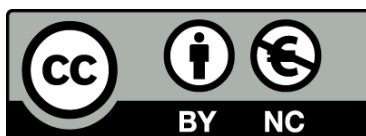




UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Estudi de nous biomarcadors en pacients amb leucèmia pediàtrica d'alt risc

Elena Esperanza Cebollada



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0. Spain License.**

Estudi de nous biomarcadors en pacients amb leucèmia pediàtrica d'alt risc

ELENA ESPERANZA CEBOLLADA



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudi de nous biomarcadors en pacients amb leucèmia pediàtrica d'alt risc

Memòria de tesi doctoral presentada per **Elena Esperanza Cebollada** per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona.

Dirigida per

Dra. Mireia Camós Guijosa
Hematòloga especialista sènior
Laboratori d'Hematologia
Hospital Sant Joan de Déu

Dra. Montserrat Torredell Burriel
Hematòloga especialista sènior
Laboratori d'Hematologia
Hospital Sant Joan de Déu

Tutora

Dra. Ofelia Cruz Martínez
Consultora en Oncologia Pediàtrica
Unitat de Neuro-Oncologia Pediàtrica. Pediatric Cancer Center
Hospital Sant Joan de Déu

Programa de Doctorat Medicina i Recerca Translacional.
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. Universitat de Barcelona.

Barcelona, Setembre de 2023

Als meus pares i a l'Eva

"Nobody said it was easy
It's such a shame for us to part
Nobody said it was easy
No one ever said it would be this hard,
Oh, take me back to the start"

The Scientist, Coldplay

AGRAÏMENTS

AGRAÏMENTS

Probablement aquesta secció de la tesi és de les més difícil d'escriure i no perquè no estigui agraïda, sinó perquè penso que soc molt afortunada per estar envoltada de tanta gent a la que estic agraïda, que no vull deixar-me a ningú.

En primer lloc voldria donar les gràcies a les meves directores de tesi, la Dra. Mireia Camós i la Dra. Montserrat Torrebadell. Sou un exemple de dedicació a la vostra professió, aquesta tesi també es vostra.

Mireia, gràcies per acollir-me al teu grup i confiar en mi, sóc molt feliç treballant aquí. Gràcies per totes les hores que t'he robat, tant per la tesi com per tots els projectes en els que m'has permès treballar i aprendre. Gràcies per ensenyar-me, per transmetre'm la teva dedicació i constància i fer que cada dia tingués ganes d'aprendre més i més.

Montse, vaig tenir la sort de que acceptessis pujar-te al tren d'aquesta tesi, gràcies per transmetre'm la teva passió per la LMA, per tots els teus coneixements, per la paciència per explicar-me, tornar a explicar-me i re-explicar-me. Gràcies pels teus consells i per tenir sempre un somriure.

La meua trajectòria professional va començar al Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreras (IJC), i tot i que va ser una etapa curta, probablement va ser una de les responsables de que ara estigui acabant la tesi. Moltes gràcies al Dr. Josep Maria Ribera per deixar-me formar part del seu grup de recerca i poder desenvolupar el meu treball de màster, allà em vau contagiar la vostra passió per la leucèmia. A l'Eulàlia per acceptar la tutoria del treball. A en Jordi per totes les hores que vas dedicar a explicar-me i a ensenyar-me a treballar al laboratori, per animar-me a començar amb la recerca i la tesi i per ensenyar-me a fer "petardos" amb eppendorf i neu carbònica. M'agradaria també donar les gràcies a en Kiku i les meves companyes Mar, Paula, Laura P, Neus, Rocío, Nuri, Laura "petita", Natalia, Pame i Laura G, sempre recordaré aquella nit jugant al *geocatching* per Barcelona a les 3 de la matinada, els rooms scape i alguna festa a l'ovella.

Posteriorment he tingut la sort de formar part de l'equip de l'Hospital Sant Joan de Déu. Moltes gràcies a tots els meus companys i amics, aquesta tesi tampoc hagués estat possible sense el vostre suport.

Als clínics, la vostra implicació professional és admirable, gràcies per tot el que he après de vosaltres.

A la Susana Rives, te admiro. Gracias por todas las aportaciones, por todo el conocimiento que transmites i por valorar siempre mi trabajo y contar conmigo.

A l'Albert Català, gràcies per estar sempre disposat a ajudar-me, aquesta tesi es mereix un bon *brunch*.

A la Montse Mesegué, Georgina Moron, Rubén Berrueco i Maria Solsona, gràcies per arrencar-me sempre un somriure o escoltar-me quan he tingut moments no tant bons.

Gràcies també a la Nuria Conde, José Luis Dapena, Isabel Badell, Julia Marsal, Maria Trabazo, Anna Alonso i Anna Faura pels vostres ànims i suport en aquesta etapa.

Al meus companys i amics del laboratori heu fet que vingui a treballar feliç i sou en part responsables, de que la meva feina m'agradi tant.

Rosa, Seli i Camino, les tres fadetes, Fauna, Flora i Primavera, sou un gran exemple. Rosa i Seli gràcies pels vostres consells i la vostra generositat, gràcies per acollir-me des del primer dia.

Camino, infinitas gracias por tu tiempo y tus manos, ¿qué habría hecho yo sin ellas? por tratarme siempre como una hija, escucharme, repetirme la frase: *cállate si puedes* y regalarme tantos consejos siempre que te he necesitado. Gracias por los infinitos e imparables ataques de risa, ¡te echo de menos!

Susanna, gràcies per totes les hores que t'he robat demanant-te consells i per estar sempre atenta amb ganes d'escoltar i ajudar, ets una "jefa"!

A l'Anna, companya de "salseos", "bombazos" i exclusives, gràcies per el subministrament de xocolata en els moments més difícils.

Sara i Edurne, mis compañeras de viajes, conciertos y incluso multiesports (padelsurf, pole, básquet...), muchas gracias por decirme siempre las cosas como las pensáis, por ser auténticas, por escucharme y aguantar las "chapas" que os he pegado y por todos los momentos de risas que hemos compartido.

A los ojos más bonitos de todo el laboratorio... no puedo elegir... Nacho, Emili, ¡sois unos cracks! gracias por soportar todas las tonterías que os digo cada día y reírme todas las gracias. Emili, gràcies per donar-me sempre el teu suport, Nacho, perdona todos los días en que no he llamado en el despacho, tienes el cielo ganado.

Andrea, Geneva, Evelyn y Paula, ¡menudo grupo bueno! Os aprecio mucho, ha sido genial poder compartir estos años con vosotras, muchas gracias por los desayunos, comidas, cenas, excursiones y sobretodo ¡los mojitos!

Gràcies Lidia, Soraya, Warda, Sara i Cèlia per el vostre suport i ànims durant aquests anys.

A la Nerea i la Clara, les meves amigues, el meu equip, las supernenas, i qui no voldria treballar amb superheroïnes? Tinc clar que aquesta tesis no hagués estat el mateix sense vosaltres dues, moltes gràcies per tots els moments que m'heu regalat, tant de bo, pugui estar a la vostre alçada, m'ho heu posat molt complicat!

Nerea, mi rubita, gràcies per acollir-me, per "l'escoleta", per ensenyar-me, tant a nivell professional com personal, amb tu he crescut. Gràcies per calmar-me, per dir-me que pensés, que no em rendís que seguís endavant, tenir-te al costat sempre suma.

Clarusi! la germana petita, gràcies per fer-me riure, per estar sempre, pacient, escoltant, per tota la teva ajuda cada cop que he sentit que no arribava, per els duos que fem cantant, i per seguir-me sense dubtar en totes les tonteries que em passen pal cap. En definitiva, gràcies a les dues per estar en els bons moments i sobretot en els pitjors, per no deixar-me mai.

Quan semblava que el "tridente" estava complert vam voler ser les Spice Girls, Mercè, Alba, ha mesura que heu anat arribant les dues, heu portat més llum i alegria al grup. Gràcies per suportar-me en aquesta última etapa de la tesis i perdoneu per els pocs moments que us he pogut dedicar. Gràcies per el vostre entusiasme, per les ganes d'aprendre i per preguntar-me coses que mai m'havia plantejat. Gràcies per oferir-vos sempre a ajudar i per el vostre somriure, és contagiós. Estic molt contenta de que sigueu amb nosaltres petites patufetes!

No vull oblidar-me del laboratori de genètica, Patri i Carlota, gràcies per tots els ànims i suport que m'heu donat durant aquests anys. Paola, ¿qué te digo que no sepas ya? ¡Pues que muchas gracias!, gracias por estar, por escucharme, por ocuparte de mi querido Misesq, por ser una gran chofer, porque no sé si te lo he dicho alguna vez, pero... ¿sabes lo bien que conduces? Sin ti esta tesis tampoco hubiese sido lo mismo, gracias por tu amistad. También quiero darle las gracias a la rosalineta del laboratorio, Anna, muchas gracias por todas las tonteries y bromas que me haces, siempre consigues sacarme una sonrisa y eso es genial.

Moltes gràcies a tots els companys del laboratori, en especial a la Teresa Marquès, a la Sandra, a l'Esther, a la Cristina i el Carles. Gràcies per acollir-me des del primer dia, per l'ajuda, els ànims i per totes les xerrades tant al passadís com al despatx.

Moltes gràcies al Dr. Jaume Mora i a tots els companys que formen part del grup de recerca del càncer del desenvolupament, moltes gràcies pels vostres consells i aportacions que tant m'han ajudat aquests anys.

A la Sole i la Sara Pérez, gràcies per totes les hores que us he robat amb aquesta tesi. Sole, gracias por ayudarme tanto y explicarme con paciencia las muchas formas de analizar los datos.

A la Sara Pérez, moltíssimes gràcies per fer-me fàcil l'estadística, ara només li tinc una mica de por i no pànic! Hem rigut molt analitzant juntes i has aconseguit que fins i tot m'agradi una mica.

Al laboratori d'oncologia molecular, Cinzia, Nagore, Noe, Monica, Isa, Oscar i Anna, gracias a todos por acogerme durante unos meses, ¡aprendí muchísimo con vosotros!

Gràcies a la Dra. Ofelia Cruz, per acceptar la tutoria d'aquesta tesi i els seu suport.

A les associacions, famílies i pacients, perquè sense ells aquesta recerca no hauria estat possible.

A la meva família i amics:

Als meus amics, aquesta tesi us ha robat moltes estones. Tot i el meu pessimisme, la meva angoixa i totes les meves queixes, heu estat allà donant-me suport i fent que cada dia fos més fàcil. Soc molt afortunada de tenir-vos a tots, gràcies per la vostra amistat.

A mi familia, mis avis, yayos, tíos y primos, gracias por estar siempre pendientes, preguntándome y dándome ánimos. A pesar de que sabíais que mi primera respuesta era bufar, agradecía mucho que me escucharais, así que siento mi mal humor algunas veces y gracias por estar, ¡sois geniales e imprescindibles!

A mis padres y a mi hermana,

Mama, papa, una cosa esta clara, sin vosotros nunca hubiese podido llegar hasta aquí. Muchas gracias por confiar en mí y estar siempre a mi lado. Me habéis enseñado las cosas más importantes, para mí, sois un ejemplo a seguir, gracias por ser los mejores, os quiero mucho.

A mi hermana, Eviiiiiiiiss (sé en qué tono lo has leído), gracias por ser lo mejor que me ha pasado en la vida, tenerte como hermana es genial, pero tenerte además como amiga no tiene palabras. Gracias por todos los momentos juntas, a tu lado todo es más fácil.

En definitiva, gracias a los tres por ser incondicionales, por aguantar mis momentos de nervios, de bloqueos y por vuestra comprensión, no hay espacio en esta tesis para agradecer todo lo que hacéis por mí, pero no os preocupéis, yo estaré a vuestro lado para intentar haceros, como poco, la mitad de felices que me hacéis a mí.

FINANÇAMENT

FINANÇAMENT

Aquesta tesi ha comptat amb el suport econòmic i ha estat finançada pel projecte PI16/00246 integrat en el Plan Nacional de I+D+I i cofinançat per l'“*Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)*” – “*Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación Sanitaria*”, per la “*Fundación Cris contra el Cáncer* ” i la Fundació La Marató TV3 (beca 201921-30). També hem comptat amb l'ajuda de nombroses aportacions de famílies de pacients, particulars i empreses, a través de l'Obra Social Hospital Sant Joan de Déu.

ÍNDEX

ÍNDEX

AGRAÏMENTS	15
FINANÇAMENT	21
ÍNDEX.....	25
LLISTAT DE FIGURES.....	29
LLISTAT DE TAULES	35
ABREVIATURES I ACRÒNIMS	41
ENUMERACIÓ DELS ARTICLES DE LA TESI.....	53
RESUM DE LA TESI	57
INTRODUCCIÓ	63
HIPÒTESI	161
OBJECTIUS.....	165
MATERIAL I MÈTODES	169
RESULTATS.....	205
DISCUSSIÓ	249
CONCLUSIONS	265
BIBLIOGRAFIA	269
ANNEXES.....	301

LLISTAT DE FIGURES

LLISTAT DE FIGURES

Figura 1: Hematopoesi. Progenitors i llinatges hematopoètics.

Figura 2: Comparació dels dos models actuals d'hematopoesi.

Figura 3: Incidència de la leucèmia aguda.

Figura 4: Hipòtesi de “la mescla de poblacions de Leo Kinlen” i hipòtesi de l'exposició tardana de Mel Greaves.

Figura 5: Esquema de l'adquisició d'alteracions genètiques en la patogènia de la leucèmia limfoblàstica aguda de llinatge B.

Figura 6: Relació clonal entre el diagnòstic i la recaiguda en mostres de pacients recaiguts amb leucèmia limfoblàstica aguda.

Figura 7: Diferents models d'evolució clonal de la leucèmia.

Figura 8: Freqüència dels diferents subgrups genètics en funció de l'edat en la leucèmia limfoblàstica aguda.

Figura 9: Distribució de les alteracions genètiques i les noves alteracions genètiques en funció del seu impacte pronòstic i el seu perfil d'expressió gènica.

Figura 10: Distribució de les alteracions secundàries en relació als principals subtipus de leucèmia limfoblàstica aguda de llinatge B.

Figura 11: Diferenciació de cèl·lules T i subtipus de leucèmia limfoblàstica aguda de llinatge T. Estadis de diferenciació, classificació i pronòstic de la leucèmia limfoblàstica aguda de llinatge T segons les alteracions genètiques.

Figura 12: Freqüència dels diferents subtipus genètics en la leucèmia mieloide aguda i distribució de les alteracions genètiques en funció de l'edat.

Figura 13: Freqüència de les anomalies citogenètiques més comuns en la leucèmia mieloide aguda pediàtrica i en edat adulta.

Figura 14: Canvis en la supervivència global dels pacients pediàtrics tractats històricament amb diferents protocols a l'hospital St. Jude.

Figura 15: Estructura del gen *KMT2A wild type* i reordenat.

Figura 16: Classificació dels reordenaments del gen *KMT2A* segons el tipus de leucèmia aguda i edat.

Figura 17: Mutacions somàtiques presents en la cohort de pacients amb neoplàsies pediàtriques estudiada per Susanne N. Gröbner, 2018.

Figura 18: Estructura precursora i seqüència madura del microRNA (miRNA) *lin-4*.

Figura 19: Seqüències genòmiques del gen *let-7*.

Figura 20: Localització genòmica i estructura gènica dels miRNAs.

Figura 21: Visió general de la via de biogènesi dels miRNAs.

Figura 22: Mecanismes canònics i no-canònics de la biogènesi dels miRNAs.

Figura 23: Biogènesi i funcions dels miRNAs.

Figura 24: Conjunt dels 10 miRNAs capaços de discriminar entre els subgrups de leucèmia segons l'estudi de Grobbelaar and Ford, 2019.

Figura 25: Esquema d'acció dels miRNAs com a oncomiRs promotors de càncer i com a supressors de tumors.

Figura 26: Esquema de l'estudi I de la present tesi.

Figura 27: Disseny de la placa de miRNAs.

Figura 28: Anàlisi de la desviació estàndard de cada miRNA com a possible control endogen.

Figura 29: *Hierarchical cluster analysis* i anàlisi de components principals basats en l'expressió de miRNAs de 110 mostres de pacients amb leucèmia aguda.

Figura 30: Test de log-rank per la supervivència lliure d'esdeveniment i la supervivència global dels pacients segons el clúster assignat. Anàlisi de components principals de les dades d'expressió de miRNA de cada grup.

Figura 31: Supervivència lliure d'esdeveniment i supervivència global dels pacients amb leucèmia limfoblàstica aguda en conjunt (n=69) i separats per grups segons l'anàlisi no supervisat.

Figura 32: Supervivència lliure d'esdeveniment i supervivència global de la cohort de pacients amb leucèmia mieloide aguda (n=39) i separats per grups P1AML i P2AML identificats en l'anàlisi no supervisat.

Figura 33: *Hierarchical cluster analysis* amb els perfils d'expressió dels 24 miRNAs capaços de discriminar els pacients amb leucèmia mieloide aguda amb un pitjor pronòstic (P1AML) en comparació amb la resta de pacients, agrupats al grup P2AML, amb un pronòstic favorable.

Figura 34: *Heatmap* amb totes les vies significativament enriquides en els 24 miRNAs seleccionats.

Figura 35: Gens inclosos en el *6-pediatric leukemic stem cell (pLSC6) score* i el *17-leukemic stem cell (LSC17) score*.

Figura 36: Test de log-rank per la supervivència lliure d'esdeveniment dels pacients segons l'expressió de cada miRNA de forma individualitzada.

Figura 37: Test de log-rank per la supervivència global dels pacients segons l'expressió de cada miRNA de forma individualitzada.

Figura 38: *Hierarchical cluster analysis* amb l'expressió dels 24 miRNAs a la cohort de la base TARGET.

Figura 39: Diferències en la supervivència lliure d'esdeveniment i la supervivència global entre els pacients del grup PT1AML i PT2AML definits per l'expressió dels 24 miRNAs en la cohort de validació.

Figura 40: Anàlisi de correlació entre els 24 miRNAs de la firma i els gens involucrats en els *scores* de *stemness*.

Figura 41: Diferències en la supervivència lliure d'esdeveniment i la supervivència global entre diferents grups de risc formats amb el model d'estratificació proposat combinant

la genètica, la malaltia residual mesurable, el 6-*pediatric leukemic stem cell* (pLSC6) score i la firma de 24 miRNAs.

Figura 42: Perfil d'expressió dels gens *PPP1R27*, *CCL23*, *NRG4*, *PHACTR3* i *SCUBE1* en mostres de pacients amb leucèmia aguda i mostres de pacients no neoplàsics.

Figura 43: Perfil d'expressió dels gens *PPP1R27*, *CCL23*, *NRG4*, *PHACTR3* i *SCUBE1* en mostres de pacients amb leucèmia limfoblàstica aguda, leucèmia mieloide aguda, leucèmia aguda de llinatge ambigu i pacients no neoplàsics.

Figura 44: Perfil d'expressió dels gens *PPP1R27*, *CCL23*, *NRG4*, *PHACTR3* i *SCUBE1* en mostres de pacients amb leucèmia mieloide aguda.

Figura 45: Diferències en la supervivència lliure d'esdeveniment i la supervivència global entre dos grups de pacients amb leucèmia mieloide aguda i *KMT2A* reordenat que expressen *PHACTR3*.

LLISTAT DE TAULES

LLISTAT DE TAULES

Taula 1: Classificació morfològica de la leucèmia limfoblàstica aguda segons el grup FAB.

Taula 2: Classificació immunològica de la leucèmia limfoblàstica aguda segons el grup *EGIL*.

