosz, M. Genetic Biomarkers and Their Clinical Implications in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 23 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms23052755> (2022).
45. Woodward, E. L. *et al.* Clonal origin and development of high hyperdiploidy in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun* **14**, (2023).
46. Ramos-Muntada, M. *et al.* Clonal heterogeneity and rates of specific chromosome gains are risk predictors in childhood high-hyperdiploid B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Mol Oncol* **16**, 2899–2919 (2022).
47. Paulsson, K. *et al.* The genomic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* **47**, 672–676 (2015).
48. Haas, O. A. & Borkhardt, A. Hyperdiploidy: the longest known, most prevalent, and most enigmatic form of acute lymphoblastic leukemia in children. *Leukemia* vol. 36 2769–2783 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01720-z> (2022).
49. Enshaei, A., Vora, A., Harrison, C. J., Moppett, J. & Moorman, A. V. Defining low-risk high hyperdiploidy in patients with paediatric acute lymphoblastic leukaemia: a retrospective analysis of data from the UKALL97/99 and UKALL2003 clinical trials. *Lancet Haematol* **8**, e828–e839 (2021).
50. Malard, F. & Mohty, M. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet* vol. 395 1146–1162 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)33018-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)33018-1) (2020).
51. Panuciak, K. *et al.* Overview on Aneuploidy in Childhood B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 24 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms24108764> (2023).
52. Holmfeldt, L. *et al.* The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* **45**, 242–252 (2013).
53. Carroll, A. J. *et al.* Masked hypodiploidy: Hypodiploid acute lymphoblastic leukemia (ALL) mimicking hyperdiploid ALL in children: A report from the Children's Oncology Group. *Cancer Genet* **238**, 62–68 (2019).
54. Moorman, A. V. *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. *Journal of Clinical Oncology* **31**, 3389–3396 (2013).
55. Heerema, N. A. *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. *Journal of Clinical Oncology* **31**, 3397–3402 (2013).
56. Gao, Q. *et al.* The genomic landscape of acute lymphoblastic leukemia with intrachromosomal amplification of chromosome 21. *Blood* **142**, 711–723 (2023).

57. Ivanov Öfverholm, I. *et al.* Overexpression of chromatin remodeling and tyrosine kinase genes in iAMP21-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* **61**, 604–613 (2020).
58. Rand, V. *et al.* Genomic characterization implicates iAMP21 as a likely primary genetic event in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **117**, 6848–6855 (2011).
59. Baughn, L. B., Meredith, M. M., Oseth, L., Smolarek, T. A. & Hirsch, B. SH2B3 aberrations enriched in iAMP21 B lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet* **226–227**, 30–35 (2018).
60. Harrison, C. J. *et al.* An international study of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): Cytogenetic characterization and outcome. *Leukemia* **28**, 1015–1021 (2014).
61. Sinclair, P. B. *et al.* SH2B3 inactivation through CN-LOH 12q is uniquely associated with B-cell precursor ALL with iAMP21 or other chromosome 21 gain. *Leukemia* **33**, 1881–1894 (2019).
62. Koleilat, A. *et al.* Characterization of unusual iAMP21 B-lymphoblastic leukemia (iAMP21-ALL) from the Mayo Clinic and Children’s Oncology Group. *Genes Chromosomes Cancer* **61**, 710–719 (2022).
63. Hormann, F. M. *et al.* Integrating copy number data of 64 iAMP21 BCP-ALL patients narrows the common region of amplification to 1.57 Mb. *Front Oncol* **13**, (2023).
64. Studd, J. B. *et al.* Cancer drivers and clonal dynamics in acute lymphoblastic leukaemia subtypes. *Blood Cancer J* **11**, 1–10 (2021).
65. Ryan, S. L. *et al.* The role of the RAS pathway in iAMP21-ALL. *Leukemia* **30**, 1824–1831 (2016).
66. Fournier, B. *et al.* B-ALL With t(5;14)(q31;q32); IGH-IL3 Rearrangement and Eosinophilia: A Comprehensive Analysis of a Peculiar IGH-Rearranged B-ALL. *Front Oncol* **9**, (2019).
67. Meyer, C. *et al.* The KMT2A recombinoe of acute leukemias in 2023. *Leukemia* **37**, 988–1005 (2023).
68. Górecki, M. *et al.* Updates in KMT2A Gene Rearrangement in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Biomedicines* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/biomedicines11030821> (2023).
69. El Chaer, F., Keng, M. & Ballen, K. K. MLL-Rearranged Acute Lymphoblastic Leukemia. *Current Hematologic Malignancy Reports* vol. 15 83–89 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s11899-020-00582-5> (2020).
70. Iacobucci, I., Kimura, S. & Mullighan, C. G. Clinical Medicine Biologic and Therapeutic Implications of Genomic Alterations in Acute Lymphoblastic Leukemia. *J. Clin. Med* **10**, 3792 (2021).

71. Attarbaschi, A. *et al.* Outcomes of Childhood Noninfant Acute Lymphoblastic Leukemia With 11q23/KMT2A Rearrangements in a Modern Therapy Era: A Retrospective International Study. *J Clin Oncol* **41**, 1404–1422 (2022).
72. Østergaard, A. *et al.* ETV6::RUNX1 Acute Lymphoblastic Leukemia: how much therapy is needed for cure? *Leukemia* (2024) doi:10.1038/s41375-024-02287-7.
73. Sun, C., Chang, L. & Zhu, X. *Pathogenesis of ETV6/RUNX1-Positive Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and Mechanisms Underlying Its Relapse*. *Oncotarget* vol. 8 www.impactjournals.com/oncotarget/ (2017).
74. Marcotte, E. L., Spector, L. G., Mendes-de-Almeida, D. P. & Nelson, H. H. The Prenatal Origin of Childhood Leukemia: Potential Applications for Epidemiology and Newborn Screening. *Frontiers in Pediatrics* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fped.2021.639479> (2021).
75. Ma, Y. *et al.* Developmental timing of mutations revealed by whole-genome sequencing of twins with acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 7429–7433 (2013).
76. Greaves, M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nature Reviews Cancer* vol. 18 471–484 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0015-6> (2018).
77. Kaczmarek, A., Derebas, J., Pinkosz, M., Niedźwiecki, M. & Lejman, M. The Landscape of Secondary Genetic Rearrangements in Pediatric Patients with B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia with t(12;21). *Cells* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cells12030357> (2023).
78. Chen, D. *et al.* RAG1 co-expression signature identifies ETV6-RUNX1-like B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in children. *Cancer Med* **10**, 3997–4003 (2021).
79. Lilljebjörn, H. *et al.* Identification of ETV6-RUNX1-like and DUX4-rearranged subtypes in paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun* **7**, (2016).
80. Zaliova, M. *et al.* ETV6/RUNX1-like acute lymphoblastic leukemia: A novel B-cell precursor leukemia subtype associated with the CD27/CD44 immunophenotype. *Genes Chromosomes Cancer* **56**, 608–616 (2017).
81. Lilljebjörn, H. & Fioretos, T. New oncogenic subtypes in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **130**, 1395–1401 (2017).
82. Li, J. *et al.* Emerging molecular subtypes and therapeutic targets in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Front Med* **15**, 347–371 (2021).
83. IBSAL - Institute for Biomedical Research of Salamanca. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. <http://atlasgeneticsoncology.org/>.
84. Slayton, W. B. *et al.* Dasatinib Plus Intensive Chemotherapy in Children, Adolescents, and Young Adults With Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia: Results of Children's Oncology Group Trial AALL0622. *J Clin Oncol* **36**, 2306–2314 (2018).

85. Zuna, J. *et al.* Minimal residual disease in BCR::ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia: different significance in typical ALL and in CML-like disease. *Leukemia* **36**, 2793–2801 (2022).
86. Kim, J. C. *et al.* Transcriptomic classes of BCR-ABL1 lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* **55**, 1186–1197 (2023).
87. Iacobucci, I. & Roberts, K. G. Genetic alterations and therapeutic targeting of Philadelphia-like acute lymphoblastic leukemia. *Genes (Basel)* **12**, (2021).
88. Perez-Andreu, V. *et al.* Inherited GATA3 variants are associated with Ph-like childhood acute lymphoblastic leukemia and risk of relapse. *Nat Genet* **45**, 1494–1498 (2013).
89. Jain, S. & Abraham, A. BCR-ABL1-like B-acute lymphoblastic leukemia/lymphoma: A comprehensive review. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* vol. 144 150–155 Preprint at <https://doi.org/10.5858/arpa.2019-0194-RA> (2020).
90. Conant, J. L. & Czuchlewski, D. R. BCR-ABL1-like B-lymphoblastic leukemia/lymphoma: Review of the entity and detection methodologies. *Int J Lab Hematol* **41**, 126–130 (2019).
91. Tasian, S. K., Loh, M. L. & Hunger, S. P. Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **130**, 2064–2072 (2017).
92. Pui, C. H. Precision medicine in acute lymphoblastic leukemia. *Frontiers of Medicine* vol. 14 689–700 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s11684-020-0759-8> (2020).
93. Gil, J. V. *et al.* Comprehensive detection of CRLF2 alterations in acute lymphoblastic leukemia: a rapid and accurate novel approach. *Front Mol Biosci* **11**, (2024).
94. Boer, J. M. & den Boer, M. L. BCR-ABL1-like acute lymphoblastic leukaemia: From bench to bedside. *Eur J Cancer* **82**, 203–218 (2017).
95. Ofran, Y. & Izraeli, S. BCR-ABL (Ph)-like acute leukemia—Pathogenesis, diagnosis and therapeutic options. *Blood Rev* **31**, 11–16 (2017).
96. Lee, S. H. R. *et al.* Association of Genetic Ancestry With the Molecular Subtypes and Prognosis of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *JAMA Oncol* **8**, 354 (2022).
97. Burmeister, T. *et al.* Molecular characterization of TCF3::PBX1 chromosomal breakpoints in acute lymphoblastic leukemia and their use for measurable residual disease assessment. *Sci Rep* **13**, (2023).
98. Zhang, H. *et al.* Prognostic factors of childhood acute lymphoblastic leukemia with TCF3::PBX1 in CCCG-ALL-2015: A multicenter study. *Cancer* **129**, 1691–1703 (2023).
99. Hunger, S. P., Devaraj, P. E., Foroni, L., Secker-Walker, L. M. & Cleary, M. L. *Two Types of Genomic Rearrangements Create Alternative E2A-HLF Fusion Proteins in t(17; 19)-ALL*. *Blood* vol. 83 <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/83/10/2970/612996/2970.pdf> (1994).