Taula 3: Classificació de la *World Health Organization* de la leucèmia limfoblàstica aguda de llinatge B.

Taula 4: Classificació de la *World Health Organization* de la leucèmia limfoblàstica aguda de llinatge T.

Taula 5: Classificació de la *World Health Organization* de la leucèmia limfoblàstica aguda pediàtrica de llinatge B i T.

Taula 6: Classificació de la leucèmia limfoblàstica aguda de llinatge B i T segons la *International Consensus Classification of myeloid neoplasm and acute leukemias*.

Taula 7: Noves entitats en la leucèmia limfoblàstica aguda T.

Taula 8: Classificació morfològica de la leucèmia mieloide aguda segons el grup FAB, freqüència en la leucèmia mieloide aguda pediàtrica i associació a alteracions citogenètiques recurrents.

Taula 9: Classificació de la *World Health Organization* de la leucèmia mieloide aguda de l'adult.

Taula 10: Classificació de la *World Health Organization* de la leucèmia mieloide aguda pediàtrica.

Taula 11: Classificació de la leucèmia mieloide aguda segons la *International consensus classification of myeloid neoplasm and acute leukemias*.

Taula 12: Translocacions recurrents rares en la leucèmia mieloide aguda.

Taula 13: Classificació de la *World Health Organization* de les leucèmies agudes de llinatge ambigu.

Taula 14: Classificació de les leucèmies agudes de llinatge ambigu segons la *International consensus classification of myeloid neoplasm and acute leukemias*.

Taula 15: Algunes de les alteracions secundàries recurrents en la leucèmia limfoblàstica aguda de llinatge B.

Taula 16: Altres alteracions genètiques recurrents en la leucèmia limfoblàstica aguda T.

Taula 17: Altres alteracions genètiques recurrents i reordenaments genètics poc freqüents en la leucèmia mieloide aguda recollides en classificacions internacionals.

Taula 18: Tipus de RNAs no codificants en humans.

Taula 19: MicroRNAs associats a la resistència a fàrmacs d'ús comú en el tractament de la leucèmia aguda.

Taula 20: Pacients i principals característiques clínic-biològiques al diagnòstic de l'estudi I de la present tesi.

Taula 21: Llistat dels 89 microRNAs seleccionats, agrupats per família i clúster, i les seves dianes descrites en vies d'auto-renovació, immaduresa i/o la possible rellevància clínica en el diagnòstic, pronòstic i tractament en la leucèmia aguda pediàtrica.

Taula 22: Llistat de microRNAs i la seva seqüència incloent els controls en la placa de PCR quantitativa amb transcripció reversa.

Taula 23: Principals característiques clínic-biològiques al diagnòstic dels pacients de la cohort d'estudi del treball addicional.

Taula 24: Característiques clíniques i biològiques dels 39 pacients amb leucèmia mieloide aguda classificats segons l'expressió dels microRNAs en els grups P1AML i P2AML.

Taula 25: Llistat dels 24 microRNAs amb expressió significativament diferent entre els grups P1AML i P2AML.

Taula 26: Llistat de les vies enriquides per als 24 microRNAs seleccionats i el seu p valor.

Taula 27: Models de Cox per l'anàlisi univariat a la cohort de l'Hospital Sant Joan de Déu.

Taula 28: Comparació dels pacients amb leucèmia mieloide aguda inclosos en les cohorts del Hospital Sant Joan de Déu i de la base TARGET.

Taula 29: Característiques clíniques i biològiques dels pacients PT1AML *versus* PT2AML.

Taula 30: Principals característiques clíniques i biològiques dels 64 pacients de la base de TARGET amb dades disponibles d'expressió dels gens implicats en el *6-pediatric leukemic stem cell* (pLSC6) *score* i el *17-leukemic stem cell* (LSC17) *score*.

Taula 31: Correlació entre els grups definits per la firma de 24 microRNAs (PT1AML i PT2AML) i els grups definits en funció dels valors del *6-pediatric leukemic stem cell* (pLSC6) *score*.

Taula 32: Model de Cox per l'anàlisi univariat en la cohort de TARGET.

Taula 33: Model de Cox per l'anàlisi multivariat en la cohort de TARGET.

Taula 34: Anàlisi multivariat en la subcohort de 55 pacients de la base TARGET amb dades disponibles del *6-pediatric leukemic stem cell* (pLSC6) *score*, d'expressió dels 24 microRNAs, clíniques i genètiques.

Taula 35: Aplicació del C-índex per avaluar la capacitat predictiva de les diferents variables de forma individual i combinada.

Taula 36: Associació entre expressió sí/no dels gens *PPPIR-27*, *CCL23*, *NRG4*, *SCUBE1* i *PHACTR3* i leucèmia/control no neoplàsic.

Taula 37: Associació entre expressió sí/no dels gens *PPPIR-27*, *CCL23*, *NRG4*, *SCUBE1* i *PHACTR3* i el llinatge, comparant la leucèmia limfoblàstica aguda i la leucèmia mieloide aguda.

Taula 38: Anàlisi quantitativa de l'expressió entre leucèmia limfoblàstica aguda *versus* leucèmia mieloide aguda en els pacients que expressaven els gens *PPPIR-27* (n=41), *CCL23* (n=43), *NRG4* (n=37), *SCUBE1* (n=17) i *PHACTR3* (n=22).

Taula 39: Associació entre expressió sí/no dels gens *PPPIR-27*, *CCL23*, *NRG4*, *SCUBE1* i *PHACTR3* i la leucèmia mieloide aguda amb reordenament de *KMT2A*.

Taula 40: Comparació de l'expressió dels gens *PPPIR-27*, *CCL23*, *NRG4* i *PHACTR3* en pacients amb leucèmia mieloide aguda amb reordenaments del gen *KMT2A* versus pacients amb leucèmia aguda mieloide sense reordenaments del gen *KMT2A*.

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

Δ CT: delta CT.

ABCA2: *ATP binding cassette subfamily A member 2.*

ABCA3: *ATP binding cassette subfamily A member 3.*

ABL1: *ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase.*

ABL2: *ABL proto-oncogene 2, non-receptor tyrosine kinase.*

ACIN1: *apoptotic chromatin condensation inducer 1.*

ADGRG1: *adhesion G protein-coupled receptor G1.*

AFDN: *afadin, adherens junction formation factor.*

AFF1: *ALF transcription elongation factor 4.*

AGO2: *argonaute RISC catalytic component 2.*

AKR1C3: *aldo-keto reductase family 1 member C3.*

AKT1: *AKT serine/threonine kinase 1.*

ALAL/LALA: *ambiguous lineage acute leukemia; leucèmia aguda de llinatge ambigu.*

ANKS1B: *ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 1B.*

Ara-C: *citarabina (arabinòsid de citosina).*

ARHGAP22: *Rho GTPase activating protein 22.*

ARHGEF28: *Rho guanine nucleotide exchange factor 28.*

ARID1B: *AT-rich interaction domain 1B.*

ARID5B: *AT-rich interaction domain 5B.*

ASXL2: *ASXL transcriptional regulator 2.*

BCL11B: *BCL11 transcription factor B.*

BCL2: *BCL2 apoptosis regulator.*

BCR: *BCR activator of RhoGEF and GTPase.*

BET1: *Bet1 golgi vesicular membrane trafficking protein.*

BEX3: *brain expressed X-linked 3.*

bHLH: *basic helix-loop-helix.*

BLK: *BLK proto-oncogene, Src family tyrosine kinase.*

BLNK: *B cell linker.*

BMP2K: *BMP2 inducible kinase.*

BRAF: B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase.

BRD9: bromodomain containing 9.

BTG1: BTG anti-proliferation factor 1.

BTK: Bruton tyrosine kinase.

CAR: chimeric antigen receptor.

CART: chimeric antigen receptor T-cell.

CBF: core binding factor.

CBFA2T3: CBFA2/RUNX1 partner transcriptional co-repressor 3.

CBFB: core-binding factor subunit beta.

CBL: Cbl proto-oncogene.

CCL23: C-C motif chemokine ligand 23.

CCND2: cyclin D2.

CD34: CD34 molecule.

CDK6: cyclin dependent kinase 6.

CDKN1B: cyclin dependent kinase inhibitor 1B.

CDKN2A: cyclin dependent kinase inhibitor 2A.

CDKN2B: cyclin dependent kinase inhibitor 2B.

CEBPA: CCAAT enhancer binding protein alpha.

CI: confidence interval, interval de confiança.

C-KIT: KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase.

CML: chronic myeloid leukemia, leucèmia mieloide crònica.

CNA: copy number alteration.

CN-LOH: copy neutral-loss of heterozigosity.

CNOT3: CCR4-NOT transcription complex subunit 3.

CNV: copy number variation.

COG: Children's Oncology Group.

CPXM1: carboxypeptidase X, M14 family member 1.

CREBBP: CREB binding protein.

CRLF2: cytokine receptor like factor 2.

CSF1R: colony stimulating factor 1 receptor.

CSPG4: chondroitin sulfate proteoglycan 4.

CT: cycle threshold, cicle d'umbral.

CTnorm: CT normalitzat pel control interplaca (IPC).

CUX1: cut like homeobox 1.

DCAL: Diagnostic Center of Acute Leukemia.

DEK: DEK proto-oncogene.

DGCR8: DGCR8 microprocessor complex subunit.

DGKH: diacylglycerol kinase eta.

DICER1: dicer 1, ribonuclease III.

DNA; ADN: àcid desoxiribonucleic.

DNMT3A: DNA methyltransferase 3 alpha.

DNMT3B : DNA methyltransferase 3 beta.

DOT1L: DOT1 like histone lysine methyltransferase.

DPYSL3: dihydropyrimidinase like 3.

DROSHA: drosha ribonuclease III.

DS: desviació estàndard.

DUX4: double homeobox 4.

EBF1: EBF transcription factor 1.

EED: embryonic ectoderm development.

EGIL: European Group of Immunological classification of Leukemias.

EICH: enfermedad de injerto contra huésped; malaltia de l'empelt contra l'hoste.

ELL: elongation factor for RNA polymerase II.

EML1: EMAP like 1.

EMP1: epithelial membrane protein 1.

EP300: E1A binding protein p300.

EPOR: erythropoietin receptor.

ERG: ETS transcription factor ERG.

ETP: Early T-cell precursor.

ETV6: ETS variant transcription factor 6.

EZH2: enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit.

FAB: French-American-British.

FAM30A: family with sequence similarity 30 member A.

FBXW7F: box and WD repeat domain containing 7.

FDA: Food Drug Administration.

FDR: *false discovery rate*.

FGFR1: *fibroblast growth factor receptor 1*.

FISH: *fluorescence in situ hybridization*.

FLT3: *fms related receptor tyrosine kinase 3*.

FUS: *FUS RNA binding protein*.

GATA2: *GATA binding protein 2*.

GATA3: *GATA binding protein 3*.

GLIS2: *GLIS family zinc finger 2*.

GRAAL: *Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia*.

GUS: *β -glucuronidase*.

HCA: *hierarchical cluster analysis*.

HDAC: *histona deacetilasa*.

HDACi: *inhibidor d'histona deacetilasa*.

HLF: *HLF transcription factor, PAR bZIP family member*.

HR: *hazard ratio*.

HSC: *hematopoietic stem cells*.

iAMP21: *amplificació intracromosòmica del cromosoma 21*.

I-BFM SG: *International Berlin-Frankfurt-Münster Study Group*.

ICC: *International consensus classification of myeloid neoplasm and acute leukemias*.

ID4: *inhibitor of DNA binding 4*.

IDH1: *isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 1*.

IDH2: *isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 2*.

IG/TR: *immunoglobulina/receptor de cèl·lules T*.

IGH: *immunoglobulin heavy locus*.

IKZF1: *IKAROS family zinc finger 1*.

IKZF2: *IKAROS family zinc finger 2*.

IKZF3: *IKAROS family zinc finger 3*.

IL3: *interleukin 3*.

IL7R: *interleukin 7 receptor*.

IPC: *control interplaca*.

ITD: *internal tandem duplication; duplicació interna en tàndem*.

JAK1: *Janus kinase 1*.

JAK2: Janus kinase 2.

JAK3: Janus kinase 3.

KAT6A: lysine acetyltransferase 6A.

KDM6A: lysine demethylase 6A.

KMT2A (MLL): lysine methyltransferase 2A.

KMT2A-r: reordenaments de KMT2A.

KO: knock-out.

KRAS: KRAS proto-oncogene, GTPase.

LAPTM4B: lysosomal protein transmembrane 4 beta.

LCR: líquid cefaloraquidi.

LDI-PCR: long-distance inverse PCR.

LEDGF: Lens epithelium-derived growth factor.

LEF1: lymphoid enhancer binding factor 1.

lincRNAs: long or large intergenic ncRNAs.

LLA: leucèmia limfoblàstica aguda.

LLA-B: leucèmia limfoblàstica aguda de llinatge B.

LLA-T: leucèmia limfoblàstica aguda de llinatge T.

LLC: leucèmia limfàtica crònica.

LMA: leucèmia mieloide aguda.

LMO2: LIM domain only 2.

LPA: leucèmia promielocítica aguda.

LSC: leukemic stem cells.

LSC17 score: 17-leukemic stem cells score.

LT-HSC: long-term hematopoietic stem cells.

LYL1: LYL1 basic helix-loop-helix family member.

LYN: LYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase.

MAPK1: mitogen-activated protein kinase 1.

MAPK3: mitogen-activated protein kinase 3.

MBD: binding menin domain.

MECOM: MDS1 and EVI1 complex locus.

MEF2C: myocyte enhancer factor 2C.

MEF2D: myocyte enhancer factor 2D.

MEIS1: meis homeobox 1.

MERTK: MER proto-oncogene, tyrosine kinase.

miRNA: microRNA.

MLLT1 (ENL): MLLT1 super elongation complex subunit.

MLLT10 (AF10) : MLLT10 histone lysine methyltransferase DOT1L cofactor.

MLLT3 (AF9): MLLT3 super elongation complex subunit.

MLPA: multiplex ligation-dependent probe amplification.

MMRN1: multimerin 1.

MPAL: mixed phenotype acute leukemia.

MPO: mieloperoxidasa.

MPP: multipotent progenitors.

mRISC: complex RISC unit a miRNA.

MRM: malaltia residual mesurable.

MRTFA (MKL): myocardin related transcription factor A.

MYC: MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor.

MYH11: myosin heavy chain 11.

NF1: neurofibromin 1.

NF-kB: nuclear factor kappa B.

NGS: next generation sequencing.

NK: natural killer.

NKX2.1: NKX2-1 antisense RNA 1.

NKX2.2: NKX2-2 antisense RNA 1.

NOPHO: Nordic Society of Paediatric Haematology and Oncology.

NOS: not otherwise specified.

NOTCH1: notch receptor 1.

NPM1: nucleophosmin 1.

NRAS: NRAS proto-oncogene, GTPase.

NRG4: neuregulin 4.

NS: negre Sudan.

NSD1: nuclear receptor binding SET domain protein 1.

NSD2 WHSC1: nuclear receptor binding SET domain protein 2.

NT5C2: 5'-nucleotidase, cytosolic II.

NTRK3: neurotrophic receptor tyrosine kinase 3.

NUP214: nucleoporin 214.

NUP98: nucleoporin 98 and 96 precursor.

NUTM1: NUT midline carcinoma family member 1.

NYNRIN: NYN domain and retroviral integrase containing.

P2RY8: P2Y receptor family member 8.

PASRs: promoter-associated short RNAs.

PAX5: paired box 5.

PBX1: PBX homeobox 1.

PCA: principal component analysis, anàlisi de components principals.

PCR: polimerase chain reaction.

PDGFRA: platelet derived growth factor receptor alpha.

PDGFRB: platelet derived growth factor receptor beta.

PETHEMA: Programa Español de Tratamientos en Hematología.

Ph+: cromosoma Philadelphia.

PHACTR3: phosphatase and actin regulator 3.

PHF6: PHD finger protein 6.

PIK3CA: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha.

piRNA: RNA associats a Piwi.

pLSC6 score: 6-gene pediatric leukemic stem cell score.

PML: PML nuclear body scaffold.

PPP1R27: protein phosphatase 1 regulatory subunit 27.

PROMPTs: promotor upstream transcripts.

PRKCZ: protein kinase C zeta.

PTEN: phosphatase and tensin homolog.

PTK2B: protein tyrosine kinase 2 beta.

PTPN11: protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11.

PTPN2: protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2.

RAR α : retinoic acid receptor alpha.

RB1: RB transcriptional corepressor 1.

RBM15: RNA binding motif protein 15.

RC: remissió completa.

RD: *repression domain*.

RET: *ret proto-oncogene*.

RNA; ARN: àcid ribonucleic.

RNA_m: RNA missatger.

RNA_{nc}: RNA no codificant.

RNA_r: RNA ribosòmic.

RNA-Seq: Seqüenciació/Anàlisi del transcriptoma.

ROS: *reactive oxygen species*.

RPL10: *ribosomal protein L10*.

RPL5: *ribosomal protein L5*.

RPN1: *ribophorin I*.

RT-PCR: reacció en cadena de la polimerasa amb retrotranscripció o transcripció inversa.

RUNX1: *RUNX family transcription factor 1*.

RUNX1T1: *RUNX1 partner transcriptional co-repressor 1*.

SALL1: *spalt like transcription factor 1*.

SCUBE1: *signal peptide, CUB domain and EGF like domain containing 1*.

SEHOP: Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica.

SET: *SET nuclear proto-oncogene*.

SG: supervivència global.

SH2B3: *SH2B adaptor protein 3*.

SLE: supervivència lliure d'esdeveniment.

SMARCA2: *SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2*.

SMIM24: *small integral membrane protein 24*.

SNC: sistema nerviós central.

SNL: *speckled nuclear localization domain*.

SNP: *single nucleotide polymorphism*.

snoRNAs: *small nuclear RNAs*.

SOCS2: *suppressor of cytokine signaling 2*.

SPINK2: *serine peptidase inhibitor Kazal type 2*.

STAT: *signal transducer and activator of transcription 1*.

STP: *short-term progenitors*.

SUZ12: SUZ12 polycomb repressive complex 2 subunit.

TAF1: TATA-box binding protein associated factor 1.

TAL1: TAL bHLH transcription factor 1, erythroid differentiation factor.

TCF3: transcription factor 3.

TET2: tet methylcytosine dioxygenase 2.

tiRNA: RNA de transferència.

T-UCRs: transcribed ultraconserved regions.

TKI: tyrosin-kinase inhibitor.

TLX3: T-cell leukemia homeobox 3.

TP53: tumor protein p53.

TPG: translocation partner gene.

TPH: transplantament de progenitors hematopoètics.

TRA: T-cell receptor alpha locus.

TRB: T-cell receptor beta locus.

TRD: T-cell receptor delta locus.

TRG: T-cell receptor gamma locus.

TRM: treatment related mortality.

TSSa-RNAs: transcription start site antisense RNAs.

TYK2: tyrosine kinase 2.

US NCI: United States National Cancer Institute.

UTR: untranslated region.

VAF: variant allelic frequency.

WES: whole-exome sequencing.

WGS: whole-genome sequencing.

WHO/OMS: World Health Organization; Organització Mundial de la Salut.

WNT16: Wnt family member 16.

WT1: WT1 transcription factor.

XPO5: exportin 5.

YAP1: Yes1 associated transcriptional regulator.

ZBTB46: zinc finger and BTB domain containing 46.

ZNF384: zinc finger protein 384.

ZNF618: zinc finger protein 618.

ENUMERACIÓ DELS ARTICLES DE LA TESI

ENUMERACIÓ DELS ARTICLES DE LA TESI

Tesi en format clàssic amb un article publicat i annexat i un treball no publicat. La tesi consta de dos treballs que s'enfoquen en l'estudi de nous biomarcadors en pacients amb leucèmia pediàtrica d'alt risc.

Treball 1: Estudi del paper dels microRNAs implicats en l'auto-renovació de les cèl·lules progenitores hematopoètiques i vies d'imaduresa (NOTCH, WNT/beta-catenina, HOX i FLT3) en una cohort pediàtrica de pacients diagnosticats amb leucèmia aguda. Treball publicat en forma d'article: **Esperanza-Cebollada E**, Gómez-González S, Perez-Jaume S, Vega-García N, Vicente-Garcés C, Richarte-Franqués M, Rives S, Català A, Torrebadell M, Camós M. *A miRNA signature related to stemness identifies high-risk patients in paediatric acute myeloid leukaemia*. Br J Haematol. 2023 Mar 23. doi: 10.1111/bjh.18746. Epub ahead of print. PMID: 36951259. Factor d'impacte 8.615, quartil 1, àrea de coneixement Hematologia.

Treball addicional: Estudi del perfil d'expressió dels gens *PPPIR-27*, *CCL23*, *SCUBE1*, *PHACTR3* i *NRG4* en pacients pediàtrics amb leucèmia aguda.

RESUM DE LA TESI

RESUM DE LA TESI

ESTUDI DE NOUS BIOMARCADORS EN PACIENTS AMB LEUCÈMIA PEDIÀTRICA D'ALT RISC

Antecedents: la supervivència dels pacients pediàtrics amb leucèmia aguda ha millorat notablement en les últimes dècades gràcies a les millores en el tractament i a la millor estratificació dels pacients en grups de risc al diagnòstic i durant el seguiment. Tot i així, hi ha alguns subtipus de leucèmia amb major risc de recidiva, com les leucèmies de llinatge mieloide i els pacients que presenten reordenaments del gen *KMT2A*, entre altres. En aquests pacients d'alt risc és prioritària la cerca de noves teràpies més precises, eficients i segures per tal de millorar la seva supervivència i disminuir els efectes secundaris. Algunes variables clíniques i biològiques, com les aberracions genètiques al diagnòstic i els nivells de malaltia residual mesurable, són biomarcadors potents per a predir el pronòstic de la leucèmia pediàtrica. Les vies d'imaduresa o *stemness* regulades per NOTCH, WNT/ β -catenina, HOX i FLT3, entre altres, solen trobar-se alterades en pacients amb leucèmia i la seva activació s'ha relacionat amb un pitjor pronòstic en pacients adults i pediàtrics. Recentment, s'ha proposat un model per a identificar els pacients pediàtrics amb leucèmia mieloide aguda d'alt risc, que integra les anomalies genètiques, la identitat transcripcional, així com el grau de *stemness*, mesurat pel *pediatric leukemic stem cell* (pLSC6) *score*. Tot i així, encara es desconeix el paper de l'epigenètica, i en particular dels microRNAs, en el pronòstic d'aquests pacients.

D'altra banda, els reordenaments del gen *KMT2A* són diversos i amb freqüència complexes i, en conseqüència, el seu diagnòstic i identificació completa poden requerir l'aplicació de metodologies complexes i costoses. A més, el pronòstic dels pacients amb reordenaments del gen *KMT2A* varia segons l'edat del pacient, el llinatge i el *partner*.

Hipòtesi: l'estudi de marcadors genètics i epigenètics (microRNAs) implicats en l'auto-renovació de les cèl·lules mare hematopoètiques o vies d'imaduresa en leucèmies pediàtriques d'alt risc permetrà la identificació de nous biomarcadors diagnòstics i pronòstics, que podrien aportar un valor afegit respecte els actualment utilitzats com la genètica i els nivells de malaltia residual mesurable.

Objectius: l'objectiu global del treball de tesi és estudiar l'expressió de marcadors genètics i microRNAs com a reguladors epigenètics, en pacients pediàtrics amb diferents subtipus de leucèmia aguda, per tal d'identificar possibles biomarcadors diagnòstics i/o pronòstics.

Metodologia: aquesta tesi està dividida en dos treballs amb la següent metodologia:

1) anàlisi de l'expressió de 89 microRNAs seleccionats per la seva rellevància en la leucèmia pediàtrica i/o la seva relació amb vies de *stemness*, mitjançant PCR quantitativa en 110 pacients pediàtrics diagnosticats de leucèmia aguda de l'any 2000 al 2020. Els resultats d'aquest estudi es van validar en una sèrie independent no esbiaixada amb dades de 447 pacients pediàtrics diagnosticats de leucèmia mieloide aguda d'un repositori públic;

2) anàlisi de l'expressió de l'RNA missatger dels gens *PPP1R27*, *CCL23*, *SCUBE1*, *PHACTR3* i *NRG4* mitjançant PCR quantitativa en 57 pacients pediàtrics diagnosticats de leucèmia aguda i 10 controls pediàtrics amb patologia no neoplàsica.

Resultats: hem identificat una firma de 24 microRNAs relacionada amb el grau de *stemness*, capaç de distingir el pronòstic dels pacients pediàtrics amb leucèmia mieloide aguda i hem validat aquests resultats en una cohort independent de pacients utilitzant dades d'un repositori públic. La firma de 24 microRNAs s'associa de manera significativa amb el pLSC6 *score* i la genètica subjacent dels pacients. Tanmateix, la combinació dels factors pronòstics clàssics (malaltia residual mesurable i genètica), el pLSC6 *score* i la firma de 24 microRNAs, té una capacitat predictiva per predir la supervivència global i la supervivència lliure d'esdeveniment major que cada una de les variables de manera individual.

D'altra banda, hem observat que els gens *PPP1R27*, *CCL23*, *SCUBE1*, *PHACTR3* i *NRG4* es troben significativament sobreexpressats en pacients amb leucèmia mieloide aguda respecte els pacients amb leucèmia limfoblàstica aguda. A més, els pacients amb leucèmia de llinatge mieloide i reordenaments de *KMT2A* presenten major expressió d'aquests gens. Els nostres resultats preliminars suggereixen, dins d'aquest grup de pacients d'alt risc, una associació entre l'absència d'expressió del gen *PHACTR3* i una

millor supervivència, tot i que la sèrie és limitada i és necessària la confirmació d'aquest resultat en sèries més àmplies.

Conclusions: La nostra firma de 24 microRNAs proporciona dades epigenètiques a integrar conjuntament amb les dades genètiques, la malaltia residual mesurable i el pLSC6 *score*, per a refinar l'estratificació en grups de risc dels pacients pediàtrics amb leucèmia mieloide aguda. L'expressió dels gens *PPP1R27*, *CCL23*, *SCUBE1*, *PHACTR3* i *NRG4* s'associa als reordenaments de *KMT2A* en pacients pediàtrics amb leucèmia mieloide aguda.

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

1 HEMATOPOESI

L'hematopoesi és el procés de formació de les cèl·lules sanguínies en el qual un reservori de progenitors hematopoètics (*Hematopoietic Stem Cells, HSCs*) madura per donar lloc als diferents llinatges de cèl·lules de la sang.

Durant el desenvolupament embrionari, aquest procés té lloc en diferents òrgans i teixits: l'hematopoesi primitiva es dona en el sac vitel·lí i anirà desplaçant-se cap el fetge i la melsa per acabar instaurant-se principalment al moll de l'os. Aquest òrgan serà el responsable de l'hematopoesi definitiva durant l'etapa adulta de l'individu (1).

L'hematopoesi es considera un procés jeràrquic en el que a partir d'una cèl·lula mare hematopoètica pluripotent (*long-term progenitor HSCs, LT-HSC*), s'origina una cèl·lula filla més madura (*multipotent progenitor, MPP*) i una cèl·lula idèntica que, gràcies a la capacitat d'auto-renovació (*self-renewal*) de les LT-HSC mantindrà la potencialitat i característiques de *stem cell* de la cèl·lula mare tot i esdevenint un altre progenitor hematopoètic. La capacitat d'auto-renovació anirà perdent-se a mesura que els MPP es diferenciïn per donar lloc als *short-term progenitors (STP)*, els quals maduraran cap a progenitors de llinatge mieloide o limfoide (2) (Figura 1). Així, en aquest model, les cèl·lules sanguínies sorgeixen d'una sèrie de progenitors oligopotents que es converteixen en progenitors unipotents. La presència de cèl·lules oligopotents és crítica en aquest model, ja que defineixen el camí des de les cèl·lules mare fins els progenitors unipotents.

En els darrers anys, però, s'han publicat estudis en el que es suggereix un model diferent d'hematopoesi. Notta F *et al.*, proposen un model en el que la jerarquia cel·lular dels elements sanguinis canvia durant el desenvolupament i, en l'edat adulta, en contrast amb el model anterior, no existeixen progenitors oligopotents intermedis. En aquest model les HSC en primer lloc es ramifiquen per donar el llinatge megacariocític i en MPP, les quals formaran tres progenitors unipotents i unilineals que formaran el llinatge eritroide, mieloide i limfoide (3,4) (Figura 2).

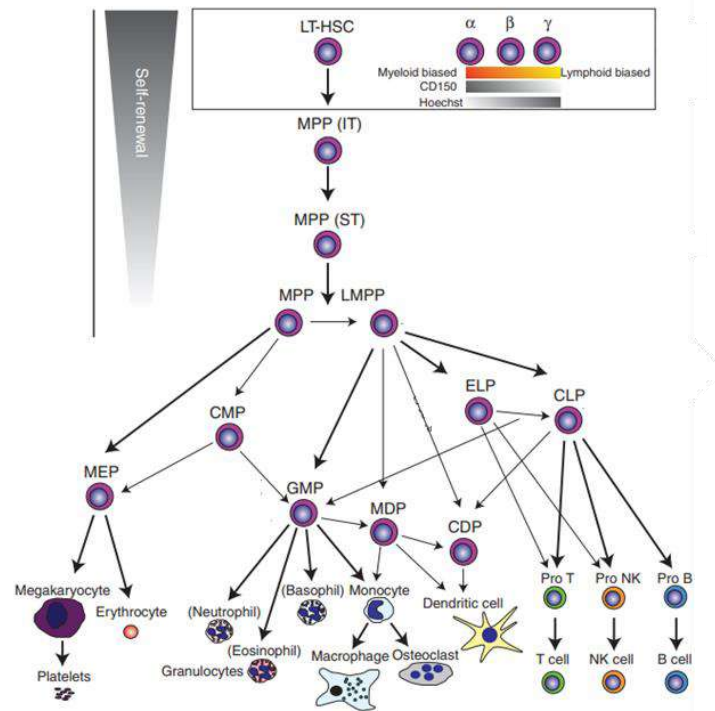


Figura 1: Hematopoesi. Progenitors i llinatges hematopoètics. Procés jeràrquic de maduració a partir del qual els diferents progenitors hematopoètics es diferenciarien per donar lloc als diferents llinatges cel·lulars. Imatge modificada de (5).

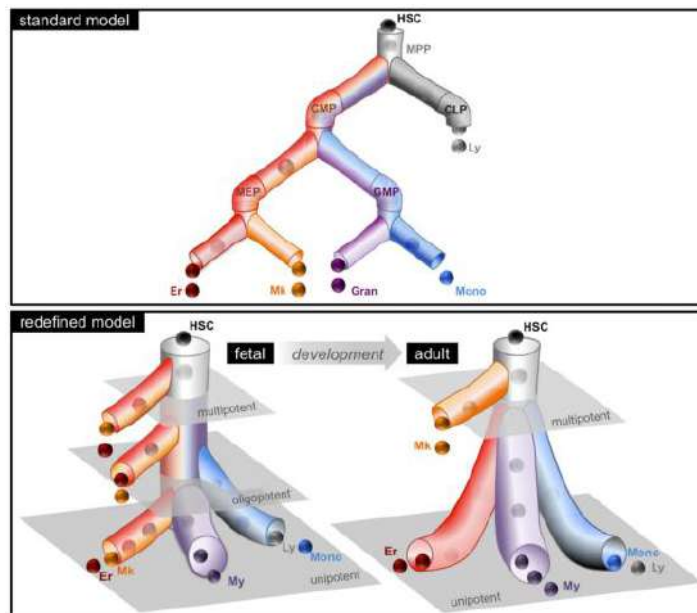


Figura 2: Comparació dels dos models actuals d'hematopoesi. *Standard model*: model estàndard d'hematopoesi, en el que una sèrie de progenitors oligopotents es diferenciarien per donar lloc a progenitors unipotents que formarien els diferents llinatges. *Redefined model*: model redefinit d'hematopoesi en el que es dona un canvi evolutiu en l'arquitectura de les cèl·lules progenitores donant únicament dos nivells de jerarquia en l'edat adulta (3).

Les vies de senyalització WNT/beta-catenina, NOTCH, Hedgehog, FLT3 i HOX es troben interrelacionades entre elles i regulen la transcripció de gens relacionats amb la proliferació, diferenciació, capacitat d'auto-renovació i supervivència de les HSCs. Així, aquestes vies participen en la regulació de l'hematopoesi i es trobaran diferencialment activades segons l'estat de diferenciació de cada cèl·lula. Quan es produeix una alteració en aquestes vies es pot produir un desequilibri entre la proliferació i la diferenciació, per tant, no és d'estranyar que s'hagin relacionat amb el procés de leucemogènesi (6–9).

2 LEUCÈMIA AGUDA PEDIÀTRICA

2.1 Definició

La leucèmia aguda és una neoplàsia hematològica clonal. Es caracteritza per la transformació maligna d'una cèl·lula progenitora immadura (blast) que dona lloc a una proliferació clonal incontrolada. L'adquisició per part dels precursors hematopoètics d'una sèrie d'anomalies genètiques i epigenètiques fa que s'alteri el procés de maduració normal, produint una aturada en el procés de diferenciació i afavorint la proliferació de les cèl·lules transformades. En conseqüència, es produeix una proliferació clonal d'aquests blasts que envaeixen el moll de l'os i la sang perifèrica, produint un fracàs de la funció medul·lar i una infiltració blàstica d'òrgans i teixits, principalment nòduls limfàtics, fetge, melsa, sistema nerviós central (SNC) i testes.

Depenent del llinatge del progenitor transformat, podem distingir entre leucèmia mieloide aguda (LMA) si el precursor hematopoètic està compromès cap a llinatge mieloide i leucèmia limfoblàstica aguda (LLA) si el precursor està compromès cap a llinatge limfoide. En el cas de la LLA, a més, es pot dividir en LLA de tipus B (LLA-B) o LLA de tipus T (LLA-T) dependent de si la cèl·lula afectada forma part del llinatge B o T. D'altra banda, s'han descrit amb una freqüència més baixa (2-5% dels casos) una sèrie de leucèmies agudes de fenotip mixte (*mixed phenotype acute leukemia*, MPAL) o llinatge ambigu (*ambiguous lineage acute leukemia*, ALAL/LALA) que inclouen leucèmies que presenten característiques de les dues línies, limfoide i mieloide, així com leucèmies molt indiferenciades en les que no es pot establir un llinatge específic (10–14).

2.2 Epidemiologia

La leucèmia aguda és la neoplàsia més freqüent en l'edat pediàtrica, representant la tercera part de tots els càncers infantils i la primera causa de mortalitat pediàtrica relacionada amb càncer (15). La incidència en l'edat pediàtrica de la LLA i la LMA és de 39,9 i 8,1 casos per milió d'habitants/any, respectivament. A diferència del que succeeix en adults, el subtipus més freqüent en nens és la LLA, que representa aproximadament un 75-80% de totes les leucèmies agudes a aquesta edat. En la LLA s'observa un pic d'incidència entre els 2 i els 5 anys d'edat; en canvi, la incidència de la LMA és més

freqüent en menors de dos anys, es manté estable durant l'edat pediàtrica i torna a augmentar progressivament amb l'edat. En general, la leucèmia pediàtrica presenta una distribució desigual entre sexes, sent més freqüent en nens que en nenes i amb presentació desigual entre les diferents ètnies. En els últims anys s'ha descrit una tendència a l'alça en la incidència de la leucèmia aguda pediàtrica, fet degut en part a un millor registre dels casos. D'altra banda, gràcies a la millora en el diagnòstic i el tractament, la taxa de mortalitat presenta una tendència inversa i la supervivència global (SG) de la malaltia ha superat el 80% als 5 anys en països de renda alta. Malgrat tot, encara existeixen diferències notables entre països i segons llinatges (16) (Figura 3) ((NIH) NCI. US Cancer Institute's Surveillance Epidemiology and En Results (SEER program/<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/childleuk.html>)).

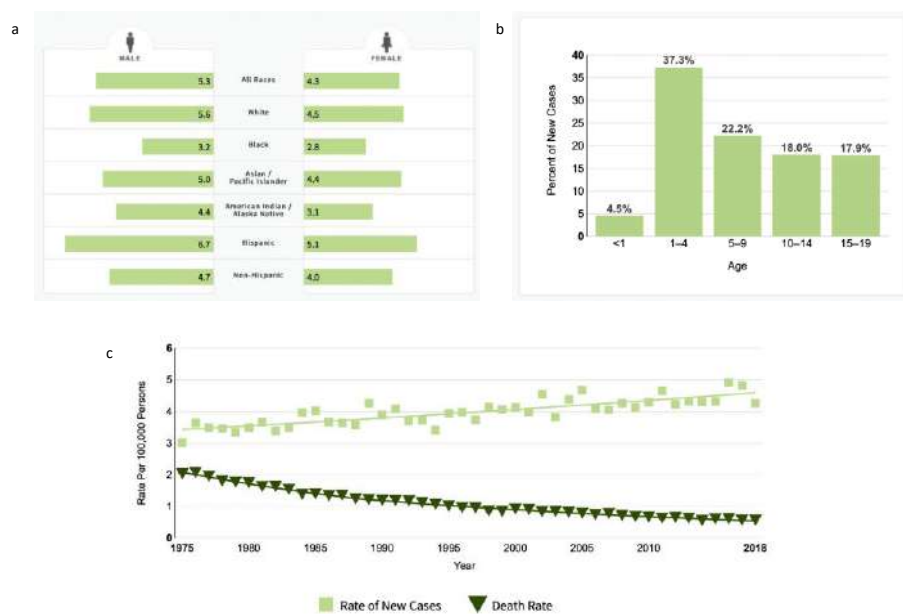


Figura 3: A: taxa de nous casos per cada 100.000 habitants per sexe i ètnia. B: percentatge de nous casos per grups d'edat. C: incidència i mortalitat. ((NIH) NCI. US Cancer Institute's Surveillance Epidemiology and En Results (SEER program/<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/childleuk.html>)). ((NIH) NCI. US National Cancer Institute's Surveillance Epidemiology and End Results (SEER program).

2.3 Etiologia

La leucèmia aguda pediàtrica és una malaltia heterogènia en la que s'observa una gran diversitat biològica, de manera que és molt improbable que tots els casos tinguin una

única etiologia. Resulta més plausible que el desenvolupament de la malaltia sigui conseqüència de múltiples factors genètics (predisposició genètica i susceptibilitat genètica) i factors ambientals.