100. Tasian, S. K. TCF3::HLF acute lymphoblastic leukemia: still challenging to cure thirty years later. *Haematologica* vol. 108 1713–1714 Preprint at <https://doi.org/10.3324/haematol.2023.283148> (2023).
101. Fischer, U. *et al.* Genomics and drug profiling of fatal TCF3-HLF-positive acute lymphoblastic leukemia identifies recurrent mutation patterns and therapeutic options. *Nat Genet* **47**, 1020–1029 (2015).
102. Zhang, J. *et al.* Deregulation of DUX4 and ERG in acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* **48**, 1481–1489 (2016).
103. Zaliouva, M. *et al.* ERG deletions in childhood acute lymphoblastic leukemia with DUX4 rearrangements are mostly polyclonal, prognostically relevant and their detection rate strongly depends on screening method sensitivity. *Haematologica* **104**, 1407–1416 (2019).
104. Rehn, J. A., O’connor, M. J., White, D. L. & Yeung, D. T. DUX hunting—clinical features and diagnostic challenges associated with DUX4-rearranged leukaemia. *Cancers* vol. 12 1–15 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cancers12102815> (2020).
105. Schinnerl, D. *et al.* CD371 cell surface expression: A unique feature of DUX4-rearranged acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* vol. 104 e352–e355 Preprint at <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.214353> (2019).
106. van Outersterp, I. *et al.* Characterization of a novel MEF2D-BCL9 fusion-positive acute lymphoblastic leukemia cell line. *Haematologica* **108**, (2023).
107. Gu, Z. *et al.* Genomic analyses identify recurrent MEF2D fusions in acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun* **7**, 1–10 (2016).
108. Cao, H. Y. *et al.* Genetic and clinical characteristics of acute B-cell lymphoblastic leukemia with MEF2D fusions and report of two novel MEF2D rearrangements. *Ann Hematol* (2024) doi:10.1007/s00277-024-05868-9.
109. Hirabayashi, S. *et al.* ZNF384-related fusion genes define a subgroup of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with a characteristic immunotype. *Haematologica* **102**, 118–129 (2017).
110. Sudutan, T. *et al.* Zinc finger protein 384 (ZNF384) impact on childhood mixed phenotype acute leukemia and B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* **63**, 2931–2939 (2022).
111. Alexander, T. B. *et al.* The genetic basis and cell of origin of mixed phenotype acute leukaemia. *Nature* **562**, 373–406 (2018).
112. Oberley, M. J. *et al.* Myeloid lineage switch following chimeric antigen receptor T-cell therapy in a patient with TCF3-ZNF384 fusion-positive B-lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* **65**, (2018).

113. Zhu, L., Bai, W., Cheng, Q. & Fang, J. ZNF384-Related Fusion Genes in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Control* vol. 30 Preprint at <https://doi.org/10.1177/10732748231182787> (2023).
114. Migita, N. A. *et al.* Classification and genetics of pediatric B-other acute lymphoblastic leukemia by targeted RNA sequencing. *Blood Adv* **7**, 2957–2971 (2023).
115. Hirabayashi, S. *et al.* Clinical characteristics and outcomes of B-ALL with ZNF384 rearrangements: a retrospective analysis by the Ponte di Legno Childhood ALL Working Group. *Leukemia* **35**, 3272–3277 (2021).
116. Boer, J. M. *et al.* Favorable outcome of NUTM1-rearranged infant and pediatric B cell precursor acute lymphoblastic leukemia in a collaborative international study. *Leukemia* **35**, 2978–2982 (2021).
117. Bomken, S. *et al.* Molecular characterization and clinical outcome of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with IG-MYC rearrangement. *Haematologica* **108**, 717–731 (2023).
118. Wagener, R. *et al.* IG-MYC+ neoplasms with precursor B-cell phenotype are molecularly distinct from Burkitt lymphomas. *Blood* **128**, 2280–2285 (2018).
119. Jia, Z. & Gu, Z. PAX5 alterations in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Frontiers in Oncology* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1023606> (2022).
120. Passet, M. *et al.* PAX5 P80R mutation identifies a novel subtype of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with favorable outcome. *Blood* **133**, 280–284 (2019).
121. Bastian, L. *et al.* PAX5 biallelic genomic alterations define a novel subgroup of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **33**, 1895–1909 (2019).
122. Novakova, M. *et al.* DUX4r, ZNF384r and PAX5-P80R mutated B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia frequently undergo monocytic switch. *Haematologica* **106**, 2066–2075 (2021).
123. Li, J. F. *et al.* Transcriptional landscape of B cell precursor acute lymphoblastic leukemia based on an international study of 1,223 cases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E11711–E11720 (2018).
124. Zaliouva, M. *et al.* Frequency and prognostic impact of ZEB2 H1038 and Q1072 mutations in childhood B-other acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* vol. 106 886–890 Preprint at <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.249094> (2021).
125. Passet, M. *et al.* Concurrent CDX2 cis-deregulation and UBTF::ATXN7L3 fusion define a novel high-risk subtype of B-cell ALL. *Blood* **139**, 3505–3518 (2022).
126. Paietta, E. *et al.* Molecular classification improves risk assessment in adult BCR-ABL1-negative B-ALL. *Blood* **138**, 948–958 (2021).
127. Chiaretti, S. *et al.* ZNF384 rearrangement is the most frequent genetic lesion in adult PH-negative and Ph-like-negative B-other acute lymphoblastic leukemia. Biological and clinical

- findings. *Leukemia and Lymphoma* vol. 64 483–486 Preprint at <https://doi.org/10.1080/10428194.2022.2148217> (2023).
128. Zaliouva, M. *et al.* A novel class of ZNF384 aberrations in acute leukemia. *Blood Adv* **5**, 4393–4397 (2021).
 129. Moorman, A. V. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **101**, 407–416 (2016).
 130. Iacobucci, I. & Mullighan, C. G. Genetic basis of acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology* vol. 35 975–983 Preprint at <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.70.7836> (2017).
 131. Roberts, K. G. Genetics and prognosis of ALL in children vs adults. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* (2018) doi:10.1182/asheducation-2018.1.137.
 132. Schwab, C. J. *et al.* Genes commonly deleted in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: Association with cytogenetics and clinical features. *Haematologica* **98**, 1081–1088 (2013).
 133. Alexander, T. B. & Mullighan, C. G. Molecular Biology of Childhood Leukemia. (2021) doi:10.1146/annurev-cancerbio-043020.
 134. Stanulla, M., Eì Ene Cavé, H. ´, Cavé, C. & Moorman, A. V. IKZF1 deletions in pediatric acute lymphoblastic leukemia: still a poor prognostic marker? *Blood Spotlight* **135**, 252–260 (2020).
 135. Stanulla, M. *et al.* IKZF1 plus Defines a New Minimal Residual Disease–Dependent Very-Poor Prognostic Profile in Pediatric B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology* (2018) doi:10.1200/JCO.2017.74.3617.
 136. González-Gil, C., Ribera, J., Ribera, J. M. & Genescà, E. The yin and yang-like clinical implications of the *cdkn2a/arf/cdkn2b* gene cluster in acute lymphoblastic leukemia. *Genes* vol. 12 1–27 Preprint at <https://doi.org/10.3390/genes12010079> (2021).
 137. Onizuka, M. *et al.* Association of CDKN2A/2B deletion with relapse after hematopoietic stem cell transplantation for acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cell Therapy* **6**, (2023).
 138. Fang, Q. *et al.* Prognostic significance of copy number alterations detected by multi-link probe amplification of multiple genes in adult acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Lett* **15**, 5359–5367 (2018).
 139. Waanders, E. *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* **8**, (2012).
 140. Lundin, C. *et al.* High frequency of BTG1 deletions in acute lymphoblastic leukemia in children with down syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* **51**, 196–206 (2012).

141. Mullighan, C. G. *et al.* Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor-and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* **41**, 1243–1246 (2009).
142. Hunger, S. P. & Raetz, E. A. How I treat relapsed acute lymphoblastic leukemia in the pediatric population. *Blood* **136**, (2020).
143. Hunger, S. P. & Mullighan, C. G. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *New England Journal of Medicine* **373**, 1541–1552 (2015).
144. Noone, A. *et al.* SEER Cancer Statistics Review, 1975-2015, National Cancer Institute. https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/ (2018).
145. Fundación Josep Carreras contra la Leucemia. La leucemia linfoblástica aguda infantil de tipo B. <https://fcarreras.org/pacientes/enfermedades-hematologicas-ninos/leucemia-linfoblastica-infantil-b/> (2023).
146. Del Bufalo, F. *et al.* Allogeneic, donor-derived, second-generation, CD19-directed CAR-T cells for the treatment of pediatric relapsed/refractory BCP-ALL. *Blood* **142**, (2023).
147. Terwilliger, T. & Abdul-Hay, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J* **7**, e577 (2017).
148. Duncavage, E. J. *et al.* Genomic profiling for clinical decision making in myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **140**, 2228–2247 (2022).
149. O'Connor, C. Karyotyping for Chromosomal Abnormalities. *Nature Education* **1**, 27 (2008).
150. *ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature* (2020). (Kager, 2020). doi:10.1159/isbn.978-3-318-06867-2.
151. O'Connor, C. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). *Nature Education* **1**, 171 (2008).
152. Ford, N. M. Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: Technology and applications in molecular medicine. *Expert Rev Mol Med* (2000).
153. Mitrakos, A. *et al.* High resolution Chromosomal Microarray Analysis (CMA) enhances the genetic profile of pediatric B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia patients. *Leuk Res* **83**, (2019).
154. Lockhart, D. J. & Winzeler, E. A. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* **405**, (2000).
155. Schwab, C. J. *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* **49**, 1104–1113 (2010).
156. MRC Holland. *MLPA® General Protocol for the Detection and Quantification of DNA Sequences*. <https://support.mrcholland.com/downloads/files/mlpa-general-protocol-one-tube> (2022).

157. Bionano Genomics. How Optical Genome Mapping Works. <https://bionano.com/how-ogm-works/> (2024).
158. Dremsek, P. *et al.* Optical genome mapping in routine human genetic diagnostics—its advantages and limitations. *Genes (Basel)* **12**, (2021).
159. Goodwin, S., Mcpherson, J. D. & McCombie, W. R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Publishing Group* **17**, 333–351 (2016).
160. Coccaro, N., Anelli, L., Zagaria, A., Specchia, G. & Albano, F. Next-generation sequencing in acute lymphoblastic Leukemia. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 20 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms20122929> (2019).
161. Deshpande, D. *et al.* RNA-seq data science: From raw data to effective interpretation. *Frontiers in Genetics* vol. 14 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.997383> (2023).
162. Hidalgo-Gómez, G. *et al.* Is acute lymphoblastic leukemia with mature B-cell phenotype and KMT2A rearrangements a new entity? A systematic review and meta-analysis. *Leuk Lymphoma* **62**, 2202–2210 (2021).
163. Hidalgo-Gómez, G. *et al.* Clonal heterogeneity and genomic evolution in intrachromosomal amplification of chromosome 21: A case report. *British Journal of Haematology* vol. 204 2512–2515 Preprint at <https://doi.org/10.1111/bjh.19485> (2024).
164. Rack, K. *et al.* Optimizing the diagnostic workflow for acute lymphoblastic leukemia by optical genome mapping. *Am J Hematol* **97**, 548–561 (2022).
165. Soler, G. *et al.* Optical Genome Mapping in Routine Cytogenetic Diagnosis of Acute Leukemia. *Cancers (Basel)* **15**, (2023).
166. Smith, A. C., Neveling, K. & Kanagal-Shamanna, R. Optical genome mapping for structural variation analysis in hematologic malignancies. *Am J Hematol* **97**, 975–982 (2022).
167. Brady, S. W. *et al.* The genomic landscape of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* **54**, 1376–1389 (2022).
168. Gupta, S. *et al.* Racial and ethnic disparities in childhood and young adult acute lymphocytic leukaemia: secondary analyses of eight Children's Oncology Group cohort trials. *Lancet Haematol* **10**, e129–e141 (2023).
169. Li, S. & Lew, G. Is B-lineage acute lymphoblastic leukemia with a mature phenotype and l1 morphology a precursor B-lymphoblastic leukemia/lymphoma or Burkitt leukemia/lymphoma? *Arch Pathol Lab Med* **127**, 1340–1344 (2003).
170. Bai, L. *et al.* Prognosis of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in non-infant children with t(v;11q23)/MLL-rearranged B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* **91**, (2020).

171. Pieters, R., Lorenzo, P. De, Ancliffe, P., Aversa, L. A. & Brethon, B. Outcome of Infants Younger Than 1 Year With Acute Lymphoblastic Leukemia Treated With the Interfant-06 Protocol: Results From an International Phase III Randomized Study. **37**, 2246–2257 (2019).
172. Song, Y., Fang, Q. & Mi, Y. Prognostic significance of copy number variation in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Frontiers in Oncology* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.981036> (2022).
173. Hof, J. *et al.* Mutations and deletions of the TP53 gene predict nonresponse to treatment and poor outcome in first relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology* **29**, 3185–3193 (2011).
174. Dieck, C. L. & Ferrando, A. *Genetics and Mechanisms of NT5C2-Driven Chemotherapy Resistance in Relapsed ALL*. *Blood* vol. 133 <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/133/21/2263/1557329/blood852392.pdf> (2019).
175. Tran, T. H. & Hunger, S. P. The genomic landscape of pediatric acute lymphoblastic leukemia and precision medicine opportunities. *Seminars in Cancer Biology* vol. 84 144–152 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.10.013> (2022).
176. Pui, C. H., Nichols, K. E. & Yang, J. J. Somatic and germline genomics in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Nature Reviews Clinical Oncology* vol. 16 227–240 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0136-6> (2019).

7. ANNEXOS

7.1. Llistat de figures

Figura 1. Representació dels gens amb variants germinals associades amb predisposició a la LLA pediàtrica, classificats segons si codifiquen proteïnes implicades en la senyalització cel·lular, la resposta al dany del DNA, el cicle cel·lular/mort cel·lular i la diferenciació del limfòcit	6
Figura 2. Representació esquemàtica de la proteïna <i>IKZF1</i> , amb les variants germinals d'IKZF1 identificades en individus amb LLA-B (part superior) i les variants identificades en individus sense LLA-B (part inferior)	8
Figura 3. Representació esquemàtica de la proteïna <i>ETV6</i> , amb les variants germinals d'ETV6 identificades en individus amb LLA-B	9
Figura 4. Representació esquemàtica de la proteïna <i>RUNX1</i> , amb les variants germinals de RUNX1 identificades en individus amb LLA-B (part superior) i les variants identificades en individus amb LLA-T (part inferior)	10
Figura 5. Representació de les àrees implicades en el diagnòstic integrat de les leucèmies que permeten la classificació d'aquestes neoplàsies.	13
Figura 6. Agrupació bidimensional de l'expressió gènica de casos de LLA-B basada en dades de seqüenciació del transcriptoma de mostres de leucèmia recollides en el diagnòstic de nens o adults amb LLA	16
Figura 7. Freqüència d'alteracions genètiques i moleculars en la LLA-B i distribució per edat.....	18
Figura 8. Imatge d'una alta hiperdiploïdia típica en la LLA-B	20
Figura 9. Imatge d'una hipodiploïdia típica en la LLA-B	22
Figura 10. Patró típic de la iAMP21 en l'estudi de FISH utilitzant la sonda ETV6/RUNX1 <i>dual color dual fusion</i>	23
Figura 11. Distribució dels reordenaments de <i>KMT2A</i> en la LLA segons l'edat.....	25
Figura 12. Imatge de la t(12;21)(p13;q22)/ <i>ETV6::RUNX1</i> positiva per l'estudi de FISH, en utilitzar la sonda ETV6/RUNX1 dual color dual fusion (<i>ETV6</i> marcat en verd i <i>RUNX1</i> marcat en vermell)	26
Figura 13. Imatge de la t(9;22)(q34;q11) observada al estudi de cariotip, que implica la fusió <i>BCR::ABL1</i>	28

Figura 14. Esquema de les principals alteracions genòmiques en la LLA <i>BCR::ABL1-like</i> , incloent mutacions, reordenaments, fusions de gens i CNV, que impulsen la senyalització de citocines i la cinasa	29
Figura 15. Alteracions associades al gen <i>CRLF2</i>	31
Figura 16. Imatge de la t(1;19)(q23;p13), que implica el reordenament de <i>TCF3::PBX1</i> , observada a l'estudi de cariotip	32
Figura 17. Diagrames amb els gens de fusió associats a NUMT1 en funció de l'edat de diagnòstic de la malaltia	37
Figura 18. Visió general dels esdeveniments cooperatius secundaris associats a cada subtipus genètic de la LLA-B.....	42
Figura 19. Exemple d'ideograma amb bandes G de diversos cromosomes	49
Figura 20. Esquema dels principals tipus de sondes emprades en l'estudi de neoplàsies hematològiques	51
Figura 21. Representació de la hibridació d'una sonda de locus específic de doble fusió sobre cromosomes en metafase i nucli en interfase.....	51
Figura 22. Representació de la hibridació d'una sonda de locus específic de trencament (break-apart) sobre cromosomes en metafase i nucli en interfase	52
Figura 23. Esquema del procediment MLPA i del disseny de les sondes utilitzades	54
Figura 24. Esquema del procediment de l'OGM.....	55
Figura 25. Processos d'amplificació i seqüenciació en el procés de la NGS segon les tecnologies d'Ion Torrent (Thermo Fisher).....	57

7.2. Llistat de taules

Taula 1. Seguiment i supervivència als 3 i 5 anys del diagnòstic, per cohorts d'anys d'incidència, dels casos de leucèmia limfoblàstica aguda (LLA) d'entre 0-14 anys diagnosticats a Espanya del 1980-2018	4
Taula 2. Resum dels gens més comunament associats amb un risc incrementat de desenvolupar leucèmia limfoblàstica aguda.	7
Taula 3. Resum de síndromes genètiques associades a leucèmia limfoblàstica aguda .	11
Taula 4. Classificació immunològica característica de las LLA, segons la classificació d'EGIL	14
Taula 5. Classificació genètica de les leucèmies limfoblàstiques agudes B, adaptada de les actualitzacions recents de l'OMS i l'ICC.....	17
Taula 6. Recull dels gens associats al subtipus BCR::ABL1-like, junt amb els gens de fusió amb els quals es reordenen habitualment	30
Taula 7. Resum de les tècniques citogenòmiques aplicades al diagnòstic genètic de les neoplàsies hematològiques	48

7.3. Resum del subtipus genètics de la LLA-B pediàtrica

Subtipus genètic	Freqüència	Característiques
<i>Hiperdiploïdia</i>	25-30%	- Típicament entre 51-67 cromosomes - Mutacions en la via de senyalització Ras (<i>NRAS</i>, <i>KRAS</i>, <i>FLT3</i>, <i>PTPN11</i>) i modificadors d'histones (<i>KMT2D</i>, <i>CREBBP</i>, <i>EZH2</i>, <i>SETD2</i>) - Pronòstic favorable
<i>Hipodiploïdia</i>	1-3%	<u>Hipodiploïdia baixa</u> (32-39 cromosomes): associades a mutacions de TP53, delecions de <i>RB1</i> i <i>IKZF1</i> <u>Gairebé haploïdia</u> (24-31 cromosomes): associades a mutacions en la via de senyalització Ras (<i>NF1</i>, <i>NRAS</i>, <i>FLT3</i>) i en modificadors d'histones (<i>CREBBP</i>), i inactivació de <i>IKZF3</i> i <i>PAG1</i> - Pronòstic desfavorable
<i>iAMP21</i>	2-3%	≥3 còpies addicionals de <i>RUNX1</i> en un únic cromosoma 21 anormal (total de ≥5 còpies de <i>RUNX1</i> per cèl·lula), amb un perfil de variació del número de còpies distintiu - Requereix un tractament intensificat per reduir el risc de recaiguda
<i>t(12;21)/ETV6::RUNX1</i>	20-25%	- Reordenament críptic, detectable mitjançant FISH - Mutacions de <i>NSD2</i>, <i>KRAS</i> i <i>NRAS</i> i delecions d'<i>ETV6</i> i <i>PAX5</i> - Pronòstic excel·lent
<i>t(1;19)/TCF3::PBX1</i>	5-6%	- Incidència incrementada en població afroamericana - Pronòstic favorable-intermedi; associat a recaigudes del SNC
<i>Reordenaments de HLF</i>	<1%	- Generalment <i>t(17;19)/TCF3::HLF</i> i <i>t(17;18)/TCF4::HLF</i> - Pronòstic molt desfavorable
<i>Reordenaments de KMT2A</i>	2-4%	- Més comú en infants (>80%) >100 fusions amb diferents socis descrits, més comú amb <i>AFF1</i>, <i>MLLT1</i> i <i>MLLT3</i> - Poques mutacions concurrents, normalment en la via de senyalització de RAS (<i>NRAS</i>, <i>KRAS</i>, <i>FLT3</i>) - Associades amb l'expressió desregulada de la família de gens <i>HOXA</i>, especialment <i>HOXA9</i> - Pronòstic desfavorable
<i>t(9;22)/BCR::ABL1</i>	2-5%	- Freqüentment presenten delecions de <i>IKZF1</i>, així com <i>PAX5</i> i <i>CDKN2A/B</i>, i mutacions de <i>RUNX1</i> - Típicament de pronòstic desfavorable, millorat amb els TKi