Els factors genètics tenen un paper cada cop més rellevant en l'etiologia de la malaltia. Trobem la predisposició genètica heretada, que relaciona l'increment de risc que presenta un individu de desenvolupar la malaltia amb l'existència de variants genètiques germinals. Un percentatge petit dels casos de leucèmia aguda (5% aproximadament) estan associats a síndromes hereditaris que predisposen a la leucemogènesi, com la Síndrome de Down, Síndrome de Li-Fraumeni, Síndrome de Nijmegen o Síndrome de Louis-Bar (atàxia-telangiectàsia), entre altres. D'altra banda, recents estudis han descrit l'associació de variables genètiques o polimorfismes (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) en gens implicats en la patogènia de la leucèmia aguda, que augmentarien la probabilitat de desenvolupar-la, com per exemple *CDKN2A*, *IKZF1*, *ETV6*, *GATA3*, *ARID5B*, *RUNX1* o *CEBPA* (17,18). S'ha vist que alguns SNPs s'associen específicament a alguns subgrups biològics, com determinades variants dels gens *ARID5B* o *IKZF1*, que s'associen a LLA hiperdiploides (19). A més, també s'ha vist que certs SNPs que predisposen a la malaltia són més o menys freqüents en segons quines ètnies, el que podria explicar les diferències en la incidència de la leucèmia entre àrees geogràfiques (20). D'altra banda, la predisposició genètica adquirida estableix una relació directa entre l'aparició de forma espontània d'alteracions oncogèniques (*drivers*) en el genoma de l'individu i el desenvolupament de la leucèmia. Aquestes alteracions poden donar lloc per si mateixes a l'aparició de la malaltia o necessitar d'un segon esdeveniment per desenvolupar-la (21).

Pel que fa als factors ambientals que podrien estar jugant un paper important en el desenvolupament de la leucèmia, tot i que s'han realitzat diferents estudis prospectius, la cerca d'una associació entre l'exposició a factors ambientals i processos oncològics és complicada. Alguns factors ambientals proposats són l'ordre de naixement, la dieta, el consum de drogues o alcohol durant la gestació o el sobrepès en el naixement. Tot i així, només s'ha pogut demostrar relació directa entre el desenvolupament de la malaltia i l'exposició a radiacions ionitzants (22) i a agents genotòxics que poden desencadenar leucèmies secundàries al tractament amb quimioteràpics (23,24). Finalment, tenint en compte que la major incidència de la leucèmia es dona entre els 2 i els 5 anys, les hipòtesis

que relacionen la LLA amb l'exposició a infeccions víriques o bacterianes en l'edat infantil són les que tenen més acceptació com a possibles causants del seu desenvolupament. Les hipòtesis més reconegudes en aquest camp són: (1) La hipòtesi de la "mescla de poblacions de Leo Kinlen" i (2) la hipòtesi de l'exposició tardana de Mel Greaves (Figura 4) (25,26). Les dues hipòtesis defensen que l'aparició de la leucèmia ve donada per una resposta immune anormal a infeccions víriques o bacterianes comuns. La hipòtesi de Kinlen sosté que el flux de poblacions portadores d'un virus cap a regions amb una població pediàtrica poc exposada a aquestes infeccions promou una resposta aberrant del sistema immune que desencadena l'aparició de leucèmia infantil (27). En la segona, Greaves proposa que el desenvolupament de la leucèmia és degut, com a mínim, a la presència de dues mutacions independents. *In utero* o en una etapa molt precoç post-natal tindria lloc la primera mutació (*first hit*). Posteriorment, aquells nens que han crescut en ambients molt asèptics, davant d'una exposició tardana a una infecció, desencadenarien una excessiva proliferació limfocitària que facilita l'aparició de la segona mutació (*second hit*) (28).

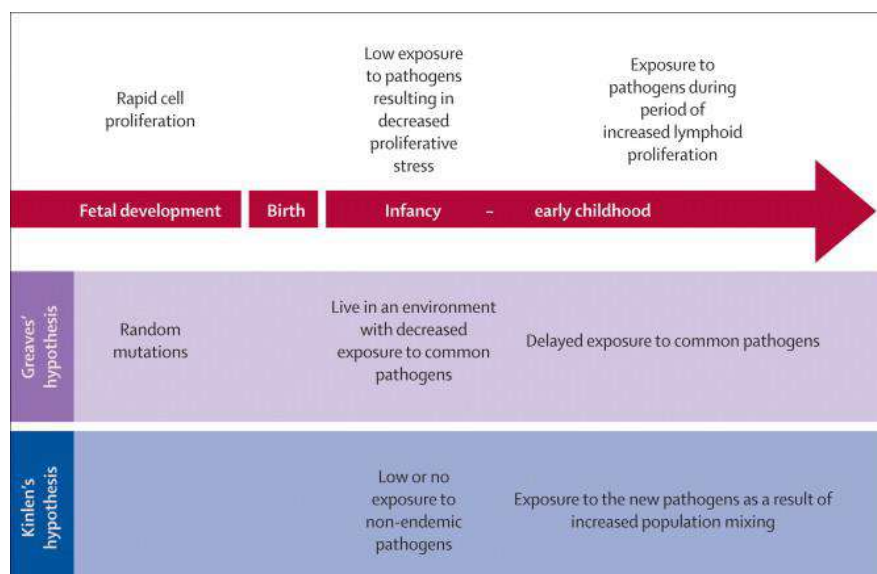


Figura 4: Hipòtesi de la mescla de poblacions de Leo Kinlen i la hipòtesi de l'exposició tardana de Mel Greaves, que relacionen la leucèmia limfoblàstica aguda amb l'exposició a infeccions (29).

2.4 Mecanismes de leucemogènesi

Tot i que el que sabem sobre l'etiologia de la leucèmia és encara limitat, el coneixement sobre els mecanismes de leucemogènesi i la cèl·lula leucèmica ha avançat en les darreres

dècades. En el procés de la leucemogènesi, l'acumulació de múltiples anomalies genètiques i epigenètiques en HSCs amb capacitat d'auto-renovació condueix a la formació d'una població de cèl·lules tumorals, conegudes com *Leukemic Stem Cells* (LSC). Alternativament, els esdeveniments leucemogènics poden afectar a progenitors en estadis més diferenciats, els quals poden adquirir la capacitat d'auto-renovació. Tot i presentar-se com una malaltia heterogènia, s'ha vist que en aquest procés de transformació existeixen mecanismes comuns, com són l'augment de la supervivència cel·lular, l'increment de la capacitat de proliferació, la inestabilitat genòmica, el bloqueig de la diferenciació i l'augment o l'adquisició de la capacitat d'auto-renovació; en definitiva, produeixen una pèrdua de control dels processos cel·lulars (30).

Actualment, s'han pogut identificar algunes alteracions genètiques i moleculars recurrents que participen en el procés de leucemogènesi i permeten definir diferents subtipus biològics de leucèmia aguda.

2.4.1 Leucemogènesi: suma d'alteracions primàries i secundàries

Alteracions primàries (*founding, first hit*)

Entre les lesions o alteracions primàries trobaríem les translocacions, que es produeixen per la recombinació anormal de gens normalment situats en cromosomes diferents. Com a conseqüència de les translocacions es pot donar un augment de l'expressió d'oncogenes (per exemple, fusió d'un oncogen amb el gen de la cadena pesada de les immunoglobulines) o es poden produir proteïnes quimèriques aberrants (*BCR::ABL1*, *ETV6::RUNX1*, etc.). Sovint, les translocacions poden definir subtipus de leucèmia que presenten característiques biològiques pròpies amb patrons genòmics distintius (31).

Les aneuploïdies són alteracions que involucren tot el set de cromosomes; es produeixen guanyos o pèrdues de cromosomes que donen lloc a cariotips amb un nombre cromosòmic diferent de 46. Segons si hi ha guany o pèrdua, poden classificar-se en hiperdiploïdia (>46 cromosomes), que inclou de forma específica el subgrup de leucèmies amb alta hiperdiploïdia (51-67 cromosomes), o en hipodiploïdia (<46 cromosomes) (32).

Alteracions secundàries (*second hit*)

Un cop es produeix l'alteració primària, els esdeveniments secundaris sovint són necessaris per tal que s'arribi a desenvolupar la leucèmia. Aquestes alteracions per si soles no són exclusives ni defineixen un subtipus genètic de leucèmia i, tot i que poden associar-se en alguns casos amb més freqüència a una determinada alteració primària, es presenten en diferents subgrups genètics. Entre les alteracions secundàries trobem principalment les mutacions genètiques i les alteracions en el número de còpies gèniques (*copy number alterations*, CNA). La majoria d'aquestes alteracions en la LLA-B afecten gens implicats en la maduració limfoide (*PAX5*, *IKZF1*, *EBF1*, *LEF1*, etc.), gens reguladors del cicle cel·lular i supressors de tumors (*CDKN2A/B*, *PTEN*, *RB1*, *TP53*, etc.), gens de vies moleculars relacionades amb la proliferació cel·lular (*JAK*, *FLT3*, *NRAS*, *KRAS*, etc.) i diversos factors de transcripció com *ETV6* i *ERG*, entre altres (33).

Així, és probable que les alteracions primàries (translocacions o aneuploidies) s'adquireixin en una fase primerenca de la leucemogènesi i afavoreixen la desregulació transcripcional i epigenètica i els processos d'auto-renovació. Posteriorment, les lesions o alteracions secundàries interrompen el desenvolupament limfoide i provoquen una aturada en la maduració o bé interfereixen en vies cel·lulars que controlen la regulació del cicle cel·lular, afecten a supressors de tumors o vies de senyalització (Figura 5).

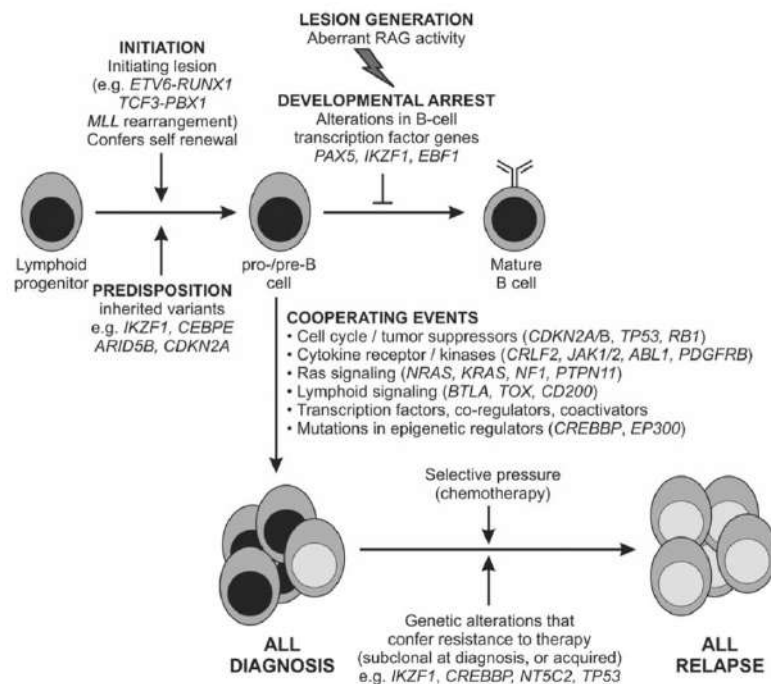


Figura 5: Esquema de l'adquisició d'alteracions genètiques en la patogènia de la leucèmia limfoblàstica aguda de llinatge B (33).

2.4.2 Leucemogènesi: evolució clonal i latència

L'evolució clonal i la seqüència temporal (latència) en la que s'adquireixen aquestes alteracions, encara s'estudia; tot i així, segons el tipus de leucèmia, LLA o LMA, s'han proposat diferents models amb episodis seqüencials que intenten aclarir-ho:

Evolució clonal i latència en LLA:

Diversos estudis del grup de Mel Greaves realitzats amb cartes de Guthrie han evidenciat la presència d'alteracions cromosòmiques ja en el moment del naixement en nens que posteriorment han desenvolupat LLA. De fet, estudis realitzats en bessons univitel·lins han demostrat que ambdós bessons neixen amb aquest primer esdeveniment pre-leucèmic, però només desenvolupa la malaltia el bessó portador d'altres alteracions secundàries d'origen post-natal que no es troben en el germà sà (34,35). Davant aquestes evidències, el model més acceptat suggereix que la primera alteració ocorre en una cèl·lula progenitora, bé amb capacitat d'auto-renovació o bé més diferenciada que adquireix aquesta capacitat com a conseqüència de l'alteració. Aquest clon pre-leucèmic es va mantenint fins que succeeix el segon esdeveniment, el qual acaba de transformar l'HSC en una LSC (36).

Evolució clonal i latència en LMA:

Pel que fa a la LMA, s'havia suggerit que s'originaven a partir d'almenys dos esdeveniments genètics somàtics. Un d'ells conferia al progenitor hematopoètic un avantatge proliferatiu (mutacions tipus I); aquestes alteracions inclouen mutacions activadores de vies de senyalització on participen *FLT3*, *C-KIT*, *NRAS*, *KRAS* i *PTPN11*. L'altre donaria lloc a un bloqueig de la diferenciació (mutacions tipus II). En aquest darrer cas s'inclourien principalment translocacions cromosòmiques (*RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11*, *PML::RARA*) o mutacions en *RUNX1*, *CEBPA* i *NPM1* (37). Tot i així, es pensa que aquest procés és molt més complex, ja que fins a un 40% de les LMA no seguirien aquest patró (38). En els darrers anys, s'ha afegit un tercer grup de mutacions patogèniques en gens relacionats amb alteracions epigenètiques que promouen, entre

d'altres, modificacions de la cromatina, afectant a diferents factors de transcripció i conferint malignitat a les HSC. En adults es pensa que podrien ocórrer com un esdeveniment primari abans que les de tipus I (39–41). En la LMA pediàtrica hi ha menys estudis al respecte, però s'ha suggerit que les mutacions en gens del complex cohesina (com el gen *SMC3*) també podrien produir-se de forma precoç en la leucemogènesi.

2.4.3 Leucemogènesi: subclons

Recentment, s'ha revisat el concepte leucemogènesi i la linealitat en l'evolució de les leucèmies (42). La teoria clàssica d'un clon inicial amb evolució lineal que va originant subclons a partir de noves alteracions genètiques es va substituint per una explicació darwiniana, en la que l'evolució clonal tindria una arquitectura ramificada. Així, segons aquesta nova visió, al diagnòstic de la leucèmia ja existirien diversos subclons de diferents LSC amb diferents alteracions genètiques (43) (Figura 6).

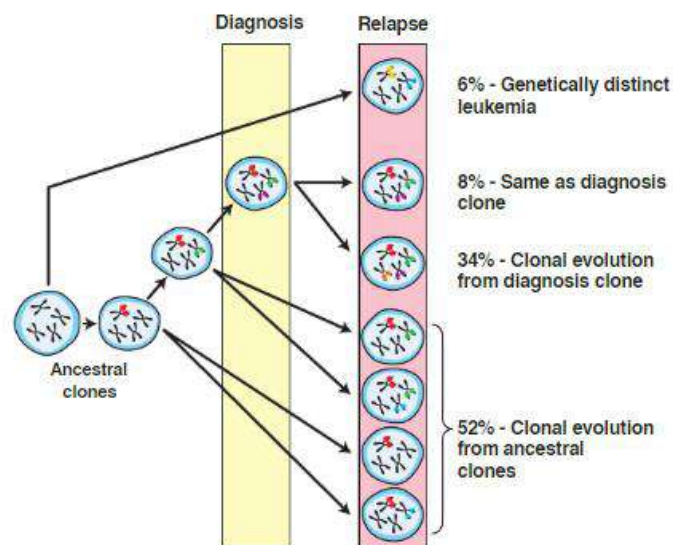


Figura 6: Relació clonal entre el diagnòstic i la recaiguda en mostres de pacients recaiguts amb leucèmia limfoblàstica aguda. La majoria de les recaigudes tenen una clara relació amb el clon majoritari al diagnòstic, amb evolucions clonals d'aquests, amb subclons ja presents al diagnòstic que s'han mantingut per selecció o amb clons ancestrals presents abans del diagnòstic (43).

Els subclons amb característiques favorables per la supervivència de la cèl·lula s'anirien seleccionant i evolucionant, donant lloc a la leucèmia i conferint resistència als tractaments (Figura 7). Així, en les recaigudes es poden trobar clons derivats d'una LSC ancestral diferent al clon majoritari que va originar la leucèmia. Aquesta teoria té

importantes implicacions en el seguiment i el tractament dirigit contra diferents dianes terapèutiques (44,45).

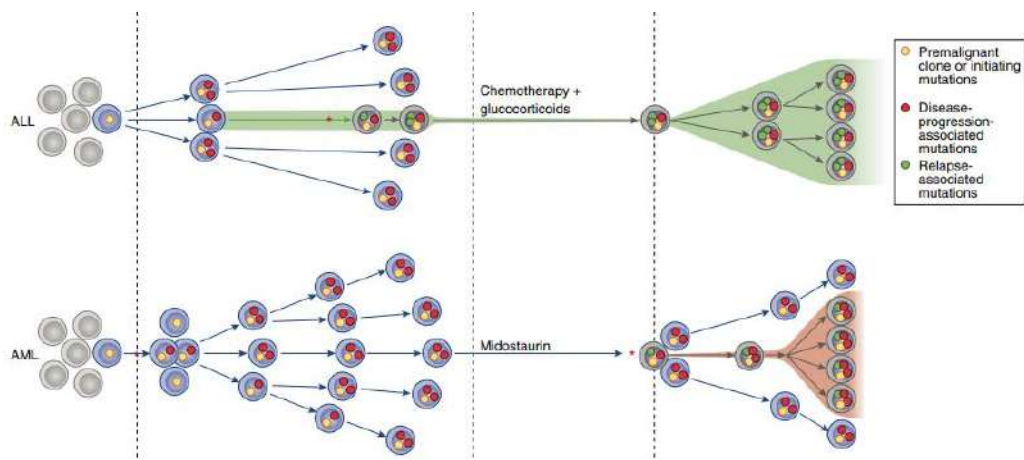


Figura 7: Diferents models d'evolució clonal de la leucèmia limfoblàstica aguda i la leucèmia mieloide aguda (44).

2.5 Diagnòstic

2.5.1 Característiques clíniques

La presentació clínica de la leucèmia aguda pediàtrica és variable; els signes i símptomes al diagnòstic són derivats d'una fallida medul·lar, reflectint una infiltració de cèl·lules leucèmiques a la medul·la òssia i altres òrgans. La durada d'aquests símptomes pot ser de dies o inclús mesos i, tot i que poden presentar-se de forma insidiosa, generalment l'aparició és de caire agut, amb una història de menys de tres mesos d'inici de la clínica fins que es diagnostica. Un dels signes més freqüents és la febre, que apareix en més de la meitat dels casos. Tot i que la febre pot ser de causa infecciosa, en la majoria de casos és deguda a la pròpia leucèmia i normalment es resol en 24-72 hores des de l'inici del tractament amb glucocorticoides i/o quimioteràpia. El símptomes més freqüents en l'exploració física al diagnòstic són aquells relacionats amb la insuficiència medul·lar: anèmia, que es tradueix en pal·lidesa i astènia; trombopènia (equimosi, petèquies), neutropènia (febre), adenopaties i malestar general. A més, en una tercera part dels casos, el símptoma principal és el dolor ossi o articular, que pot ser migratori o localitzar-se en una extremitat. En alguns casos, especialment en pacients amb major recompte leucocitari i en els pacients amb LLA de llinatge T, poden aparèixer masses mediastíniques, acompanyades de dispnea i ortopnea i fins a un 65% dels pacients

presenten hepato-esplenomegàlia. En els nens, també pot detectar-se infiltració en els testicles. En alguns casos, també poden presentar afectació del SNC, que es pot manifestar amb hipertensió endocranial o paràlisi d'un parell cranial. Tot i que és menys freqüent, també podrien observar-se manifestacions secundàries a altres infiltracions extramedul·lars (46,47).