<i>BCR::ABL1-like</i>	10-15%	- Desregulació de les vies de senyalització del receptor de citocines i de la cinasa a causa d'alteracions genètiques (principalment ABL-class i cinases Janus) - Els reordenaments de <i>CRLF2</i> (~50% dels pacients) són comuns en pacient amb Síndrome de Down, i s'associen amb delecions de <i>IKZF1</i> i mutacions de <i>JAK1</i> i <i>JAK2</i>. - Generalment pronòstic desfavorable, segons el reordenament present poden ser candidats a TKi
<i>Reordenaments de NUTM1</i>	1-2%	- Exclusivament en nens, i més comú en infants - Pronòstic favorable
<i>Reordenaments de DUX4</i>	4-7%	- Sobreexpressió de <i>DUX4</i>, normalment per fusió <i>IGH::DUX4</i> - Desregulació transcripcional d'<i>ERG</i>; 50-70% presenten deleció de <i>ERG</i> (exclueix d'aquest subtipus) - Expressió de CD2 i CD371 - Pronòstic favorable
<i>Reordenaments de MEF2D</i>	2-4%	- Augment de l'activitat transcripcional de <i>MEF2D</i>, activació de l'expressió HDAC9 i augment de la sensibilitat al tractament amb inhibidors de la histona desacetilasa - Baixa o nula expressió de CD10 i alta expressió de CD38 - Major edat en el moment del diagnòstic (mediana de 12 anys) - Pronòstic desfavorable
<i>Reordenaments de ZNF384</i>	3-6%	- Típicament immunofenotip pro-B o mitxe; baixa expressió de CD10 i expressió aberrant de CD13 i/o CD33 (expressió de marcadors mieloides) - Expressió incrementada de <i>FLT3</i> - Pronòstic intermedi
<i>ZNF384-like</i>	<1%	- Fusió de <i>ZNF362</i>, habitualment amb <i>SMARCA2</i> i <i>TAF15</i> - Pronòstic desconegut
<i>KMT2A-like</i>	<1%	- Fusió de <i>MED12::HOXA9</i> i <i>AFF1::TMEM156</i> - Pronòstic desfavorable
<i>ETV6::RUNX1-like</i>	2-3%	- Perfil d'expressió gènica similar al de la LLA amb <i>ETV6::RUNX1</i>, sense presentar la fusió - Presenta alteracions en <i>ETV6</i> i <i>IKZF1</i> coexistents - Expressió de CD27, i expressió nula o baixa de CD44 - Pronòstic intermedi a favorable

<i>Alteracions de PAX5</i>	8-10%	• Fusions, mutacions o amplificacions de PAX5 • Pronòstic intermedi
<i>PAX5 P80R</i>	2%	• Mutació definitiva <i>PAX5</i> p.Pro80Arg (P80R) • Concourants alteracions en vies de senyalització (<i>NRAS</i>, <i>KRAS</i>, <i>FLT3</i> i <i>PTPN11</i>)
<i>IKZF1 N159Y</i>	<1%	• Mutació definitiva <i>IKZF1</i> p.Asn159Tyr (N159Y) • Pronòstic desconegut
<i>ZEB2 H1038R/ IGH::CEBPE</i>	<1%	• Fusió de <i>IGH::CEBPE</i> en combinació amb la mutació <i>ZEB2</i> p.His1038Arg (H1038R) • Mutacions acompanyants de <i>NRAS</i>, <i>KMT2D</i>, <i>KRAS</i>, <i>KMT2A</i> i <i>CDKN2A</i> • Pronòstic desconegut
<i>BCL/MYC</i>	<1%	• Fusions de <i>IGH::BCL2</i>, <i>IGH::MYC</i> i <i>IGH::BCL6</i> • Pronòstic desfavorable
<i>CDX2/UBTF</i>	<1%	• Translocació <i>UBTF::ATXN7L3</i> i sobreexpressió de <i>CDX2</i> • Pronòstic desfavorable

Informació adaptada de ^{5,70,123,133,176}.

7.4. Material suplementari “How to Combine Multiple Tools for the Genetic Diagnosis Work-Up of B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia”

Methods

Morphology and immunophenotype

Bone marrow (BM) aspirate smears were stained with May–Grünwald–Giemsa according to standard laboratory protocols for cytochemical stains, including myeloperoxidase and Periodic Acid-Schiff (PAS). The diagnosis of ALL was based on the morphologic features of the cells, namely the presence of more than 20% cells showing lymphoblast morphology.

Immunophenotyping was performed by flow cytometry on BM samples according to standardized procedures. Antibodies used included anti-CD45, CD34, CD123, CD10, CD19, CD20, CD22, CD9, CD24, CD25, CD38, CD73, CD15, NG2, CD66c (KORSA), CD33, CD13, cit IgM, citMPO, nucTdT and citCD3 (from Beckman Coulter, CA, USA), CD304 (from Mitenyi Biotec, Germany).

Cytogenetic analysis

G-banded chromosomal analyses were performed on BM samples using standard techniques. Karyotypes were described according to the International System for Cytogenetic Nomenclature (ISCN 2020)¹⁵⁰.

Fluorescent in situ hybridization (FISH) assay was carried out on interphase nuclei using commercial probes for *BCR::ABL1*, *KMT2A*, *ETV6::RUNX1*, *TCF3*, *CRLF2*, *ABL1*, *ABL2*, *PDGFRB*, *JAK2*, *IGH* (MetaSystems Probes, Germany), *EPOR*, *MEF2D*, *ZNF384* and *PAX5* (Empire Genomics, NY, USA), according to the manufacturer’s protocol.

MLPA analysis

MLPA reactions were performed using the SALSA MLPA probemix P335 ALL-IKZF1 and P327 iAMP21-ERG (MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands) according to the manufacturer’s instructions. DNA samples from three healthy donors served as controls. For MLPA studies, a minimum infiltration of ≥30% blasts in bone marrow and high-quality DNA was required. The P335 probemix contains probes for IKZF1, CDKN2A/B, PAX5, EBF1, ETV6, BTG1, RB1, as well as genes from the X/Y PAR1 region (CRLF2, CSF2RA, IL3RA and P2RY8). The P327 probemix contains probes for RUNX1 and ERG genes. MLPA amplification products were analysed on an ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems), using the Genescan 500LIZ internal size standard (Applied

Biosystems). MLPA analysis was performed on the Coffalyser.NET Software (MCR-Holland). CNA were defined, following Schwab et al. (Schwab et al., 2010), as: biallelic deletion (<0.25), monoallelic deletion (≥ 0.25 to <0.75), normal (≥ 0.75 to <1.3) and gain/amplification (≥ 1.3).

Targeted next generation sequencing (t-NGS)

t-NGS was performed using Oncomine Childhood Cancer Research Assay (ThermoFisher Scientific, Life Technologies Corporation, CA, USA), which includes 203 genes involved in childhood cancer and allows the analysis of point mutations and fusions. Libraries were automatically prepared using the Ion Chef and sequenced on the S5 sequencer (ThermoFisher Scientific, Life Technologies Corporation, CA, USA), with an average coverage of 2500x. Variant alignment and detection were performed in Ion Reporter with the human reference genome (hg19). Variants with $>1\%$ allelic frequency were considered and manually reviewed with the Integrated Genome Viewer and classified according to the VARSOME23 software. Fusions were considered when transcript levels were $>0.1\%$. Data from the literature and the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC) database were used for the interpretation of the somatic nature of the fusions and mutant calls. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) listed in the SNP database (dbSNP) and the Genome 10K Project were excluded.

Optical Genome Mapping

Optical Genome Mapping (OGM) requires ultra-high molecular weight (UHMW) DNA. It was extracted from $\sim 1.5 \times 10^6$ cryopreserved cells (from bone marrow or peripheral blood) according to the manufacturer's instructions (Bionano Genomics, San Diego, USA). DNA was labeled using a sequence-specific DLE-1 (Direct Labeling Enzyme), that attaches a green fluorophore to a specific 6bp sequence, present around 15 times per 100 kb in the human genome. The labeled DNA was loaded onto a Saphyr chip and scanned on the Saphyr instrument (Bionano Genomics, San Diego, USA). Changes in the patterning or spacing of the labels were identified by software solutions to accurately detect all classes of SVs. For each sample, an effective genome coverage of about 300x is achieved, with a theoretical mean variant allele frequency sensitivity of 5%.

Stratification risk of SEHOP-PETHEMA 2013 treatment guidelines

This protocol incorporates risk-adapted treatment regimens based on factors such as age, white blood cell count (WBC), extramedullary infiltration (specifically CNS or testes involvement), immunophenotype, minimal residual disease (MRD), and cytogenetics.

For standard-risk group, patient must meet all of the following criteria: age >1 and <10 years, leukocytes $<20 \times 10^9/L$ at diagnosis, non-T immunophenotype, absence of CNS and/or testicular

infiltration, cytogenetics with high hyperdiploidy (51-67 chromosomes) and ETV6::RUNX1 positive, and not presenting t(1;19) or *KMT2A* rearrangement. Additionally, they must have <1,000 blasts/mm³ in peripheral blood on day +8 of induction, <5% blasts and <0.1% MRD in bone marrow on day +15 of induction and at the end of induction I'A.

The existence of any of the following criteria determines inclusion in the high-risk group: t(4;11)/*KMT2A::AFF1*, hypodiploidy (<44 chromosomes or DNA index <0.81), presence of >1,000 blasts/mm³ in peripheral blood on day +8 of Induction, > 25% blasts and > 10% MRD in bone marrow on day +15 of induction, MRD > 1% on day +33 of induction or MRD >0.1% before consolidation in bone marrow.

Those patients who do not meet the standard-risk or high-risk criteria will be included in the intermediate-risk group.

Statistical methods

Overall survival (OS) was defined as time to death, censoring at date of last contact. Event-free survival (EFS) was defined as time from randomization to relapse, second tumour or death, censoring at date of last contact. All survival rates are quoted at 5 years. Kaplan-Meier methods were used to estimate survival rates. Other comparisons were performed using chi-square, Fisher's exact, and Mann-Whitney tests, as appropriate.

Supplementary figures

Figure S1. Bar chart and table showing the frequency and co-occurrence of copy number alterations (CNA) of the genes studied by P335 MLPA our paediatric B-ALL cohort. Significant ($p<0.05$) concurrent deletions are marked in light blue.