2.5.2 Diagnòstic biològic

És important establir un diagnòstic diferencial; per això, a més de l'exploració física, és necessari realitzar una sèrie de proves complementàries d'imatge i de laboratori. L'estudi del moll de l'os és essencial, ja que en un 10% dels pacients amb leucèmia aguda no es detecten blasts en la sang perifèrica al diagnòstic.

Hemograma: en la majoria de casos de leucèmia aguda es pot observar anèmia i/o leucocitosi i/o trombocitopènia, que reflecteixen el grau en el que la medul·la ha estat reemplaçada per cèl·lules immadures. En un 10% dels casos, l'hemograma al diagnòstic pot ser normal o presentar alteracions mínimes.

Morfologia: el diagnòstic es basa en l'observació morfològica al microscopi. La presència d'un 25% d'infiltració de blasts al moll d'os ($\geq 30\%$ a sang perifèrica) confirma el diagnòstic de LLA. En el cas de la LMA, pel diagnòstic es requereixen $\geq 20\%$ de blasts només en aquells casos de LMA sense alteracions genètiques recurrents, les alteracions considerades com a tal depenen de la classificació utilitzada (10,11,14). Si bé el diagnòstic de la leucèmia aguda es pot realitzar amb l'estudi de sang perifèrica, és preferible confirmar-ho mitjançant un aspirat de moll d'os. En alguns casos, l'obtenció de cèl·lules leucèmiques és difícil i són necessaris diferents aspirats o bé la realització d'una biòpsia de moll d'os degut a una infiltració medul·lar important (medul·la empaquetada) o per fibrosis. D'altra banda, també és important la realització d'una punció lumbar per descartar la infiltració del SNC mitjançant l'estudi del líquid cefaloraquídi (LCR).

Citometria de flux: permet establir el llinatge de la leucèmia i l'estadi de diferenciació dels blasts mitjançant l'estudi de l'immunofenotip a través dels antígens de membrana i intracel·lulars dels blasts. Així, la identificació del fenotip aberrant s'utilitza per al seguiment de la malaltia residual mesurable (MRM). D'altra banda, mitjançant la citometria es pot estimar la ploïdia cel·lular i calcular l'índex de DNA dels blasts. L'estudi

de l'índex de DNA mitjançant citometria de flux permet detectar clons amb dotació cromosòmica diferent, el que possibilita una millor identificació i distinció entre les leucèmies amb hiperdiploïdia real i aquells casos hipodiploïds (casos amb baixa hipodiploïdia i quasi-haploïdia) que han patit un fenomen d'endoduplicació dels cromosomes i poden aparèixer al cariotip com a falsa hiperdiploïdia.

Citogenètica: l'estudi genètic convencional, mitjançant l'obtenció del cariotip, permet conèixer l'existència d'alteracions numèriques (aneuploïdies) i especialment estructurals (translocacions, delecions, etc.) en les cèl·lules leucèmiques. Gràcies a aquesta tècnica es poden identificar alteracions genètiques amb gran implicació pronòstica. L'estudi del cariotip es pot complementar amb la tècnica de FISH (*Fluorescent in Situ Hybridization*), que ajuda a la detecció d'alteracions críptiques no detectables amb la resolució de la citogenètica convencional. En els darrers anys, alguns laboratoris han implementat l'ús de l'*Optical Genome Mapping* (OGM). Aquesta metodologia permet detectar de forma global translocacions equilibrades i desequilibrades, aneuploïdies i alteració/canvis en el número de còpies gèniques (48,49).

Biologia molecular: algunes alteracions només es poden detectar mitjançant tècniques moleculars. La tècnica molecular bàsica és la reacció en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR), que permet amplificar la regió genètica d'interès i pot ser qualitativa (detecció/absència) o quantitativa. Aplicada en mostres de RNA amb una fase prèvia de retro-transcripció (*reverse transcription*, RT-PCR), permet la detecció dels reordenaments de diferents gens (sobretot gens de fusió amb implicació pronòstica) a causa d'alteracions estructurals, tant en la LLA com en la LMA (50). La PCR també permet, a nivell de DNA genòmic, l'estudi de la clonalitat limfoide mitjançant la detecció dels reordenaments específics dels gens de les immunoglobulines o dels receptors de cèl·lules T (IG/TR). Després de la detecció i la confirmació de la clonalitat d'aquests gens, la seqüenciació dels reordenaments específics del pacient i seguiment mitjançant PCR quantitativa s'utilitza per al seguiment de la MRM en la LLA (PCR clonoespecífica d'IG/TR, IG/TR PCR) (51).

L'amplificació de panells de sondes dirigides mitjançant la tècnica *multiplex-independent ligation probe amplification* (MLPA, *MRC-Holland*) permet estudiar de forma senzilla les alteracions en el número de còpies gèniques (CNAs).

D'altra banda, recentment s'han implementat noves tècniques moleculars d'alt rendiment (*high throughput*) d'anàlisi massiu del genoma en el diagnòstic integrat dels pacients per ampliar la informació relacionada amb la biologia de la malaltia, el seu pronòstic i possibles dianes terapèutiques personalitzades. Entre elles destaquen les tècniques per la detecció de CNAs com els SNP arrays (*single nucleotide polymorphism arrays*), l'OGM anteriorment esmentat, o les tècniques de seqüenciació massiva de nova generació (*next generation sequencing*, NGS) que permeten la detecció de variants puntuals, CNAs i translocacions de forma global o dirigida (52–54).

La NGS permet millorar el rendiment i la sensibilitat i quantificar la freqüència al·lèlica d'una variant genètica (*variant allelic frequency*, VAF) i augmentar el número de pacients estudiats en paral·lel en un mateix assaig en comparació amb la seqüenciació directa de Sanger. Existeixen diferents aproximacions en la NGS segons el material de partida utilitzat (DNA o RNA). Pel que fa al DNA trobem:

- Seqüenciació completa del genoma (*whole-genome sequencing*, WGS): consisteix en la seqüenciació completa del genoma tenint en compte tant les regions codificants com les no codificants.
- Seqüenciació de l'exoma (*whole-exome sequencing*, WES): es centra en l'estudi exclusiu de les regions exòniques del genoma.
- Seqüenciació dirigida (*targeted panels*): consisteix en l'aïllament, enriquiment i seqüenciació de regions específiques del genoma (normalment regions codificants d'interès i zones intròniques flanquejants).

Per a l'RNA, podem diferenciar:

- Seqüenciació/anàlisi del transcriptoma complet o RNA-Seq: mitjançant aquesta aproximació es seqüencia l'RNA que es transcriu a proteïna en un moment donat. Tot i que normalment s'utilitza per estudiar l'RNA missatger (RNAm) que deriva d'exons, hi ha RNA que queda fora d'aquesta regió (per exemple, introns, regions intergèniques o petits RNAs com els microRNAs, etc.) i que també pot estudiar-se mitjançant RNA-Seq.

- Seqüenciació dirigida (*targeted panels*): el concepte és el mateix que per panells dirigits de DNA, però en aquest cas partint d'RNA. Normalment s'utilitzen per a estudiar fusions en les que es coneixen ambdós gens que la formen (panells d'amplicons).

Qualsevol d'aquests panells es poden trobar dissenyats en el propi laboratori o bé comercials. Els panells poden incloure l'estudi simultani del DNA i RNA. La introducció d'aquestes tècniques ha permès un millor coneixement de la biologia de les leucèmies.

Les alteracions genètiques presents en la leucèmia cada vegada tenen més implicacions pronòstiques, passant a formar part dels criteris d'estratificació dels pacients en els diferents protocols de tractament adaptat segons el risc de recaiguda (55,56).

Per tant, degut a la complexitat del diagnòstic biològic dels diferents subtipus de leucèmia aguda, és important un **diagnòstic integrat** seguint les guies estandarditzades dels diferents grups cooperatius, combinant tècniques clàssiques i tecnologies més complexes.

2.6 Classificació

La classificació de les leucèmies ha anat canviant amb el millor coneixement de la biologia de la malaltia. Podem trobar diferents classificacions oficials que al llarg del temps han anat incorporant els coneixements biològics per definir les leucèmies: la morfologia, l'immunofenotip i les alteracions genètiques i moleculars.

- a) Classificació morfològica i citoquímica o classificació del grup cooperatiu **FAB** (*French-American-British*), basada en les troballes morfològiques dels blasts (57).
- b) Classificació immunològica de la leucèmia aguda limfoblàstica segons el grup **EGIL** (*European Group of Immunologic classification of Leukemias*), basada en l'estudi immunofenotípic. En aquesta classificació es sistematitza la leucèmia en funció de l'estat maduratiu del blast (58).
- c) Classificació de la **WHO** (*World Health Organization*) de les neoplàsies de precursors hematopoètics. Aquesta classificació integra aspectes clínics, morfològics, immunofenotípics, genètics i moleculars. Recentment, s'ha publicat una classificació WHO que detalla els subtipus més prevalents i també detalla

alguns dels subtipus exclusius de leucèmia que només es presenten en l'edat pediàtrica (10).

- d) Classificació *International Consensus Classification* (ICC) 2022 (11). Aquesta classificació també integra aspectes morfològics, fenotípics, genètics i moleculars de les leucèmies.

2.6.1 Classificació de les LLA

La classificació morfològica del grup FAB (Taula 1) no s'utilitza actualment en els protocols terapèutics per a l'estratificació dels pacients amb LLA. Les dues classificacions més emprades i de major utilitat per l'estratificació d'aquests pacients són la classificació immunològica segons el grup EGIL (Taula 2), que estratifica segons el grau de maduresa de la cèl·lula leucèmica i d'altra banda les classificacions de la WHO i la ICC (Taules 3-7), que integren els diferents aspectes anteriorment nombrats i reconeixen com a entitats diferents subgrups de LLA.

Taula 1: Subtipus de leucèmia limfoblàstica aguda segons la classificació del grup FAB (57).

<i>Classificació morfològica de la leucèmia limfoblàstica aguda (LLA) segons el grup FAB</i>	
LLA-L1	<i>Blasts petits i homogenis, amb cromatina homogènia i nucli regular</i>
LLA-L2	<i>Blasts de mida heterogènia, amb cromatina heterogènia i nucli irregular</i>
LLA-L3	<i>Blasts de mida gran i homogenis, amb cromatina fina i presència de vacuoles</i>

Taula 2: Classificació immunològica de la leucèmia limfoblàstica aguda (LLA) segons el grup EGIL (58).

<i>Classificació immunològica de la leucèmia limfoblàstica aguda LLA segons grup EGIL</i>	
LLA de línia B^a: CD19++ i/o CD79a+ i/o CD22+	
Pro-B (B-I)	<i>Sense expressió d'altres antígens de línia B</i>
Comú (B-II)	<i>CD10+</i>
Pre-B (B-III)	<i>IgM citoplasma+</i>
B madura (B-IV)	<i>Cadenes lleugeres de superfície o citoplasmàtiques+</i>
LLA de línia T^b: CD3 de citoplasma/superfície +	
Pro-T (T-I)	<i>CD7+</i>
Pre-T (T-II)	<i>CD2+ i/o CD5+ i/o CD8+</i>
T cortical	<i>CD1a+</i>
T madura	<i>CD3 de superfície+, CD1a-</i>

^aPositiu al menys 2 dels 3 marcadors. La majoria de casos són Tdt+, HLA-DR+, excepte B-IV, que sovint és Tdt-. ^bLa majoria de casos són Tdt+, HLA-DR-, CD34-, però aquests marcadors no es consideren pel diagnòstic ni per la classificació.

Taula 3: Classificació de la *World Health Organization* (WHO) de la leucèmia limfoblàstica aguda de llinatge B de l'adult (59).

Classificació dels tumors hematolímfoïdes de la WHO, 5a edició: proliferacions limfoides de cèl·lules B
Neoplàsies de cèl·lules B precursors
Leucèmia/limfoma limfoblàstica de cèl·lules B
Leucèmia/limfoma de cèl·lules B, NOS
Leucèmia/limfoma de cèl·lules B amb alta hiperdiploidia
Leucèmia/limfoma de cèl·lules B amb hipodiploidia
Leucèmia/limfoma de cèl·lules B amb <i>iAMP21</i>
Leucèmia/limfoma de cèl·lules B amb fusió <i>BCR::ABL1</i>
Leucèmia/limfoma de cèl·lules B <i>BCR::ABL-like</i>
Leucèmia/limfoma de cèl·lules B amb reordenaments de <i>KMT2A</i>
Leucèmia/limfoma de cèl·lules B amb fusió <i>ETV6::RUNX1</i>
Leucèmia/limfoma de cèl·lules B <i>ETV6::RUNX1-like</i>
Leucèmia/limfoma de cèl·lules B amb fusió <i>TCF3::PBX1</i>
Leucèmia/limfoma de cèl·lules B amb altres anomalies genètiques

Taula 4: Classificació de la *World Health Organization* (WHO) de la leucèmia limfoblàstica aguda de llinatge T de l'adult (59).

Classificació dels tumors hematolímfoïdes de la WHO, 5a edició: proliferacions limfoides i limfomes de cèl·lules T i NK
Neoplàsies de cèl·lules T precursors
Leucèmia/limfoma limfoblàstica de cèl·lules T
Leucèmia/limfoma T, NOS
Leucèmia/limfoma <i>early T-cell precursor</i>

Taula 5: Classificació de la *World Health Organization* (WHO) de la leucèmia limfoblàstica aguda de llinatge B i T pediàtrica (10).

Classificació de la WHO de les neoplàsies pediàtriques de precursors limfoides
Leucèmia/limfoma limfoblàstic de cèl·lules B
Leucèmia limfoblàstica B amb <i>t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR::ABL1</i>
Leucèmia limfoblàstica B amb <i>t(v;11q23.3); KMT2A-reordenat</i>
Leucèmia limfoblàstica B amb <i>t(12;21)(p13.2;q22.1); ETV6::RUNX1</i>
Leucèmia limfoblàstica B amb hiperdiploidia o alta hiperdiploidia
Leucèmia limfoblàstica B amb hipodiploidia, quasi haploide
Leucèmia limfoblàstica B amb baixa hipodiploidia
Leucèmia limfoblàstica B amb alta hipodiploidia
Leucèmia limfoblàstica B amb <i>t(5;14)(q31.1;q32.3); IGH::IL3</i>
Leucèmia limfoblàstica B amb <i>t(1;19)(q23;p13.3); TCF3::PBX1</i>
Leucèmia limfoblàstica B amb, <i>BCR::ABL1-like (Philadelphia-like B-ALL)</i>

Leucèmia limfoblàstica B amb iAMP21
Leucèmia/limfoma limfoblàstic de cèl·lules T i cèl·lules natural killer (NK)
Leucèmia/limfoma de cèl·lules T
Leucèmia limfoblàstica <i>Early T-cell precursor</i>
Leucèmia/limfoma limfoblàstic <i>Natural Killer</i>

iAMP21: amplificació intracromosòmica del cromosoma 21.

Taula 6: Classificació de la ICC de la leucèmia limfoblàstica aguda de llinatge B i T (11).

Classificació de la leucèmia limfoblàstica aguda
Leucèmia limfoblàstica aguda B (LLA-B)
LLA-B amb anomalies genètiques recurrents
LLA-B amb t(9;22)(q34.1;q11,2)/BCR::ABL1 <i>Amb afectació únicament limfoide</i> <i>Amb afectació multilinatge</i>
LLA-B amb t(v;11q23.3)/reordenaments de KMT2A
LLA-B amb t(12;21)(p13.2;q22.1)/ETV6::RUNX1
LLA-B hiperdiploide
LLA-B amb baixa hipodiploïdia
LLA-B quasi haploide
LLA-B amb t(5;14)(q31.1;q32.3)/IL3::IGH
LLA-B amb t(1;19)(q23.3;p13.3)/TCF3::PBX1
LLA-B BCR::ABL1-like, reordenaments de classe ABL
LLA-B BCR::ABL1-like, amb activació de JAK-STAT
LLA-B BCR::ABL1-like, NOS
LLA-B amb iAMP21
LLA-B amb reordenaments de MYC
LLA-B amb reordenaments de DUX4
LLA-B amb reordenaments de MEF2D
LLA-B amb reordenaments de ZNF384(362)
LLA-B amb reordenaments NUTM1
LLA-B amb reordenaments de HLF
LLA-B amb UBTF::ATXN7L3/PAN3, CDX2 ("CDX2/UBTF")
LLA-B amb mutació IKZF1 N159Y
LLA-B amb mutació PAX5 P80R
Entitat provisional: LLA-B ETV6::RUNX1-like
Entitat provisional: LLA-B amb alteracions a PAX5
Entitat provisional: LLA-B amb mutació ZEB2 (p.H1038R)/IGH::CEBPE
Entitat provisional: LLA-B amb reordenaments de ZNF384-like
Entitat provisional: LLA-B amb reordenaments de KMT2A-like
LLA-B, NOS
Leucèmia limfoblàstica aguda T (LLA-T)
LLA <i>early T-cell precursor</i> amb reordenaments de BCL11B
LLA <i>early T-cell precursor</i> , NOS
LLA-T, NOS
Entitat provisional: LLA de cèl·lules natural killer

iAMP21: amplificació intracromosòmica del cromosoma 21. NOS: *not otherwise specified*.

Taula 7: Noves entitats en la leucèmia limfoblàstica aguda T (tret del subtipus *BCL11B*-activat, tots són provisionals) (12).

<i>Subtipus</i>	<i>Freqüència</i>	<i>Partner del gen de fusió/altres reordenaments</i>	<i>Lesions concomitants*</i>
<i>BCL11B-activat</i>	30% de les ETP i T/mieloides MPAL, <5% de les LMA	<i>BETA (BCL11B Enhancer Tandem Amplification a 14q32, ~700kb distal de BCL11B); ARID1B, CCDC26/ MYC; CDK6; STAB1; ETV6; ZEB2; RUNX1</i>	<i>FLT3-ITD; WT1</i>
<i>TAL1/2-R**</i>	30–40% (<i>TAL2</i> infreqüents), mal pronòstic	<i>TCRA/D; TCRB (TAL2); 1p32 delecions (STIL); SNV intergèniques generant un superenhancer desregulant TAL1</i>	<i>CDKN2A, NOTCH1, PTEN, USP7</i>
<i>TLX1-R</i>	5–10% nens, 30% adults; bon pronòstic	<i>TCR</i>	<i>PHF6, DNM2, BCL11B, RB1, CDKN1B</i>
<i>TLX3-R</i>	20–25% nens, <5% adults; bon pronòstic	<i>TCR; BCL11B; CDK6</i>	<i>CDKN2A, NOTCH1, FBXW7, PTEN</i>
<i>HOXA</i>	15–25%	<i>HOXA::TCRB/TCRG; KMT2A-R; PICALM::MLLT10; SET::NUP214</i>	
<i>LMO1/2-R</i>	<i>LMO1-R</i> 5% <i>LMO2-R</i> 10%	<i>TCR; delecio críptica; enhancer/mutacions al complex del promotor LMO amb bHLH factors; sobreexpressió de LMO1/2</i>	<i>CDKN2A, NOTCH1, FBXW7, PTEN, LEF1</i>
<i>NKX2-R</i>	<5% nens	<i>NKX2.1/NKX2.2/NKX2.5::TCR; BCL11B; CDK6</i>	<i>CDKN2A, NOTCH1, PHF6, LEF1, RPL10</i>
<i>SPI1-R</i>	<5%, nens, molt mal pronòstic	<i>STMN1; TCF7; BCL11B</i>	<i>NRAS, KRAS</i>
<i>Altres, BHLH</i>	<2%	<i>TCRB::LYL1 TCR::BHLHB1; sobreexpressió de LMO</i>	

*Les mutacions de *NOTCH1* i *CDKN2A* són comuns en la leucèmia limfoblàstica aguda T (LLA-T), excepte en les LLA *early T-cell precursor*. **R: reordenaments.