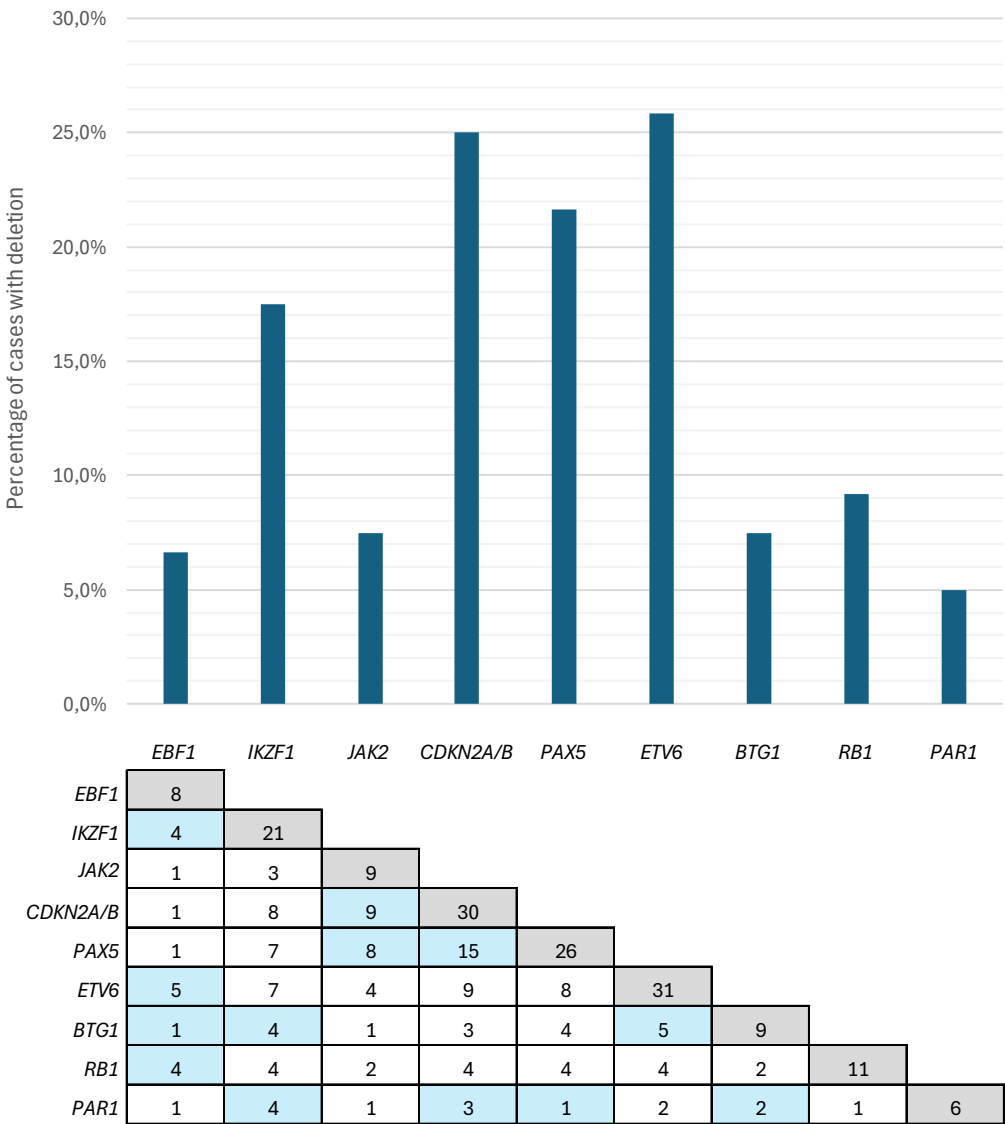


Figure S2. Outcomes according to SEHOP-PETHEMA 2013 Protocol risk classification for our paediatric B-ALL cohort. (A–C) Kaplan–Meier survival curves showing the overall survival, event-free survival and relapse incidence according to SEHOP-PETHEMA 2013 risk classification.

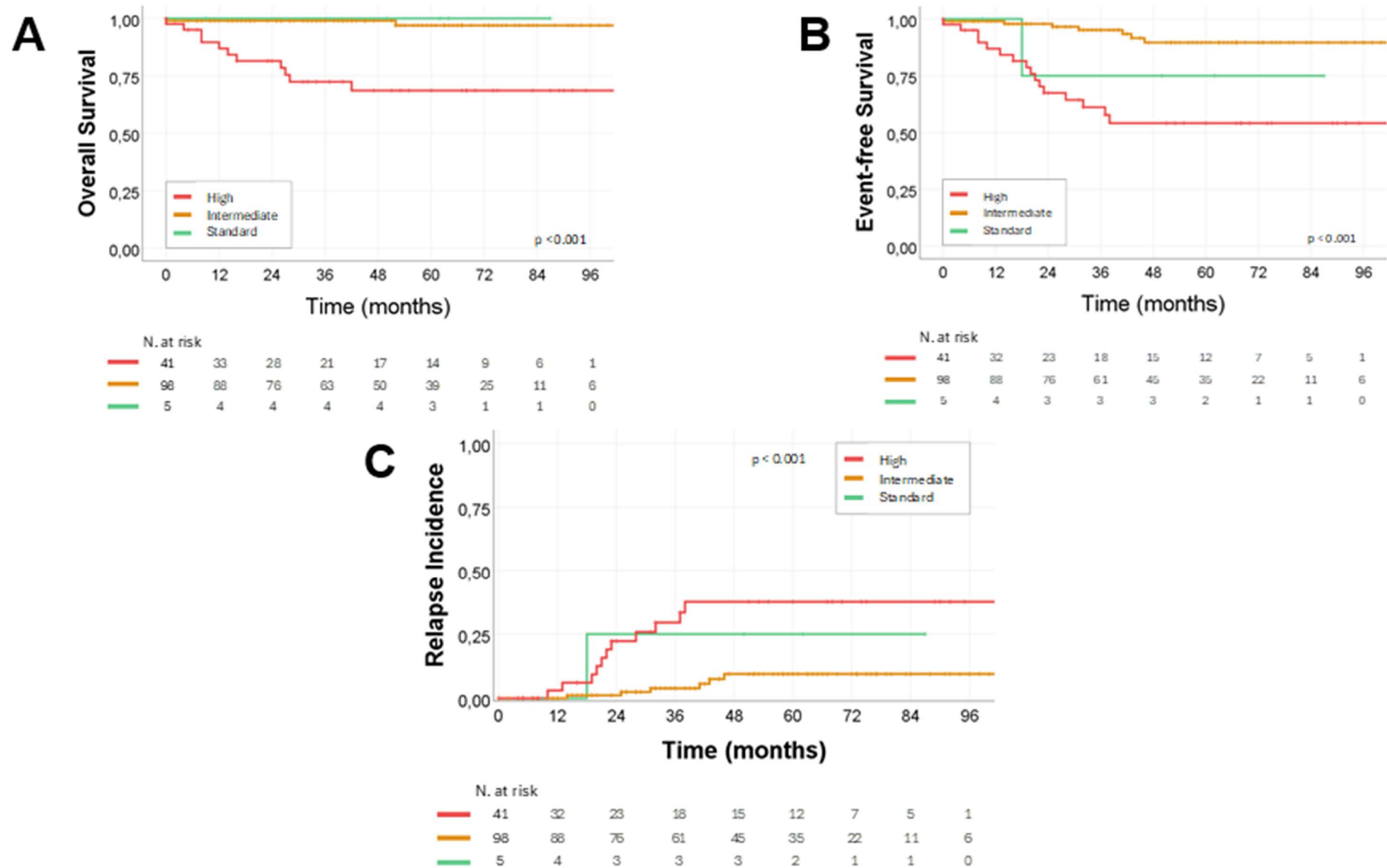


Figure S3. Outcomes according to the genetic defining subtype for our paediatric B-ALL cohort. (A–C) Kaplan–Meier survival curves showing the overall survival, event-free survival and relapse incidence according to genetic subtype.

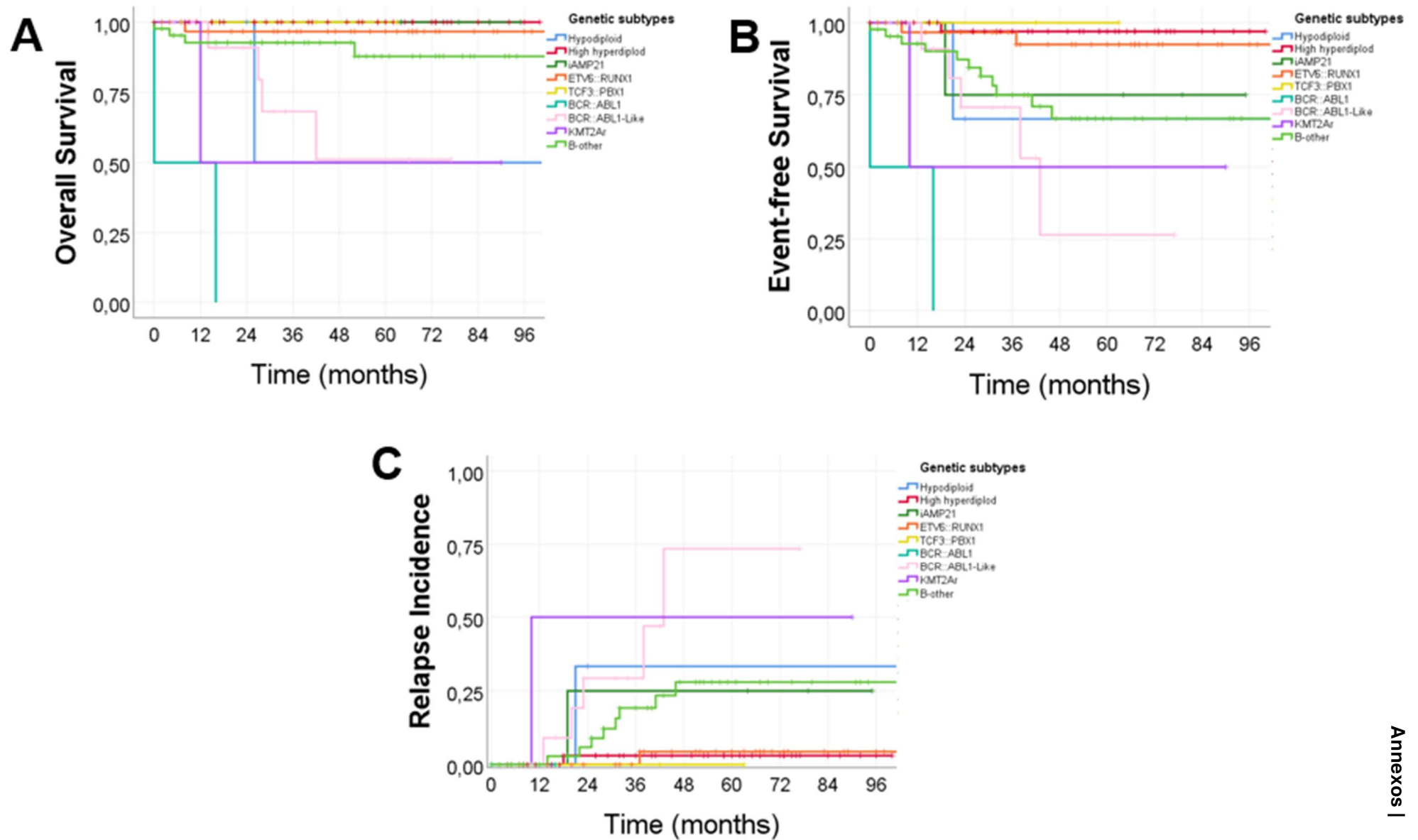


Figure S4. Outcomes according to the genetic risk classification plus the information of CNA profile for our paediatric B-ALL cohort. (A–C) Kaplan–Meier survival curves showing the overall survival, event-free survival and relapse incidence of the GEN-GR and GEN-IR by adding the CNA risk profile (CNA-GR: blue; CNA-PR: red). The results for the GEN-PR group are likely not shown due to a small sample size.