2.6.2 Classificació de les LMA

Les classificacions de la WHO i la ICC (Taulas 9-12) són les més recents i permeten definir entitats clínicament significatives integrant la informació clínica, morfològica, immunofenotípica i genètica, i actualment cada vegada substitueixen més la classificació clàssica del grup FAB (Taula 8), que divideix la LMA en 9 subtipus de M0 a M7 i busca identificar el equivalent leucèmic de les cèl·lules mieloides per cada estadi de diferenciació.

Taula 8: Classificació morfològica de la leucèmia mieloide aguda (LMA) segons el grup de la FAB, freqüència en LMA pediàtrica i associació a alteracions citogenètiques recurrents (57).

FAB	Nom	% de casos	Comportament citoquímic		Associació a alteracions citogenètiques
			MPO/NS	Esterases inespecífiques	
M0*	LMA amb poca diferenciació	<5	-	-**	
M1	LMA sense maduració	15-20	+	-	t(8;21)(q22;q22)
M2	LMA amb maduració	15-25	+	-	t(15;17)q22;q12)
M3	Leucèmia promielocítica aguda	5-10	+	-	
M4	Leucèmia mielomonocítica aguda	20	+	-	inv(16)(p13;q22)/ t(16;16)(p13;q22)
M4 Eo	M4+ amb eosinofília al moll de l'os	5-10	+	+	
M5	Leucèmia monoblàstica/monocítica	10-20	-	+	KMT2A (MLL) reordenat
M6	Leucèmia eritroide	3-5	+	-	
M7*	Leucèmia aguda megacarioblàstica	<5	-	+***	t(1;22)(p13;q13)

MPO: Mieloperoxidasa. NS: Negre Sudan.

*Subtipus definits posteriorment incorporant criteris immunològics.

**Les cèl·lules són positives per algun antígen mieloide per immunofenotip.

***Les cèl·lules són positives per alfa-naftil-acetat-esterasa i per al factor VIII o la glicoproteïna plaquetària IIb/IIIa i negatives per la naftil-butirat-esterasa.

Taula 9: Classificació de la *World Health Organization* (WHO) de la leucèmia mieloide aguda de l'adult (14).

<i>Classificació de la WHO de les neoplàsies pediàtriques de precursors mieloides</i>
<i>Classificació de la leucèmia mieloide aguda en funció de les alteracions genètiques</i>
Leucèmia promielocítica aguda amb fusió <i>PML::RARA</i>
Leucèmia mieloide aguda amb fusió <i>RUNX1::RUNX1T1</i>
Leucèmia mieloide aguda amb fusió <i>CBFB::MYH11</i>
Leucèmia mieloide aguda amb fusió <i>DEK::NUP214</i>
Leucèmia mieloide aguda amb fusió <i>RBM15::MKL1 (MRTFA)</i>
Leucèmia mieloide aguda amb fusió <i>BCR::ABL1</i>
Leucèmia mieloide aguda amb reordenaments del gen <i>KMT2A (MLL)</i>
Leucèmia mieloide aguda amb reordenaments del gen <i>MECOM</i>
Leucèmia mieloide aguda amb reordenaments de <i>NUP98</i>
Leucèmia mieloide aguda amb mutacions de <i>NPM1</i>
Leucèmia mieloide aguda amb mutacions de <i>CEBPA</i>
Leucèmia mieloide aguda relacionada amb displàsia
Leucèmia mieloide aguda amb altres alteracions genètiques
<i>Classificació de la leucèmia mieloide aguda en funció de l'estat de diferenciació</i>
Leucèmia mieloide aguda amb mínima diferenciació
Leucèmia mieloide aguda sense maduració
Leucèmia mieloide aguda amb maduració
Leucèmia basòfila aguda
Leucèmia mielomonocítica aguda
Leucèmia monocítica aguda
Leucèmia eritroide aguda
Leucèmia aguda megacarioblàstica

Taula 10: Classificació de la *World Health Organization* (WHO) de la leucèmia mieloide aguda pediàtrica (10).

Classificació de la WHO de les neoplàsies pediàtriques de precursors mieloides
Leucèmia mieloide aguda, NOS
Leucèmia mieloide aguda amb alteracions genètiques recurrents
Leucèmia mieloide aguda amb t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1::RUNX1T1</i>
Leucèmia mieloide aguda amb inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB::MYH11</i>
Leucèmia mieloide aguda amb t(15;17)(q24;q21); <i>PML::RARA</i>
Leucèmia mieloide aguda amb reordenaments del gen <i>KMT2A</i> (<i>MLL</i>)
Leucèmia mieloide aguda amb t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK::NUP214</i>
Leucèmia mieloide aguda amb inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, RPN1::MECOM</i> (<i>EVI1</i>)
Leucèmia mieloide aguda amb fusions de <i>ETV6</i>
Leucèmia mieloide aguda amb t(8;16)(p11.2;p13.3); <i>KAT6A::CREBBP</i>
Leucèmia mieloide aguda amb t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15::MKL1</i> (<i>MRTFA</i>)
Leucèmia mieloide aguda amb <i>CBFA2T3::GLIS2</i> (inv(16)(p13q24))
Leucèmia mieloide aguda amb fusions de <i>NUP98</i>
Leucèmia mieloide aguda amb t(16;21)(p11;q22); <i>FUS::ERG</i>
Leucèmia mieloide aguda amb mutació a <i>NPM1</i>
Leucèmia mieloide aguda amb mutació bial·lèlica a <i>CEBPA</i>

Taula 11: Classificació de la ICC de la leucèmia mieloide aguda (11).

<i>Classificació de la leucèmia mieloide aguda (AML) segons el percentatge de blast necessaris per al diagnòstic</i>
Leucèmia promielocítica aguda amb t(15;17)(q24.1;q21.2)/PML::RARA ≥ 10%
Leucèmia promielocítica aguda amb altres reordenaments de RARA* ≥ 10%
LMA amb t(8;21)(q22;q22.1)/RUNX1::RUNX1T1 ≥ 10%
LMA amb inv(16)(p13.1;q22) o t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB::MYH11 ≥ 10%
LMA amb t(9;11)(p21.3;q23.3)/MLLT3::KMT2A ≥ 10%
LMA amb reordenaments de KMT2A** ≥ 10%
LMA amb t(6;9)(p22.3;q34.1)/DEK::NUP214 ≥ 10%
LMA amb inv(3)(q21.3;q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2)/GATA2; MECOM(EVI1) ≥ 10%
LMA amb altres reordenaments de MECOM*** ≥ 10%
LMA amb altres translocacions rares recurrents ≥ 10%
LMA amb t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1**** ≥ 20%
LMA amb mutacions de NPM1 ≥ 10%
LMA amb mutacions in-frame de bZIP CEBPA ≥ 10%
LMA i síndromes mielodisplàsiques/LMA amb mutacions a TP53 10-19% (síndrome mielodisplàsica/LMA) i ≥ 20% (LMA)
LMA i síndromes mielodisplàsiques/LMA amb mutacions de gens relacionats amb mielodisplàsia 10-19% (síndrome mielodisplàsica/LMA) i ≥ 20% (LMA)
Definides per les mutacions de ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, or ZRSR2
LMA amb anomalies citogenètiques relacionades amb mielodisplàsia 10-19% (síndromes mielodisplàsiques/LMA) i ≥ 20% (LMA)
Definida per la detecció de cariotips complexos (≥ 3 anomalies cromosòmiques clonals no relacionades en absència d'altres anomalies genètiques recurrents definitòries (del(5q)/t(5q)/add(5q), -7/del(7q), +8, del(12p)/t(12p)/add(12p), i(17q), -17/add(17p) or del(17p), del(20q), and/or idic(X)(q13))
LMA no especificades (NOS) 10-19% (síndromes mielodisplàsiques/LMA) i ≥ 20% (LMA)
Sarcoma mieloide

*Inclou LMA amb t(1;17)(q42.3;q21.2)/IRF2BP2::RARA; t(5;17)(q35.1;q21.2)/NPM1::RARA; t(11;17)(q23.2;q21.2)/ZBTB16::RARA; inv(17q) críptica o del(17)(q21.2;q21.2)/STAT5B::RARA, STAT3::RARA; altres gens rarament reordenats amb RARA:TBL1XR1 (3q26.3), FIP1L1 (4q12), BCOR (Xp11.4).

**Inclou LMA amb (q21.3;q23.3)/AFF1::KMT2A; t(6;11)(q27;q23.3)/AFDN::KMT2A; t(10;11)(p12.3;q23.3)/MLLT10::KMT2A; t(10;11)(q21.3;q23.3)/TET1::KMT2A; t(11;19)(q23.3;p13.1)/KMT2A::ELL; t(11;19)(q23.3;p13.3)/KMT2A::MLLT1.

***Inclou LMA amb t(2;3)(p11~23;q26.2)/MECOM::?; t(3;8)(q26.2;q24.2)/MYC, MECOM; t(3;12)(q26.2;p13.2)/ETV6::MECOM; t(3;21)(q26.2;q22.1)/MECOM::RUNX1.

****La categoria de síndromes mielodisplàsiques/LMA no s'utilitza per LMA amb BCR::ABL1 degut al seu solapament amb la progressió de la leucèmia mieloide crònica, BCR::ABL1 positiva.

Taula 12: Translocacions recurrents rares en la leucèmia mieloide aguda (13).

Leucèmia mieloide aguda (LMA) amb altres translocacions recurrents rares	% de blasts
LMA amb t(1;3)(p36.3;q21.3)/PRDM16::RPN1	≥10%
LMA amb t(3;5)(q25.3;q35.1)/NPM1::MLF1	≥10%
LMA amb t(8;16)(p11.2;p13.3)/KAT6A::CREBBP	≥10%
LMA megacarioblàstica amb t(1;22)(p13.3;q13.1)/RBM15::MRTF1*	≥10%
LMA amb t(5;11)(q35.2;p15.4)/NUP98::NSD1*	≥10%
LMA amb t(11;12)(p15.4;p13.3)/NUP98::KMD5A*	≥10%
LMA amb NUP98 i altres partners*	≥10%
LMA amb t(7;12)(q36.3;p13.2)/ETV6::MNX1*	≥10%

*Tenen lloc predominantment en nens.

2.6.3 Classificació de les leucèmies agudes de llinatge ambigu

En les leucèmies en les que el llinatge del progenitor compromès és ambigu (*ambiguous lineage acute leukemia, ALAL/LALA*), la WHO i la ICC proposen les classificacions descrites en les taules 13 i 14 respectivament (11,14).

Taula 13: Classificació de la *World Health Organization* de les leucèmies agudes de llinatge ambigu (14).

Leucèmia aguda de llinatge ambigu amb anomalies genètiques definitòries
Leucèmia aguda de fenotip mixte amb fusions de <i>BCR::ABL1</i>
Leucèmia aguda de fenotip mixte amb reordenaments de <i>KMT2A</i>
Leucèmia aguda de llinatge ambigu amb altres alteracions genètiques definides Leucèmia aguda de fenotip mixte amb reordenaments de <i>ZNF384</i> Leucèmia aguda de llinatge ambigu amb reordenaments de <i>BCL11B</i>
Leucèmia aguda de llinatge ambigu definides segons l'immunofenotip
Leucèmia aguda de fenotip mixte, B/mieloide
Leucèmia aguda de fenotip mixte, T/mieloide
Leucèmia aguda de fenotip mixte, subtipus rars
Leucèmia aguda de llinatge ambigu, no especificades
Leucèmia aguda indiferenciada

Taula 14: Classificació de les leucèmies agudes de llinatge ambigu segons la *International consensus classification of myeloid neoplasm and acute leukemias* (14).

Classificació de la leucèmia aguda de llinatge ambigu
Leucèmia aguda indiferenciada
Leucèmia aguda de fenotip mixte (MPAL) amb t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR::ABL1</i>
MPAL, amb t(v;11q23.3); amb reordenaments de <i>KMT2A</i>
MPAL, B/mieloide, NOS
MPAL, T/mieloide, NOS

NOS: *not otherwise specified*.

2.7 Subtipus genètics i moleculars

Gràcies als avanços tecnològics, s'han identificat noves alteracions genètiques que permeten una subclassificació de les leucèmies, ajudant al refinament en l'estratificació dels grups de risc i la identificació de dianes terapèutiques

2.7.1 Subtipus genètics i moleculars en la LLA-B:

La LLA-B és el subtipus de leucèmia pediàtrica més comú. Les alteracions genètiques presents en la LLA-B difereixen segons l'edat, de manera que a l'edat pediàtrica predominen les alteracions de bon pronòstic, mentre que a l'edat adulta predominen les alteracions amb pitjor pronòstic (Figura 8) (56).

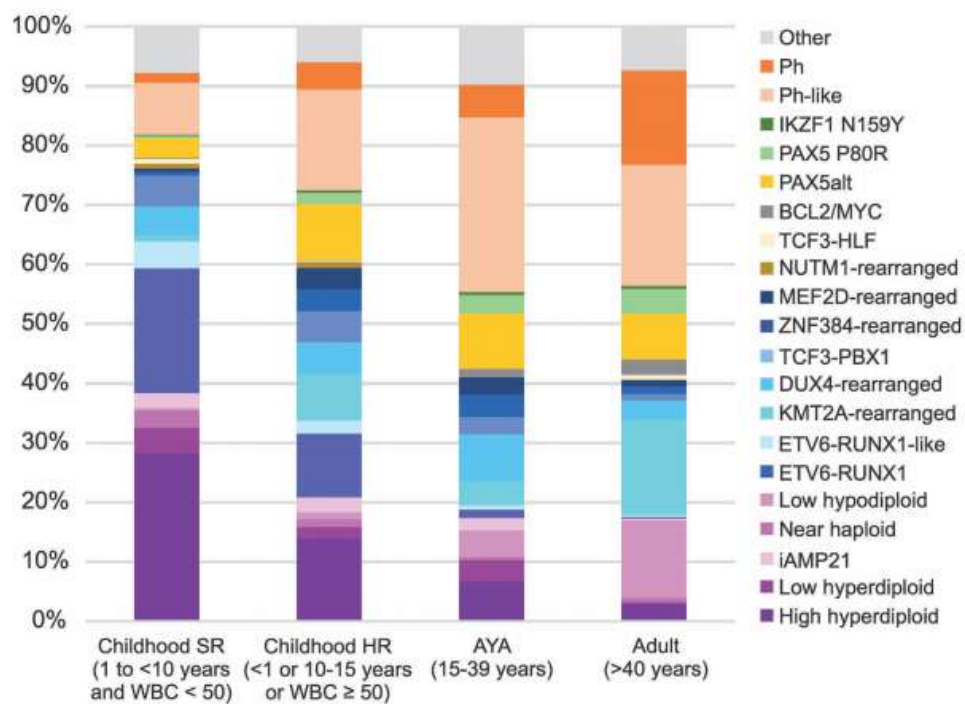


Figura 8: Freqüència dels diferents subgrups genètics segons l'edat. Les alteracions de pitjor pronòstic augmenten la seva freqüència a mesura que augmenta l'edat (56).

Les alteracions o aberràncies cromosòmiques que defineixen els diferents subtipus constitueixen l'esdeveniment primari en el procés de leucemogènesi, però són insuficients *per se* per desenvolupar-la. En general, les translocacions solen ser de dos tipus segons les conseqüències funcionals de la translocació. El primer tipus es caracteritza pel reordenament que provoca el posicionament d'un oncogen a prop de la regió reguladora de l'expressió (*enhancer* o promotor) d'un gen amb alta expressió.

D'altra banda, el segon tipus de translocació implica la juxtaposició de dos gens que porta a la formació d'una proteïna de fusió quimèrica amb característiques i funcions diferents que presenten els seus gens d'origen de forma individual.

Així, s'han pogut identificar subtipus genètics i moleculars amb entitat clínica i biològica diferenciada i amb valor pronòstic.

2.7.1.1 Alteracions primàries:

1) Subtipus prèviament establerts:

a) Alta hiperdiploïdia (51-67 cromosomes):

La LLA amb alta hiperdiploïdia és el subtipus genètic més comú en la LLA-B pediàtrica (25-30% dels pacients) i s'associa a característiques clíniques favorables. Els pacients presenten duplicacions cromosòmiques (trisomies i tetrasomies) d'entre 5 i 19 cromosomes, donant lloc a cariotips entre 51 i 67 cromosomes. Els guanys cromosòmics no són a l'atzar, sinó que els cromosomes 4, 6, 10, 14, 17, 18, 21 i X són els més recurrents. Solen presentar molt bona resposta al tractament amb una SG del 80-90%. En alguns casos, poden associar-se a altres alteracions primàries desfavorables com la $t(9;22)/BCR::ABL1$ o la $t(1;19)/TCF3::PBX1$ i en aquests casos es prioritza el pronòstic que marca la translocació (60–62).

És important ressaltar que el subgrup que s'associa a un pronòstic favorable és l'alta hiperdiploïdia, entre 51 i 67 cromosomes, amb un patró en general de trisomia dels cromosomes 4, 10, 17 i X, tetrasomia del 14, 18 i 21 i diploïdia dels cromosomes 1, 2 i 3. S'ha de diferenciar aquest subgrup de la baixa hiperdiploïdia, de 47 a 50 cromosomes i pronòstic desfavorable (63,64) i dels casos amb un número major de 67 cromosomes (quasi triploïdies o tetraploïdies), que poden tenir un pronòstic diferent i en els quals es pot sospitar un fenomen d'endoduplicació cromosòmica (veure a sota).

b) Hipodiploïdia (<46 cromosomes):

La hipodiploïdia és un subtipus infreqüent i s'associa a mal pronòstic. Podem distingir tres subgrups:

Alta hipodiploïdia (40-45 cromosomes): representen menys de l'1% de la LLA-B. Poden associar-se a les translocacions t(9;22), t(1;19) o t(12;21)(65).

Baixa hipodiploïdia (30-39 cromosomes): es presenta amb una freqüència de 2-3% de LLA-B pediàtriques i és més comú en adults. La pèrdua de cromosomes no és a l'atzar, es caracteritzen per presentar monosomies dels cromosomes 3, 7, 15, 16, 17 i disomies dels cromosomes 1, 16, 11 i 18 (60,66). Cal destacar que en aquest subtipus genètic pot observar-se el fenomen d'endoduplicació cromosòmica, de manera que alguns subclons hipodiploids dupliquen el seu material cromosòmic, donant lloc a clons quasi triploides (60-78 cromosomes). En aquests casos, és important no confondre-ho amb una alta hiperdiploïdia associada a un millor pronòstic, el que comportaria una classificació errònia del pacient. Per distingir aquestes dues entitats pot ser útil analitzar el patró de guany de cromosomes o l'estudi de la pèrdua d'heterozigositat (*loss of heterozygosity*, LOH) mitjançant SNP *array*. Les baixes hipodiploïdies poden associar-se a mutacions de *IKZF2*, *RB1*, *CDKN2A/B*, i *TP53*. Les mutacions de *TP53* són especialment freqüents (90% de casos) en el subtipus de baixa hipodiploïdia i amb freqüència es troben en la línia germinal; en aquests darrers casos, la leucèmia podria considerar-se una manifestació de la síndrome de Li-Fraumeni (60,63,65,67-70).