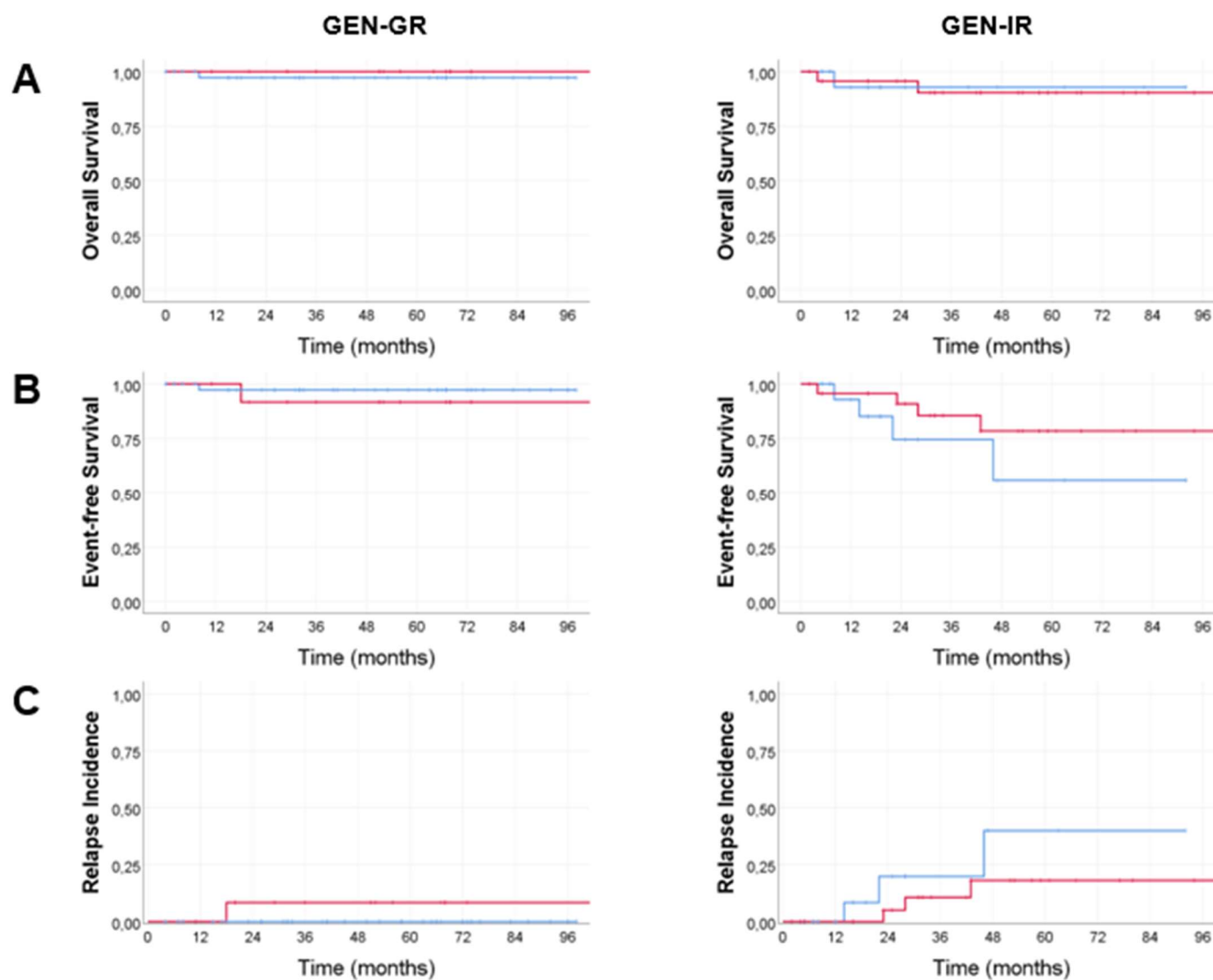


Table S1. Results of karyotype and FISH analyses of our paediatric B-ALL cohort.

ID	Genetic Subtype	Karyotype	FISH
ID_001	Hypodiploid; Low-Hypodiploidy	39,XX,-3,-7,-13,-15,-16,-17,-20[18]/46,XX[2]	No alterations
ID_002	B-other; B-rest	47,XY,+Y[12]/49,idem,+X,t(7;19)(p15;q13),+21[4]	No alterations
ID_003	ETV6::RUNX1	46,XX,add(12)(p13)[14]/48,XX,idem,+13,+14[2]/46,XX[6]	ETV6::RUNX1r
ID_005	HeH	56,XX,+X,+4,+6,+10,+16,+17,+18,+21,+21,+22[3]/46,XX[17]	SHeH
ID_007	B-other; PAX5alt	45,XY,-7,der(9)del(9)(p12pter)t(7;9)(q11;p12)[19]/46,XY[1]	No alterations
ID_009	BCR::ABL1-Like; PDGFRBr	48-49,XY,t(5;21)(q35;q21.2),+der(5)t(5;21)(q35;21.2),+mar1[2],+mar2[3][cp25]/46,XY[14]	PDGFRBr
ID_010	HeH	62,XX,+X,+4,+5,+6,+8,+8,+9,+10,add(14)(q32),+15,+17,+18,+18,+21,+21,+mar[16]	SHeH
ID_011	ETV6::RUNX1	47,XY+21[13]/46,XY[7]	ETV6::RUNX1r
ID_012	B-other; ZNF384r	45,XX,del(12)(p12),-17[12]	ZNF384r
ID_013	HeH	60,XY,+X,dup(1)(q21q32),+4,+5,+6,+7,+8,+10,+12,+14,+17,+18, add(19)(p13),+21,+21,+22[17]/46,XY[3]	SHeH
ID_014	iAMP21	46,X,der(Y),iamp(21)[12]/46,idem,del(3)(p11)[6]/46,XY[6]	RUNX1amp; CRLF2r
ID_016	B-other; B-rest	46,XX[20]	No alterations *
ID_017	ETV6::RUNX1	46,XY[7]	ETV6::RUNX1r
ID_018	B-other; B-rest	46,XX[20]	NA
ID_019	B-other; ZNF384r	46,XX,del(6)(q13q25)[8]/46,XX,del(6)(q13q25),del(9)(q22q33)[3]/46,XX,del(6)(q13q25),del(16)(q22q24)[6]/46,XX[1]	No alterations
ID_020	ETV6::RUNX1	56,XX,+X,+4,+5,+8,+9,+14,+15,+17,+21,+21[17]/46,XX[3]	ETV6::RUNX1r
ID_021	B-other; B-rest	46,XY,del(9)(p21p24)[19]/46,XY[4]	No alterations
ID_025	HeH	55,XX,+X,+4,+5,+8,+14,+17,+18,+21,+22[4]/46,XX[1]	SHeH
ID_026	BCR::ABL1	46,XY,t(2;10)(p11;q24),t(9;22)(q34;q11.2)[15]/46,XY[5]	BCR::ABL1r
ID_027	KMT2Ar; KMT2A::MLLT3	46,XY,t(9;11)(p21;q23)[5]/47,idem,+5[3]/48,idem,+5,+21[2]/46,XY,der(9)del(9)(q22q32)t(9;11)(p21;q23)[2]/47,XY,+5,der(9)del(9)(q22q32)t(9;11)(p21;q23)[2]/48,XY,+5,der(9)del(9)(q22q32)t(9;11)(p21;q23),+21[4]/46,XY[3]	KMT2Ar
ID_028	KMT2Ar; KMT2A::AFF1	46,XY,t(4;11;12)(q21;q23;q22)[20]	KMT2Ar
ID_029	ETV6::RUNX1	47,XY,+21[8]/48,XY,+10,+21[5]/47,XY,del(6)(q25),add(7)(q36),+10,-18,+21[3]/46,XY[9]	ETV6::RUNX1r
ID_030	ETV6::RUNX1	89,XXYY,-1,iso(3)(p10),del(6)(q22),-8,del(12)(p12),-13,-17,+21[4]/46,XY[16]	ETV6::RUNX1r
ID_031	HeH	56,XY,+X,+4,+6,+8,+10,+14,+17,+18,+21,+21[20]	No alterations
ID_032	ETV6::RUNX1	46,XX,t(3;12;21)?(q25;p13)[20]	ETV6::RUNX1r
ID_033	iAMP21	46,XX,der(21)[3]/46,XX[7]	RUNX1amp
ID_034	BCR::ABL1-Like; CRLF2r	45,XY,-7,del(9)(p13pter),der(12)t(7;12)(q11.2;p11.2)[20]	CRLF2r
ID_035	BCR::ABL1-Like; CRLF2r	45,XX,-20[8]/46,XX[12]	CRLF2r
ID_036	Hypodiploid; Near-Haploidy	27,XX,-1,-2,-3,-4,-5,del(6)(q21q25),-7,-8,-9,-10,-11,-12,-13,-14,-15,-16,-17,-17,-19,-20,-22,+mar[5]/46,XX[15]	No alterations
ID_037	B-other; B-rest	No mitosis	No alterations
ID_038	HeH	57,XX,+X,dup(1)(q21q25),+4,+6,+10,del(12)(p11),+14,+17,+18,+21,+21,+mar[9]/46,XX[11]	SHeH
ID_040	ETV6::RUNX1	46,XY,del(11)(q22)[8]/46,XY[12]	ETV6::RUNX1r
ID_041	ETV6::RUNX1	46,XX,del(12)(p12)[20]	ETV6::RUNX1r
ID_043	HeH	55,XX,+4,+6,+8,+10,+14,+17,+18,+18,+21[17]/46,XX[3]	SHeH
ID_044	B-other; B-rest	46,XY[20]	No alterations
ID_046	iAMP21	45,XY,-12,der(13;15)(q10;q10),der(21)[5]/46,XY[15]	RUNX1amp
ID_047	HeH	64,XX,+X,+X,+3,+4,+5,+6,+8,+8,+10,+11,+12,+14,+14,+17,+18,+21,+21,+22[16]/46,XX[6]	SHeH
ID_050	B-other; B-rest	46,XX,i(5)(q10)[9]/46,XX[11]	No alterations

ID_052	KMT2Ar; KMT2A::MLLT3	46,XX,t(9;11)(p22;q23)[20]	KMT2Ar
ID_053	ETV6::RUNX1	46,XX,del(12)(p12)[7]/46,XX[13]	ETV6::RUNX1r
ID_054	BCR::ABL1-Like; CRLF2r	46-48XY, del(5)(p12),+8,-15,+1-2mar[20]	CRLF2r
ID_055	B-other; ZNF384r	46,XY,t(9;14)(p24;q12)[4]/46,XY[16]	No alterations
ID_056	ETV6::RUNX1	46,XY,del(12)(p13)[8]/47,idem,+21[3]/46,XY[9]	ETV6::RUNX1r
ID_059	ETV6::RUNX1	49,XY,+10,del(12)(p12),+21,+22[4]/46,XY[16]	ETV6::RUNX1r
ID_060	B-other; B-rest	46,XY,del(1)(p22p34),der(1)t(1;?)(p13;?),add(2)(p21),t(3;3)(p21;q29),dup(4)(q25q31),-8, add(18)(q23),add(22)(q13),+mar[18]	No alterations *
ID_061	B-other; PAX5alt	46,XY,dup(2)(q21q31),del(3)(q21),der(20)t(9;20)(p13;q13)[13]/46,XY[7]	PAX5r
ID_062	B-other; ZNF384r	46,XX,add(19)(p13)[4]/46,XX[26]	IGHr
ID_063	HeH	46,XY[20]	Hyperdiploid
ID_064	HeH	No mitosis	Hyperdiploid
ID_065	HeH	46,XY[20]	Hyperdiploid
ID_067	B-other; B-rest	47,XX,add(3)(p25),-9,+10,der(16)t(9;16)(q13;q24),+22[13]/45,XX,idem,i(17)(q10)[3]/46,XX[4]	No alterations
ID_068	B-other; B-rest	46,XX,del(12)(p12)[6]/46,XX[6]	No alterations *
ID_069	ETV6::RUNX1	46,XY,del(12)(p11),-20,+21[3]/46,idem,del(6)(q12)[9]/46,idem,+mar[5]/46,XY[3]	ETV6::RUNX1r
ID_071	ETV6::RUNX1	46,XY[20]	ETV6::RUNX1r
ID_073	B-other; B-rest	46,XY,inv(2)(p11.2q13)[13]/46,XY[22]	No alterations *
ID_074	BCR::ABL1-Like; CRLF2r	48,XY,+X,+21c[7]/47,XY,+21c[13]	No alterations
ID_075	ETV6::RUNX1	46,XX,del(3)(p21),del(6)(q21),del(11)(q23),add(12)(p13),add(16)(q22)[3]/46,idem,+10[1]/46,idem,+21,46,idem,add(9)(p24)[16]/46,idem,add(9),+21[1]	ETV6::RUNX1r
ID_076	B-other; B-rest	47,XY,del(9)(p21)x2,+21[cp4]/46,XY[cp6]	No alterations *
ID_078	ETV6::RUNX1	50,X,-X,ins(1;1)(p36;q21-qter),+2,-4,add(6)(q25),+10,del(10)(q25),add(19)(q13.3),+21,+21,+mar1,+mar2[10]/46,XX[10]	ETV6::RUNX1r
ID_079	HeH	54,XX,+X,+4,+9,+10,+14,+17,+21,+21[15]/46,XX[5]	SHeH
ID_080	ETV6::RUNX1	No mitosis	ETV6::RUNX1r
ID_081	BCR::ABL1-Like; CRLF2r	46,XY[20]	No alterations
ID_082	ETV6::RUNX1	47,XX,+21[3]/47,XX,del(12)(p12),+21[9]/46,XX[8]	ETV6::RUNX1r
ID_083	HeH	56,XY,+X,+4,+6,+8,+10,+14,+17,+18,+21,+21[7]/56,idem,dup(1)(q21qter)[12]/46,XY[2]	SHeH
ID_086	ETV6::RUNX1	46,XY,del(12)(p11p12),der(21)[9]/46,XY[15]	ETV6::RUNX1r
ID_087	BCR::ABL1-Like; CRLF2r	50,XY,+X,+21,+21,i(21)(q10)x3,+mar[20]	CRLF2r
ID_088	HeH	52,XY,+X,+10,+17,+18,+21,+21[10]/46,XY[10]	SHeH
ID_089	HeH	62,XX,+2,+4,+5,+6,+9,+10,+10,+11,del(11)(q23),+14,+17,+19,+20,+21,+21,+mar1,+mar2[20]	SHeH
ID_091	HeH	55,XX,+X,+4,+6,+10,+17,+21,+21,+2mars[10]	SHeH
ID_093	HeH	54,XY,+X,dup(1)(q21q42),+4,+6,+10,+14,+17,+21,+21[13]/46,XY[7]	SHeH
ID_094	TCF3::PBX1	46,XX,+1,der(1)t(1;12)(q10;p10),der(19)t(1;19)(q23;p13)[6]/46,XX[4]	TCF3::PBX1r
ID_095	HeH	57,XX,+X,dup(1)(q21q31),+3,+6,+8,+9,+10,+14,+17,+18,+21[13]/46,XX[7]	SHeH
ID_096	iAMP21	47,XY,-13,+21+21,der(21),der(21)[11]/46,XY[9]	CRLF2r
ID_097	HeH	52,XY,+X,+4,+10,+14,+21,+21[3]	Hyperdiploid
ID_098	B-other; PAX5 P80R	45,XY,del(9)(p21),-20[15]/46,XY[5]	No alterations
ID_100	TCF3::PBX1	49,XY,t(1;19)(q23;p13),add(1)(q42),dup(5)(q13q21),inv(6)(p21q26),+8,+8,+20[20]	TCF3::PBX1r
ID_101	B-other; ZNF384r	46,XY,del(6)(q21q25),del(12)(p11.2)[11]/46,XY[9]	ZNF384r
ID_102	HeH	54,X,+X,-Y,+6,+8,+10,+14,+17,+18,+21,+21[4]/46,XY[16]	SHeH
ID_103	HeH	56,XY,+X,+4,+6,+10,+14,+17,+18,+18,+21,+21[17]/46,XY[3]	SHeH
ID_106	B-other; B-rest	53,XY,+X,+Y,+4,+6,-7,+10,+11,-13,+14,+21,+21[5]/53,XY,+Y,idem,add(16)(q24),+17[15]	No alterations
ID_107	ETV6::RUNX1	46,XY[20]	ETV6::RUNX1r

ID_109	HeH	NA	Hyperdiploid
ID_110	BCR::ABL1-Like; CRLF2r	47,XY,t(4;10)(q31;p11.2),+21c[7]/47,XY,+21c[13]	CRLF2r
ID_111	ETV6::RUNX1	47,XY,+10,der(21)[8]/47,XY,+21,der(21)[8]/46,XY[4]	ETV6::RUNX1r
ID_112	KMT2Ar; KMT2A::USP2	46,XX,der(16)t(1;16)(q23;q13)[9]/46,XX[11]	KMT2Ar
ID_114	B-other; PAX5alt	No mitosis	No alterations
ID_115	B-other; B-rest	45,XX,-13,der(20)del(20)(q12)[20]	No alterations
ID_116	HeH	57,XY,X,+4,+6,+7,+8,+10,+11,+14,+18,+21,+21[20]	SHeH
ID_117	KMT2Ar; KMT2A::AFF1	46,XX,t(1;4)(p36;q12).t(4;11)(q21;q23)[14]/46,XX[6]	KMT2Ar
ID_118	ETV6::RUNX1	45,X,-X,t(10;12)(q22;p13)[11]/45,idem,del(6)(q24)[5]/88,idem[6]	ETV6::RUNX1r
ID_119	HeH	55,XX,X,+4,+8,+10,+14,+17,+18,+21,+21[1]/46,XX[19]	SHeH
ID_120	B-other; B-rest	No mitosis	No alterations
ID_121	ETV6::RUNX1	No mitosis	ETV6::RUNX1r
ID_122	ETV6::RUNX1	46,XY,del(1)(q32),t(2;11)(p12;p15),del(12)(p12)[7]/46,XY[93]	ETV6::RUNX1r
ID_123	B-other; PAX5 P80R	46,XY,+1,der(1;16)(q12;q11.2)[19]/46,XY,idem,dup(2)(q11.2q21)[6]/47,XY,+13[2]	No alterations
ID_126	HeH	64,XY,X,+4,+5,+6,+7,+9,+10,+11,+12,+14,+15,+17,+18,+19,+21,+21,+22[8]/46,XY[9]	SHeH
ID_127	ETV6::RUNX1	46,XY[20]	ETV6::RUNX1r
ID_128	ETV6::RUNX1	46,X,-X,del(3)(p12),add(4)(q34),del(5)(q21q33),del(6)(q21q24),del(12)(p12),+mar[cp9]/90,idem[5]/46,XX[6]	ETV6::RUNX1r
ID_129	B-other; B-rest	46,XX[20]	No alterations *
ID_130	B-other; B-rest	46,XX[20]	No alterations
ID_131	BCR::ABL1-Like; CRLF2r	46,XY,del(9)(p21),t(11;12)(q22;q24)[19]/46,XY[1]	No alterations
ID_133	KMT2Ar; KMT2A::MLLT3	46,XY[20]	KMT2Ar
ID_134	TCF3::PBX1	54,XY,X,+5,der(5)t(1;5)(q21;q31),+6,+6,+18,+19,der(19)t(1;19)(q21;p13),+20,+21[11]/46,XY[9]	TCF3r
ID_135	B-other; PAX5 P80R	46,XY[20]	No alterations
ID_136	HeH	56,XX,X,+4,+6,+8,+10,+14,+17,+18,+21,+21[19]/46,XY[1]	SHeH
ID_138	HeH	54,XX,X,+4,+6,+10,+14,+17,+18,+21[5]/54,idem,dup(1)(q23q42)[4]/46,XX[11]	SHeH
ID_139	HeH	56,XX,X,+4,+5,+6,+8,+14,+17,+18,+21,+21[20]	SHeH
ID_140	B-other; IGHR	No mitosis	IGHr
ID_141	B-other; B-rest	46,XX,t(2;16)(p12;p11)[17]/46,XX[3]	No alterations
ID_142	TCF3::PBX1	No mitosis	TCF3::PBX1r
ID_143	ETV6::RUNX1	46,XX[20]	ETV6::RUNX1r
ID_144	ETV6::RUNX1	46,XY,del(12)(p11.1p12)[6]/46,XY[14]	ETV6::RUNX1r
ID_145	BCR::ABL1	65-66,XY,X,+1,+2,+4,+4,+5,+6,+8,+9,del(9)(p21),t(9;22)(q34;q11.2)x2,+10,+11,del(12)(p12),+13,+14,+17,+18,+19,+21,+21,del(21)(q22)x2,+22,+22[18]/46,XY [2]	BCR::ABL1r
ID_146	HeH	54,XX,X,+4,+10,+14,+17,+18,+21,+21[10]/46,XX[5]	SHeH
ID_147	B-other; B-rest	46,XY,der(10)t(1;10)(q21;p15),der(22)[5]/46,XY,idem,add(8)(p12)[7]/46,XY,del(9)(q13),t(10;?),der(10)t(1;10)(q21;p15)[8]	No alterations
ID_148	ETV6::RUNX1	46,XY[20]	ETV6::RUNX1r
ID_149	BCR::ABL1-Like; ABL1r	45,XY,der(9)del(9)(p24)dic(9;12)(p13;p13),der(12)del(12)(p11p12)dic(9;12)[18]/46,XY[2]	ETV6r
ID_150	HeH	57,+X,+4,+6,+10,+11,i(12)(q10),+14,+17,+18,+21,+21,+22[20]	SHeH
ID_151	B-other; IGHR	45,XY,-7,der(12)t(7;12)(q11.2;p13),add(19)(p13)[15]/46,XY[5]	IGHr
ID_152	HeH	56,XY,X,dup(1)(q22q42),+4,+6,+10,+14,+17,+18,+21,+21[20]	SHeH
ID_153	ETV6::RUNX1	47,XY,+21[4]/46,XY[6]	ETV6::RUNX1r
ID_155	ETV6::RUNX1	46,XY,dup(1)(q25q32),der(3)add(3)(q27),der(9)del(9)(p13),del(12)(p12)[14]/46,XY[6]	ETV6::RUNX1r
ID_156	BCR::ABL1-Like; CRLF2r	No mitosis	CRLF2 ::IGHr
ID_157	HeH	64,XY,X,+1,der(1),+2,+4,+6,+8,+9,+10,+11,+12,+14,+15,+17,+18,+19,+21,+21,+21[20]	SHeH
ID_158	B-other; B-rest	46,XX[20]	No alterations

ID_159	BCR::ABL1-Like; ABL1r	46,XX[20]	No alterations
ID_160	B-other; IGHr	48,XY,+X,t(8;14)(q11.2;q32),+21c[20]	IGHr
ID_161	B-other; ZNF384r	46,XX[20]	TCF3r
ID_164	HeH	56,XX,+X,+4,+6,+8,+11,+14,+17,+18,+21,+21[24]/46,XX[3]	SHeH
ID_165	HeH	60,XY,+X,+4,+5,+6,+7,+8,+10,+12,+14,+14,+17,+21,+21,+22[15]/46,XX[5]	SHeH
ID_166	HeH	57,XX,+X,+4,+6,+8,+10+,14,+15,+17,+18,+21+21[1]/57,idem,dup(1)(q21q31)[16]/46,XX[3]	No alterations
ID_167	B-other; B-rest	46,XY,t(1;15)(q42;q14),der(3)?,t(13;20)(q14;q11.2)[12]/46,XY[8]	No alterations
ID_168	B-other; DUX4-ERGdel	46,XX,del(9)(p21pter)[13]/46,idem,del(7)(p15pter)[2]/47,XX,idem,+16[2]/46,XX[3]	No alterations
ID_169	KMT2Ar; KMT2A::AFF1	46,XX,t(4;11)(q21;q23),t(10;10)(q22;q26)[20]	KMT2Ar
ID_170	B-other; B-rest	46,XY[20]	No alterations
ID_171	ETV6::RUNX1	45,XY,-8,der(9)t(8;9)(q12;p13),del(10)(q22),add(12)(p13),der(13)t(11;13)(q23;q32)[19]/46,XY[1]	ETV6::RUNX1r
ID_172	HeH	60,XX,+X,+2,+3,+4,+6,+10,+11,+12,+12,+17,+18,+21,+22[8]/46,XX[12]	No alterations
ID_173	Hypodiploid; Near-Haploidy	26,XY,-1,-2,-3,-4,-5,-6,-7,-8,-9,-10,-11,-12,-13,-15,-16,-17,-18,-19,-20,-22[14]/52,idemx2[6]	No alterations
ID_174	ETV6::RUNX1	46,XX,add(11)(q23)[14]/46,XX[6]	ETV6::RUNX1r
ID_175	B-other; B-rest	47,XY,+i(X)(p10),add(2)(q11.1),del(4)(q28qter),add(5)(p16),add(16)(q24),i(17)(q10),add(19)(p13)[20]	No alterations
ID_176	BCR::ABL1-Like; CRLF2r	47,XX,+21c[4]	CRLF2r
ID_179	ETV6::RUNX1	46,XY[20]	ETV6::RUNX1r
ID_180	B-other; B-rest	47,XX,+mar[6]/46,XX[14]	No alterations
ID_181	B-other; DUX4-ERGdel	No mitosis	IGHr
ID_183	HeH	56,XXYY,+4,+6,+10,add(11)(p13),+14,+17,+18,+der(19),-20,+21,+21[4]/46,XY[3]	SHeH
ID_184	B-other; B-rest	47,XX,+21[5]	No alterations *
ID_185	HeH	No mitosis	Hyperdiploid
ID_186	BCR::ABL1-Like; CRLF2r	46,XY[17]	No valorable
ID_187	TCF3::PBX1	46,XX,del(9)(p13pter),der(11),der(19)t(1;19)(q22;p13),der(22)t(1;22)?[4]/46,XX[5]	TCF3r
ID_188	B-other; IKZF1 N159Y	47,XY,+21,der(22)t(8;22)(q21;p11)[6]/46,XY[14]	No alterations
ID_189	HeH	61,XY,+X,+Y,+1,dic(1;14)(q10;q10),+4,+4,+5,+6,+8,+10,+14,+17,+18,+18,+19,+21,+21[9]/46,XY[11]	SHeH
ID_190	B-other; DUX4-ERGdel	45,XY,der(5)t(5;11)(q31;q13),dic(8;?)(q11.2;q11.2),-11,-12,+mar[17]/49,XY,+X,+4,+5[3]	No alterations
ID_191	HeH	57,XX,+X,+4,+6,+10,+11,+14,+17,+18,+19,+21,+21[7]/46,XX[13]	SHeH
ID_192	KMT2Ar; KMT2A::AFF3	45,X,-Y,t(2;11)(q13;q23)[10]/44,XY,dic(2;14)(p10;q10),der(11)t(2;11),-18,i(21)(q10)[11]/44,XY,dic(2;14)(p10;q10),der(7)t(7;13)(q10;q10),i(8)(q10),der(11)t(2;11),-18,i(21)(q10)[2]	No alterations
ID_193	B-other; B-rest	50,XX,+X,+14,+17,+18,add(19)(p13),-20,+21[13]/46,XX[7]	No alterations *
ID_196	HeH	56,XX,+X,+4,+5,+10,+17,i(17)(q10),+18,+21,+21,+mar1,+mar2[4]/46,XX[20]	Hyperdiploid
ID_198	HeH	No mitosis	Hyperdiploid
ID_199	HeH	No mitosis	Hyperdiploid
ID_200	B-other; B-rest	46,X,t(X;10)(p11;p11.2),t(16;19)(p13;q13)[21]/46,XX[2]	PDGFRAr
ID_201	HeH	60,XY,+X,+4,+4,+5,der(7),+8,+9,+10,+11,del(12)(p12),+14,+14,+17,+18,+21,+21[7]/60,idem,dup(1)(q12q32)[11]/46,XY[2]	SHeH
ID_202	BCR::ABL1-Like; JAK2r	46,XY,inv(9)(p13p24)?[4]/46,idem,del(3)(p21pter)[5]/46,XY[11]	JAK2r
ID_204	BCR::ABL1-Like; PDGFRBr	46,XY,del(9)(p21)[4]/45,X,-Y,del(9)(p21)[14]/46,XY[2]	PDGFRBr
ID_205	B-other; B-rest	46,XX[20]	No alterations
ID_207	HeH	56,XX,+X,+X,dup(1)(q25qter),+4,+6,10,+14,+17,+18,+21,+21[20]	SHeH
ID_208	BCR::ABL1	45,XY,add(9)(q33),der(10)add(10)(p11)t(10;22)(p11;q11),-13,add(21)(p10),der(22)t(9;22)(q34;q11.2)[6]/45,idem,del(4)(q22q28)[4]/47,idem,+2,del(4)(q22q28),+der(22)t(9;22)[7]/45,del(4)(q22q28),der(10)add(10)(p11)t(10;22)(p11;q11),add(9)(q33),-14,der(20)t(14;20)(q13;q13),der(22)t(9;22)(q34;q11.2)[3]	BCR::ABL1r

ID_209	B-other; NUTM1r	46,XY[20]	No alterations
ID_210	TCF3::PBX1	48,XY,+5,+8,der(19)t(1;19)(q23;p13)[2]/46,XY[18]	TCF3::PBX1r
ID_211	BCR::ABL1	52,XX,+X,+4,+4,add(4)(p12),+6,t(9;22)(q34;q11.2),+14,+21[9]/52,idem,i(17)(q10)[10]/46,XX[1]	BCR::ABL1r
ID_212	BCR::ABL1-Like; PDGFRBr	46,XY[20]	PDGFRBr
ID_213	B-other; B-rest	46,XX[20]	No alterations
ID_214	ETV6::RUNX1	47,XY,+X,del(1)(p22p33),del(11)(q21qter),add(21)(p11)[2]/48,idem,+14[14]/46,XY[4]	ETV6::RUNX1r
ID_215	B-other; B-rest	46,XX,der(9)[9]/46,XX,idem,del(6)(q21)[3]/46,XX[8]	No alterations
ID_216	ETV6::RUNX1	47,XY,dic(5;12)(p15;p13),+21[7]/46,XY[4]	ETV6::RUNX1r
ID_217	HeH	64,XY,+X,+4,+5,+6,+7,+8,+9,+10,+11,+12,+14,+14,+15,+16,+17,+18,+21,+21[6]/46,XY[14]	No alterations

The FISH study was performed sequentially: first *KMT2A*, *ETV6::RUNX1*, *TCF3* probes were apply; if no alterations were detected, additional we continued with ABL-Class probes (*ABL1*, *ABL2*, *PDGFRB*, *CSF1R*), *CRLF2*, *EPOR*, *JAK2*, *MEF2D*, *ZNF384*, *PAX5* and *IGH* probes. (*)Not all cases progress through the complete FISH panel, due to insufficient material or not valuable results. amp: amplification; NA: not available; r: rearranged; SHeH: suggestive of HeH (by 3-4 copies of *RUNX1* or other genes studied).