Quasi haploïdia (<30 cromosomes): és molt infreqüent, i només es troba descrita en un 1% dels casos en la població pediàtrica. Normalment es perden els cromosomes sexuals, X i Y, i es mantenen els cromosomes 10, 14, 18 i 21. Es caracteritza per mutacions freqüents en la via de *RAS* (particularment *NF1* però també *FLT3*, *N/KRAS* o *PTPN11*) i delecions/mutacions del gen *IKZF3*. Es considera un subtipus de molt mal pronòstic i per tant, tot i que és freqüent la endoduplicació del clon primari, no s'ha de confondre amb l'alta hiperdiploïdia donades les implicacions a nivell pronòstic (60,63,65,67-69).

c) t(12;21)(p13;q22)/*ETV6::RUNX1* (*TEL::AML1*):

Es troba en un 25% de les LLA-B pediàtriques, sent la més freqüent en aquesta població, i la seva freqüència disminueix amb l'edat (fins un 2% en adults). És una translocació críptica en el cariotip, de manera que la seva detecció es fa mitjançant FISH, RT-PCR o altres tècniques moleculars. Presenta molt bon pronòstic, amb supervivències lliures d'esdeveniment (SLE) superiors al 90%. En la majoria dels casos, aquesta translocació

requereix de l'adquisició d'altres alteracions secundàries per a desenvolupar la leucèmia. Entre aquestes alteracions s'inclouen la deleció de l'al·lel germinal d'*ETV6*, deleció de *PAX5* i mutacions a *WHSC1*; tot i així, aquestes alteracions addicionals no tenen impacte negatiu en el pronòstic (60,71).

d) $t(1;19)(q23;p13.3)/TCF3::PBX1$ ($E2A::PBX1$):

En la majoria dels casos, la translocació $t(1;19)(q23;p13.3)$ dona lloc al gen de fusió $TCF3::PBX1$, però en alguns casos, quan la translocació no és balancejada, només s'observa el $der(19)t(1;19)$. Representa un 5-6% de les LLA-B pediàtriques i només un 1% en adults i sovint s'associen a un fenotip pre-B. Aquestes leucèmies presenten un perfil d'expressió característic amb sobreexpressió de quinases com *PRKCZ*, *EB-1*, *WNT16*, *BLK* i *MERTK* entre d'altres. Històricament la translocació $t(1;19)(q23;p13.3)$ s'ha associat a un mal pronòstic, però amb els nous protocols terapèutics pot arribar a tenir un pronòstic intermig o inclús favorable (72–74).

e) $t(17;19)(q22;p13)/TCF3::HLF$:

Aquesta translocació és molt infreqüent (<1%) però comporta un pronòstic molt desfavorable. Presenta un perfil d'expressió i mutacional específic, associant-se amb expressió de marcadors mieloides i de *stem cell*, delecions de *PAX5* i *VPREB1* i alteracions de la via de RAS (75). Clínicament es pot presentar amb hipercalcèmia i coagulació intravascular disseminada i el seu pronòstic tan advers justifica la seva estratificació en grups de molt alt risc i l'ús de teràpies experimentals.

f) $t(v;11q23)$; reordenaments del gen *KMT2A* (*MLL*):

Les translocacions que impliquen el gen *KMT2A* són el subtipus més freqüent en lactants (<1 any), presentant-se en el 80% dels casos de leucèmia en aquesta franja d'edat, i representant un 15% de la LLA-B en adults. Aquest gen pot reordenar-se amb diferents *partners*, de manera que la tècnica diagnòstica més útil d'entrada per a la seva detecció és la FISH. Pot presentar-se en LLA, LMA o en leucèmies de fenotip mixt. Les translocacions més freqüents en la LLA són la $t(4;11)/KMT2A::AFF1$ i la $t(11;19)/KMT2A::ENL$. S'associa típicament a un immunofenotip pro-B (CD10-), alteracions cooperadores en la via de *RAS* i *PI3K* i alteracions en el patró de metilació. En general, representa una alteració de molt mal pronòstic en lactants, amb major

freqüència de leucocitosi, organomegàlies i alteracions al SNC. En altres subgrups d'edat o en translocacions menys freqüents el pronòstic està pitjor definit (76,77). Donada la importància d'aquestes alteracions en aquesta tesis, es desenvoluparà aquest apartat en un capítol específic.

g) $t(9;22)(q34;q11.2)/BCR::ABL1$:

La translocació $t(9;22)(q34;q11.2)$, produeix el cromosoma *Philadelphia* (Ph+) i el gen de fusió $BCR::ABL1$. Aquesta translocació defineix la leucèmia mieloide crònica (LMC, *chronic myeloid leukemia, CML*), que pot progressar des d'una fase crònica a una crisi blàstica tant limfoide com mieloide (78). En la LLA *de novo*, la seva incidència augmenta amb l'edat, de manera que en adults es presenta en un 25-30% dels pacients, en contrast amb l'edat pediàtrica, en la que representa només un 3-5% de les LLA (79). Excepcionalment, també poden presentar aquesta alteració algunes LMA. Segons el punt de trencament dels gens es poden donar tres transcrits de fusió diferents, que donaran lloc a proteïnes de diferent pes molecular: p190, p210 o p230. El transcrit e1a2 (de la fusió de l'exó 1 del gen *BCR* amb l'exó 2 del gen *ABL1*) dona lloc a la p190, isoforma més freqüent en la LLA-B pediàtrica, tot i que en fins a un 10% dels casos podem trobar la isoforma p210 del gen $BCR::ABL1$ en nens amb LLA-B. El gen de fusió activa de forma constitutiva el gen *ABL1*, provocant l'activació aberrant de quinases i conseqüent augment de vies de proliferació i una inhibició de l'apoptosi. Com a alteració secundària és molt freqüent l'associació amb delecions de *IKZF1*. Històricament, les LLA-B Philadelphia+ (LLA Ph+) presentaven molt mal pronòstic, però en l'actualitat la supervivència ha millorat de forma notable amb l'addició als esquemes de tractament convencionals dels inhibidors tirosin-quinasa (*tyrosin kinase inhibitors, TKIs*) com a teràpia dirigida a l'alteració molecular (80–82). En els darrers anys s'ha realitzat la distinció entre LLA-B $BCR::ABL1$ positiva "típica", en la que l'alteració genètica es troba únicament en els limfoblasts i, per tant, s'ha originat en cèl·lules ja compromeses cap al llinatge B, en contraposició amb les LLA-B "*CML-like*" (*Chronic Myeloid Leukemia-like*), en la que l'alteració es troba no només en els limfoblasts de llinatge B, sinó en els limfòcits T i en la sèrie mieloide (83). En aquest darrer cas, la leucèmia sembla haver-se originat en un precursor més immadur, amb capacitat per diferenciar-se a diferents llinatges. Si aquestes leucèmies són en realitat equivalents a una crisi blàstica limfoide d'una LMC és un tema en discussió actualment, ja que sembla

haver-hi algunes diferències clíniques i biològiques entre la LLA-B “*CML-like*” i les crisis blàstiques limfoides d’una LMC. En qualsevol cas, les implicacions diagnòstiques, de seguiment, tractament i pronòstiques són importants, i s’estan dedicant actualment esforços en estudiar aquests casos en pacients pediàtrics i adults (84). La nova classificació ICC reconeix aquests dos subtipus: LLA-B amb *BCR::ABL1* amb afectació multilíneal i LLA-B amb *BCR::ABL1* amb afectació limfoide (11).

h) Amplificació intracromosòmica del cromosoma 21 (iAMP21):

Aquesta alteració suposa el 2-3% de la LLA-B en nens i adolescents i la incidència és inferior en adults. Es caracteritza per la presència d’un cromosoma 21 anormal amb múltiples inversions, delecions, duplicacions i amplificacions en el braç llarg del cromosoma. No obstant, entre les posicions 21q22.11 i 21q22.12 hi ha una regió que es veu sempre duplicada i que inclou el gen *RUNX1*. Es diagnostica mitjançant la detecció de ≥ 5 senyals del gen *RUNX1* localitzades en el mateix cromosoma mitjançant la tècnica de FISH i és important no confondre-ho amb la presència de cromosomes 21 addicionals. Com alteracions secundàries freqüentment associades a aquest subgrup genètic trobem les delecions d’*ETV6* i *RB1*. La iAMP21 s’associa a un major risc de recaigudes i a un mal pronòstic si no es tracta amb protocols intensius (85–87).

2) Leucèmia Limfoblàstica Aguda B-*other* (LLA B-*other*):

Fins a la incorporació de noves tècniques d’anàlisi massiu, un cop descartades les anomalies més rellevants descrites anteriorment, restava un terç dels casos de LLA-B que no podien classificar-se i eren agrupats en un grup heterogeni anomenat “B-*other*” (64). Aquests pacients eren classificats com de risc intermedi (Figura 9a). En els darrers anys i gràcies a la disponibilitat de les tècniques de seqüenciació massiva, s’ha aconseguit identificar un gran nombre de nous subtipus genètics amb alteracions recurrents i/o perfils d’expressió diferencials dins el subgrup B-*other* (64,88) (Figura 9b i 9c). D’aquesta manera, actualment es disposa de més informació biològica i pronòstica, que permet adaptar millor els tractaments segons el risc pronòstic, la inclusió de teràpies dirigides i disminuir la toxicitat del tractament. (64,89–91).

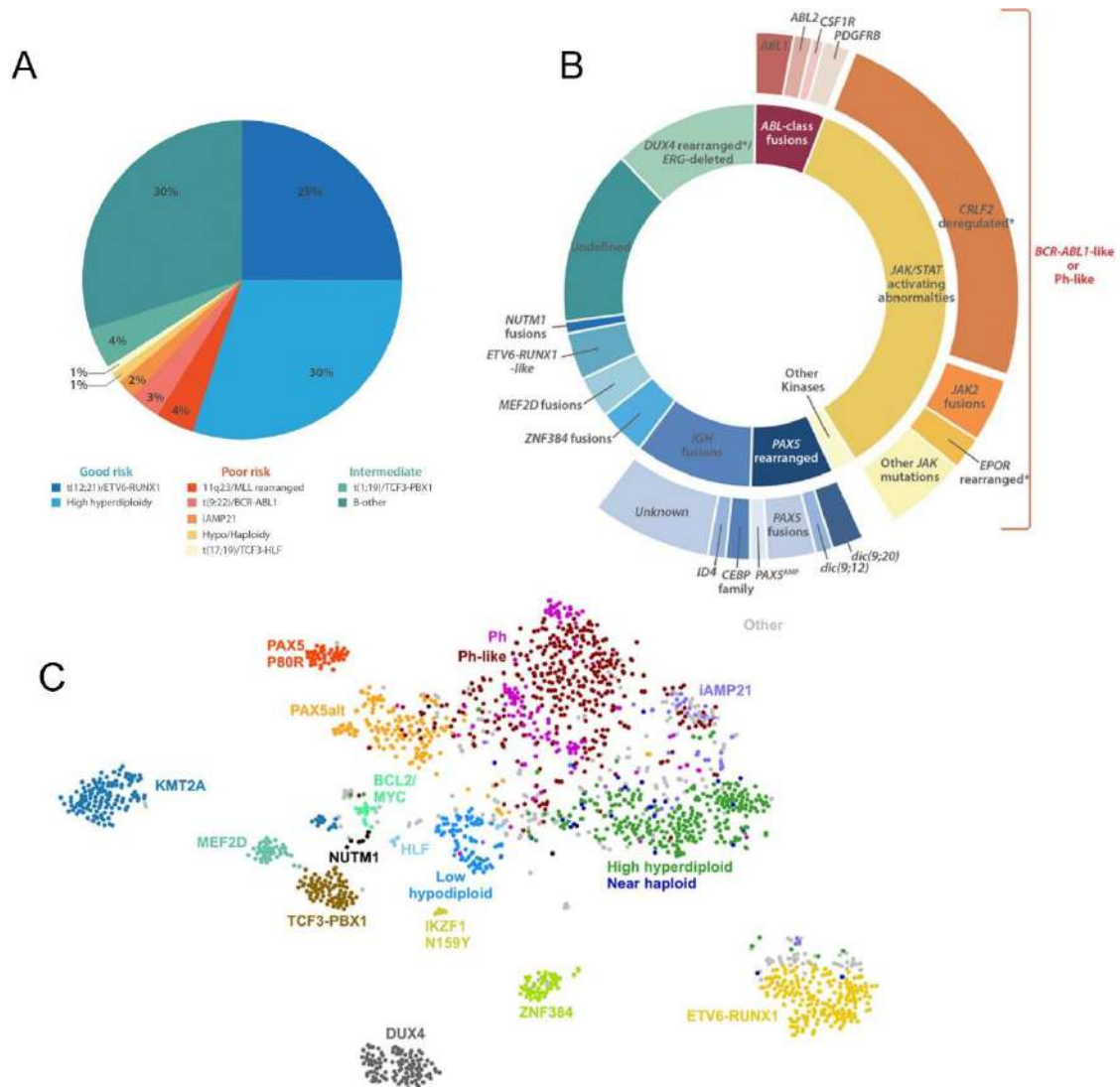


Figura 9: A) Distribució de les alteracions genètiques en la leucèmia limfoblàstica aguda de llinatge B segons el seu impacte pronòstic en grups de baix (tons blaus), intermig (tons verds) i alt risc (tons grocs, taronges i vermells). En verd fosc es pot observar el 30% de pacients de risc intermedi sense les principals alteracions genètiques recurrents (aneuploidies i principals gens de fusió), classificats en el grup B-other. B) Distribució de les noves alteracions genètiques identificades en el subgrup B-other en la leucèmia limfoblàstica aguda de llinatge B. C) Distribució dels subtipus de leucèmia limfoblàstica aguda de línia B en funció del seu perfil d'expressió, analitzat mitjançant RNA-Seq. Imatge adaptada: Figura 9A i Figura 9B de (64) i Figura 9C de (88).

a) Translocacions del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines (*IGH*):

Aquest subtipus inclou translocacions d'*IGH* amb *CRLF2*, gens de la família *CEBP*, *ID4*, *EPOR* i el microRNA miR-125b, entre altres. La presència d'aquestes alteracions provoca la desregulació de l'oncogen fusionat amb el gen *IGH*, el que es tradueix en una sobreexpressió d'aquest oncogen. La translocació t(5;14)(q31;q32)/*IL3::IGH*, entitat

reconeguda des de fa temps en la classificació de la WHO, representa menys d'un 1% de LLA, tant en nens com en adults i s'acompanya típicament d'eosinofília. Tot i que les translocacions que afecten a *IGH* són més típiques de les leucèmies de fenotip madur o limfomes, s'observen en el 5% de les LLA en adolescents i adults joves i s'associen en general a un mal pronòstic (92).

b) *BCR::ABL1-like* o *Ph-like*:

Es tracta d'un subgrup de LLA-B que presenta un perfil d'expressió gènica similar al de les LLA-B Ph+ però sense presentar la translocació t(9;22) que donaria lloc al gen de fusió *BCR::ABL1*. Aquest subgrup definit per la seva signatura gènica es va descriure de forma gairebé simultània per grups europeus (*BCR::ABL1-like*) i americans (*Ph-like*) (93,94), amb algunes diferències en quant a la metodologia i població analitzada, però descrivint una base biològica comú amb activació de quinases en absència de la translocació t(9;22). La incidència d'aquest subgrup s'incrementa amb l'edat i representa el 10-13% en nens amb un pic en adolescents i adults joves (25-30%). S'ha descrit major freqüència en el sexe masculí (2:1), nens amb síndrome de Down i en pacients d'ascendència hispana. Aquest perfil dona lloc a la desregulació de receptors de citoquines i a l'activació anòmala de vies de senyalització de quinases com en el cas de la LLA-B Ph+. S'han descrit més de 60 alteracions genètiques que donen lloc a aquest perfil, incloent translocacions, reordenaments críptics, mutacions i CNAs. Per aquest motiu, el seu diagnòstic és d'elevada complexitat. Els pacients solen presentar característiques clíniques adverses, el que comporta una alta taxa de fracàs en el tractament i recaiguda i per tant, pitjor SG respecte al grup LLA-B no *Ph-like* (95,96). En funció de la via principalment afectada, les alteracions incloses en el grup de *Ph-like* poden classificar-se en (Figura 9):

Alteracions de la via JAK/STAT: inclou 1) mutacions de *CRLF2*, *ILR7*, *JAK1*, *JAK2*, *JAK3*, *TYK2*, etc.; 2) gens de fusió (*IGH::CRLF2*, *P2RY8::CRLF2*, translocacions de *EPOR*, *JAK2*).

Fusions de classe ABL: inclou translocacions dels gens *ABL1*, *ABL2*, *CSF1R*, *LYN*, *PDGFRA* i *PDGFRB*.

Altres alteracions de quinases menys freqüents a *NTRK3*, *BLNK*, *DGKH*, *PTK2B*, *FLT3*, *FGFR1*, *TYK2* o *SH2B3*.

Les *BCR::ABL1-like* s'associen a factors adversos com leucocitosi i mala resposta al tractament, el que fa que es consideri un grup de pitjor pronòstic. No obstant això, s'ha descrit que la introducció precoç de tractament dirigit amb TKIs com imatinib o dasatinib per les fusions de classe ABL ha millorat la seva supervivència de forma significativa (97), motiu pel qual ja es contempla el seu ús en els principals protocols terapèutics pediàtrics per a aquest subgrup de pacients. De la mateixa manera, s'ha suggerit el tractament dirigit amb inhibidors d'altres quinases com inhibidors de *FLT3* o inhibidors de la via JAK/STAT com ruxolitinib, tot i que els resultats en aquest cas han estat més heterogenis (98,99).

c) *ETV6::RUNX1-like*:

S'observa en un 1-3% dels pacients pediàtrics amb LLA-B, i es defineix per la signatura d'expressió gènica diferencial observada per RNA-Seq. Es caracteritza per presentar un immunofenotip i perfil d'expressió gènica similar a les LLA-B amb la fusió *ETV6::RUNX1* però sense presentar l'alteració. Dins d'aquest grup, s'han reportat alteracions en *ETV6*, *IKZF1*, i *TCF3*. El pronòstic encara no està definit (100,101).

d) Alteracions del gen *PAX5*:

S'han descrit múltiples alteracions en *PAX5*, incloent translocacions, mutacions, amplificacions i delecions. Les anomalies cromosòmiques visibles del braç curt del cromosoma 9 (9p) representen entre un 3-5% de les LLA-B i són freqüents en les LLA-B-*other*. La majoria són delecions visibles al cariotip i alteracions cromosòmiques que inclouen translocacions i cromosomes dicèntrics que afecten al cromosoma 9. La conseqüència d'aquestes alteracions és la pèrdua parcial o total del gen *PAX5* o l'expressió de gens de fusió. D'altra banda, tot i no ser visibles citogenèticament, també són freqüents les mutacions i les amplificacions intragèniques de *PAX5*. Tanmateix, recentment, i gràcies a l'estudi del transcriptoma, s'han definit dos subtipus de LLA-B-*other* amb alteracions de *PAX5* caracteritzades per diferents perfils d'expressió gènica i alteracions: 1) *PAX5-altered* (*PAX5alt*), que inclou diferents alteracions de *PAX5* (reordenaments, mutacions i amplificacions intragèniques); i 2) un segon subtipus definit per la mutació *PAX5* p.Pro80Arg o alteracions bial·lèliques de *PAX5*, a més d'alteracions

en gens de la via de RAS i JAK-STAT. En general, aquest subtipus es considera de pronòstic intermedi (64,88).

e) Reordenaments de *DUX4*:

Els reordenaments de *DUX4* s'ha identificat recentment en un 5-10% de les LLA-B. Els reordenaments es produeixen amb major freqüència amb el gen *IGH*, donant lloc a la sobreexpressió de la proteïna truncada *DUX4*, tot i que també s'ha descrit la fusió *DUX4::ERG*. El tipus de fusió resulta molt difícil d'identificar amb les tècniques convencionals i fins al moment només es pot detectar mitjançant RNA-Seq i l'ús de *pipelines* dirigits. Els pacients amb LLA-B i reordenaments de *DUX4* tenen un perfil d'expressió i immunofenotip molt característic (CD371++ i, amb menys freqüència, CD2+) i en un elevat percentatge presenten delecions associades del gen *ERG*, el que fa possible sospitar aquest subtipus; tanmateix, el diagnòstic confirmatori s'ha de fer amb RNA-Seq. En general, aquest subgrup s'associa a un pronòstic favorable, fins i tot en aquells casos que presenten de forma concomitant una deleció de *IKZF1* (40%) (71,88,102).

f) Reordenaments de *MEF2D*:

Aquesta alteració apareix en aproximadament un 4% dels casos de LLA-B pediàtrica i en un 10% dels casos de LLA-B en adults. Els reordenaments de *MEF2D* solen ser críptics a nivell citogenètic i presenten un perfil d'expressió i immunofenotip característic (baixa/absència d'expressió de CD10, i positivitat per CD38). Els reordenaments promouen l'activitat transcripcional de *MEF2D*, acompanyat d'un augment de l'expressió de la histona deacetilasa 9 (*HDAC9*). S'ha descrit la seva sensibilitat in vitro a inhibidors d'histona deacetilases. Es considera un subtipus de pronòstic intermedi o desfavorable (64,90).

g) Reordenaments de *ZNF384*:

Els reordenaments de *ZNF384* (*ZNF384r*) defineixen un nou subtipus dins la LLA-B-*other*. Aquest gen es troba fusionat en un 6% dels pacients pediàtrics i en un 15% dels adults amb LLA-B i leucèmies de fenotip mixt (103). Les fusions de *ZNF384* conserven pràcticament tota la seqüència codificant de *ZNF384*, que es reordena amb més de 10 *partners*. Entre els més freqüents trobem *EP300*, *TCF3*, *CREBBP*, *TAF1*, *SYNG*, *EWSRI*, *BMP2K*, *SMARCA2* i *ARID1B* (64,103). Els pacients amb *ZNF384r* presenten perfils

d'expressió gènica distintius amb predomini de fenotip B, tot i que típicament amb baixa expressió de CD10, i expressió aberrant dels marcadors mieloides CD13 i/o CD33. Normalment, l'immunofenotip de les leucèmies amb *ZNF384r* compleix els criteris de MPAL i representa la meitat d'aquests casos en leucèmia pediàtrica (103–105). El pronòstic d'aquests pacients a dia d'avui no està definit però podria venir determinat pel *partner* de la fusió (64,104). Concretament, la fusió *EP300::ZNF384* s'associa a recaigudes tardanes i un mal pronòstic. A més, estudis recents demostren una sobreexpressió de *FLT3* (no-mutat) en els pacients amb *ZNF384r* i suggereixen l'ús d'inhibidors de *FLT3* com a tractament dirigit (102,106).

h) Reordenaments de *NUTM1*:

Els reordenaments del gen *NUTM1* s'observen entre el 5-7% de tots els casos en lactants amb LLA. Dins els lactants sense reordenaments de *KMT2A* representen el 21,7% dels casos, però són molt poc freqüents en nens més grans (inferior al 1%). Els *partners* més habituals són *ACIN1*, *CUX1*, *BRD9* i *ZNF618*. Els estudis realitzats fins al moment suggereixen una supervivència excel·lent (107).

i) *IKZF1 N159Y*:

La mutació *missense* p.Asn159Tyr defineix un subtipus infreqüent (<1% de LLA-B) amb un perfil d'expressió caracteritzat per la sobreexpressió de gens amb funcions oncogèniques (el gen *YAP1* que interactua amb *IKZF1*), funcions de remodelació de la cromatina (*SALL1*) i senyalització (*ARHGEF28*) (56,98).

2.7.1.2 Alteracions secundàries:

Els esdeveniments primaris en la LLA són en general insuficients per desenvolupar la leucèmia, i és necessària l'addició d'alteracions genètiques o epigenètiques secundàries i cooperants que afegeixen complexitat i heterogeneïtat a la biologia de la malaltia. S'ha identificat un gran número d'alteracions secundàries en forma de CNAs, pèrdua d'heterozigotat (*Copy Neutral-Loss of Heterozigosity*, CN-LOH) o mutacions somàtiques, que generalment afecten a gens i vies importants en la diferenciació limfoide, control cel·lular i regulació de l'apoptosi, entre d'altres (108). L'impacte pronòstic d'aquestes alteracions en alguns casos no està definit o és controvertit i, tot i que no són específiques de cada subtipus, algunes s'associen amb més freqüència a determinades alteracions

primàries. Les alteracions secundàries poden contribuir i modular el pronòstic determinat per l'alteració primària (Figura 10) (66).

Per la seva freqüència i les seves connotacions pronòstiques, unes de les alteracions més importants són les del gen *IKZF1*. Podem trobar una deleció focal d'aquest gen en el 15% dels casos de LLA i en >50% de la LLA d'alt risc (109,110); en particular, les delecions d'*IKZF1* són molt freqüents en la leucèmia amb reordenament *BCR::ABL1* (>80% dels casos) i en les leucèmies *Ph-like*. Les delecions tenen com a resultat la pèrdua de funció en la isoforma IK6 negativa dominant. A més de les delecions, també s'han descrit mutacions *missense*, *frameshift* i *nonsense* en pacients pediàtrics amb LLA-B d'alt risc. A més de les delecions en *IKZF1*, també és important la detecció de la pèrdua del número de còpies en gens recurrentment delecionats en la LLA com *BTG1*, *CDKN2A/B*, *EBF1*, *ETV6*, *PAX5*, *RB1* o la deleció intersticial en la regió PAR1 (*pseudo-autosomal region*) que genera el gen de fusió *P2RY8::CRLF2* (89). Els grans grups cooperatius pediàtrics utilitzen tres maneres d'aplicar la informació aportada per l'estudi de CNAs d'aquests gens:

1. Delecions d'*IKZF1*: tenen especial importància pronòstica en els pacients amb LLA i síndrome de Down.
2. Perfil *IKZF1^{plus}*: es defineix per la deleció d'*IKZF1* i la deleció de *CDKN2A* i/o *CDKN2B* i/o *PAX5* i/o deleció de la regió PAR1 (resultant en reordenaments de *CRLF2*), sense la deleció d'*ERG* (111).
3. Perfils de risc de CNAs del grup UKALL (*United Kingdom National Acute Lymphoblastic Leukemia*): la combinació de delecions dels gens *BTG1*, *CDKN2A/B*, *EBF1*, *ETV6*, *IKZF1*, *PAX5*, *RB1* i la deleció de la regió PAR1 (*CRLF2*), defineix un perfil de CNAs de baix risc i un perfil d'alt risc (89,112).

En quant a les mutacions, a la LLA és important la detecció de mutacions que representen dianes terapèutiques com *JAK2*, o altres mutacions d'origen germinal i s'associen a predisposició a leucèmia, com *TP53*, *ETV6*, *IKZF1*, *RAS* i *NRAS*, entre d'altres. A la taula 15 es mostren alguns dels gens més rellevants en la patogènia de LLA-B segons la seva incidència i l'interès pel seu possible valor pronòstic:

Primary chromosomal abnormality	Co-operating secondary aberrations			
	Lymphoid differentiation	Cell cycle regulation	Proliferation and cell survival	Transcription co-factors
t(12;21)/ <i>ETV6-RUNX1</i>	<i>PAX5</i>			<i>ETV6, BTG1, TBLXR1</i>
High hyperdiploidy			<i>KRAS, NRAS</i>	<i>CREBBP</i>
t(1;19)/ <i>TCF3-PBX1</i>	<i>TCF3, PAX5</i>	<i>CDKN2A/B</i>		
<i>IGH</i> translocations	<i>IKZF1</i>	<i>CDKN2A/B</i>		
B-other ALL	<i>PAX5, IKZF1</i>	<i>CDKN2A/B</i>	<i>N/KRAS, CRLF2, JAK2</i>	
t(9;22)/ <i>BCR-ABL1</i>	<i>IKZF1, PAX5</i>	<i>CDKN2A/B</i>		
<i>MLL</i> translocations		<i>CDKN2A/B</i>	<i>NRAS, KRAS, FLT3</i>	
<i>iAMP21</i>		<i>RB1</i>	<i>RAS, FLT3, CRLF2</i>	
Complex karyotype		<i>TP53</i>		
Near haploidy		<i>CDKN2A/B</i>	<i>NRAS, KRAS, NF1</i>	
Low hypodiploidy	<i>IKZF2</i>	<i>TP53, RB1</i>		

Leukemogenesis

Figura 10: Distribució de les alteracions secundàries en relació als principals subtipus de leucèmia limfoblàstica aguda de llinatge B (LLA-B) (66).

Taula 15: Algunes de les alteracions secundàries recurrents en la leucèmia limfoblàstica aguda de llinatge B (LLA-B). Adaptada de (113).

Gen	Tipus d'alteració	Via de senyalització afectada	Freqüència	Implicació clínica
<i>PAX5</i>	Delecions, translocacions i mutacions	Pèrdua de funció; gen de diferenciació limfoide	32% LLA-B	Important en el procés de leucemogènesi, però no s'associa clarament a pronòstic advers
<i>IKZF1</i>	Delecions i mutacions	Pèrdua de funció; gen implicat en la diferenciació limfoide	15% de les LLA-B pediàtriques	Pronòstic desfavorable
<i>JAK1/2</i>	Mutacions	Activació constitutiva de la via JAK-STAT	18-35% dels pacients amb LLA i Síndrome de Down. 11% dels pacients d'alt risc Ph-	Possible diana terapèutica: inhibidors de JAK

<i>Gen</i>	<i>Tipus d'alteració</i>	<i>Via de senyalització afectada</i>	<i>Freqüència</i>	<i>Implicació clínica</i>
<i>CRLF2</i>	Sobreexpressió provocada per reordenaments com <i>IGH::CRLF2</i> o <i>P2RY8::CRLF2</i>	Activació constitutiva de la via JAK/STAT	12% de les LLA-B pediàtriques	Possible diana terapèutica: inhibidors de JAK
<i>Alteracions en l'activació de quinases</i>	Reordenaments en <i>ABL1, ABL2, CSF1R, EPOR, JAK2, PDGFRB</i> ; mutacions en <i>IL7R</i> i <i>FLT3</i> ; delecions de <i>SH2B3</i>	Activació constitutiva de vies de senyalització de quinases	10% de les LLA-B pediàtriques; s'associen a les <i>Ph-like</i>	S'associen a característiques de mal pronòstic i augmenten el risc de recaiguda
<i>CREBBP</i>	Delecions i mutacions	Pèrdua d'acetilació d'histones i regulació transcripcional	19% de les LLA recaigudes; s'associen a hipodiploidies	S'associen a resistència a glucocorticoides
<i>NT5C2</i>	Mutacions	Les mutacions confereixen resistència als anàlegs de nucleòsids	Fins un 20% de les LLA recaigudes	Mutacions seleccionades en la recaiguda
<i>TP53</i>	Mutacions	Associades a leucèmia amb baixa hipodiploïdia	50% acostumen a ser heretades	Tret característic de les hipodiploides; s'associen a recaiguda i mal pronòstic

2.7.2 Subtipus genètics i moleculars en la LLA-T:

La LLA-T representa un 10-15% de les LLA en edat infantil i és més freqüent a partir dels 9 anys. L'elevada probabilitat de recaiguda i la falta de tractaments de rescat efectius fan d'aquest subtipus de leucèmia una entitat de pronòstic desfavorable (110). Aquests pacients presenten una leucèmia de biologia heterogènia amb múltiples combinacions de lesions genètiques que impliquen oncogens i gens supressors de tumors, així com alteracions en la regulació epigenètica.

2.7.2.1 Alteracions que defineixen subtipus genètics-moleculars:

Gràcies a l'estudi dels perfils d'expressió, la majoria dels casos de LLA-T poden classificar-se en funció de l'expressió aberrant i desregulada de factors de transcripció i oncogens induïts per alteracions iniciadores de la leucèmia com defectes cromosòmics o translocacions. Aquests subtipus es defineixen amb perfils d'expressió que reflecteixen el

bloqueig de la diferenciació del limfòcit T, i per tant, el grau d'immaduresa de la leucèmia, fet que explica una certa correlació amb el immunofenotip (114) (Figura 11).

S'han descrit quatre mecanismes principals que causen l'expressió aberrant de factors de transcripció en la LLA-T, que normalment son excloents i identifiquen subtipus moleculars donant lloc a diferents perfils d'expressió:

- 1) Translocacions cromosòmiques que impliquen gens dels receptors de les cèl·lules T (*T-cell receptor*, TR).
- 2) Reordenaments cromosòmics que impliquen altres gens.
- 3) Duplicacions o amplificacions de factors de transcripció.
- 4) Mutacions o petites insercions que generen noves regions reguladores que actuen com activadores de promotors.

Aproximadament el 50% dels pacients amb LLA-T presenten el primer mecanisme, amb la presència de translocacions que juxtaposen els gens que codifiquen pels receptors TR (TR alfa o TRA, TR delta o TRD, TR beta o TRB), juntament amb factors de transcripció oncogènics, el que propicia la seva expressió aberrant en els progenitors T. Entre aquests factors es troben gens de la família bHLH (*basic helix-loop-helix*) com *TAL1* o *LYL1*, gens de la família homeobox com *HOXA*, *TLX1/HOX11*, *TLX3/HOX11L2* i gens *LMO* (*LIM only domain*) com *LMO2* (114).

A partir dels estudis comparatius del patró d'expressió entre cèl·lules T sanes en diferents estadis de diferenciació i cèl·lules de pacients amb LLA-T i, i tenint en compte els perfils d'expressió aberrants que es generen, s'han consensuat tres grans subtipus de LLA-T, que agrupen els diferents subtipus basats en les anomalies cromosòmiques en la cèl·lula leucèmica (46,115) (Figura 11).

- **Early T-cell precursor (ETP, "subtipus immadur"):**

Els pacients amb aquest subtipus representen el 10% de les LLA-T pediàtriques i el 7% en adults i es caracteritzen per presentar un fenotip immadur amb marcadors de limfòcit T (CD3c, CD7+, CD2+, CD4+/-, CD5 normalment negatiu) amb absència d'expressió de CD1a i CD8 i la presència de marcadors de *stem cell* i mieloides com CD117, CD34, HLA-DR, CD13, CD33, CD11b, o CD65. Aquest subgrup té un perfil d'expressió gènica propi, similar al perfil de *stem cell*, i un perfil mutacional caracteritzat per una baixa incidència de

mutacions de *NOTCH1* i *CDKN1/2*, però mutacions freqüents en *FLT3*, *DNMT3A*, *RAS*, *IDH1*, *IDH2* (46,69,116).

- **Cortical (*Early cortical*):**

Caracteritzat per l'expressió aberrant de la família de factors de transcripció amb un domini homeobox, com *TLX3*, *NKX2.1* i *NKX2.25-7* i per l'expressió dels immunomarcadors CD1a, CD4 i CD8 (46).

- **Madur (*Late cortical*):**

Aquest subtipus es caracteritza per l'expressió de l'oncogen *TAL1*, els immunomarcadors CD4, CD8 i CD35 i els receptors $\alpha\beta$ de cèl·lules T (46).

T-cell differentiation	Subtype	Alterations	Co-legions	Prevalence	Prognosis
Double negative (DN)	ETP-ALL			< 10% Children, 40-50% Adult	Poor
	BCL11B	<i>BCL11B-R</i> (Except <i>BCL11B-TLX3</i>)	<i>FLT3-ITD, WT1</i>	< 5% of T-ALL, AML, and T/M MPAL (30% of ETP-ALL and T/M MPAL)	Good
	LMO1	<i>LMO1-R</i>		< 2% of T-ALL	
	LMO2/LYL1	<i>LMO2-R</i> Enhancer mutations	<i>RUNX1, FLT3, TCF7, NRAS</i>	< 10% of T-ALL	Poor
T-cell lineage commitment	HOXA	<i>HOXA9/10-R</i> <i>KMT2A-R</i> <i>MYB-R</i> <i>PICALM-MLLT10</i> <i>SET-NUP214</i>	<i>ETV6, CNOT3, EZH2, JAK3, STAT5B</i>	< 25% of T-ALL	Intermediate
β -selection	SPI1	<i>SPI1-R</i>	<i>NRAS, KRAS</i>	< 4% of pediatric T-ALL	Very poor
Double positive (DP)	TLX3	<i>TLX3-R</i>	<i>PHF6, CTCF, WT1, DNMT2, RPL5, KDM6A</i>	20-25% Children, < 5% Adult	Excellent
	TLX1	<i>TLX1-R</i>	<i>BCL11B, RB1, CDKN1B</i>	5-10% Children, < 30% Adult	Excellent
	NKX2-1	<i>NKX2-1-R</i> <i>NKX2-5-R</i>	<i>LEF1, RPL10</i>	< 5% of pediatric T-ALL	
	TAL1	<i>TAL1/TAL2-R</i> Enhancer mutations	<i>PTEN, 6q del, USP7, PI3KR1</i>	30-40% of T-ALL	Poor

Figura 11: Diferenciació de cèl·lules T i subtipus de LLA-T. L'esquema descriu les etapes de diferenciació de cada subtipus de LLA-T segons les alteracions genètiques específiques que condueixen a l'expressió aberrant de gens reordenats o mutats. Inclou la prevalença i el pronòstic de cada subtipus. Els diferents subtipus es troben pintats segons l'estadi de diferenciació de les cèl·lules T normals: precursor *early* de cèl·lules T (ETP, rosa i taronja), estadis primerencs de maduració de timòcits corticals (verd) i estadis tardans de maduració de timòcits corticals (blau). T/M MPAL: T/*myeloid mixed phenotype acute leukemia*; -R: reordenat (114).

2.7.2.2 Alteracions secundàries:

De la mateixa manera que en les LLA-B, diferents estudis han mostrat la necessitat d'altres alteracions secundàries com mutacions i/o delecions per la transformació completa dels limfòcits T a cèl·lula leucèmica. La seqüenciació massiva ha permès la

identificació de més de 100 gens que poden mutar-se en la LLA-T. Dos d'aquests gens estan presents en >50% de les LLA-T: les mutacions de *NOTCH1* i les delecions de *CDKN2A/B*, que es consideren esdeveniments secundaris però amb un paper central en la leucemogènesi (117). Aquestes alteracions recurrents es presenten en diferents subtipus i alteren els mecanismes normals de control del cicle cel·lular, proliferació, supervivència i diferenciació del limfòcit durant el seu desenvolupament (taula 16).

a) Alteracions en la via de senyalització de *NOTCH1*:

NOTCH1 té un paper fonamental en l'embriogènesi i l'hematopoesi promovent la diferenciació limfoide T. Les mutacions en *NOTCH1* es presenten en el 50% dels casos de LLA-T i produeixen una activació constitutiva de la via independent de lligam. Les mutacions inactivadores del seu gen regulador *FBXW7* també allarguen la vida mitjana de *NOTCH1*, conduint també a una activació aberrant de la via. El seu pronòstic a dia d'avui és controvertit i s'ha discutit si té valor de forma individual o associat a altres variables clíniques o biològiques (118). El grup francès GRAALL (*Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia*), utilitza actualment les mutacions de *NOTCH1/FBXW7/PTEN/RAS* com estratificador oncogènic per als pacients adults i la oncogenètica combinada amb la detecció dels nivells de MRM per als pacients pediàtrics amb LLA-T (119,120). Recentment, la dra. Vega-García i cols. va demostrar, en un estudi col·laboratiu a nivell nacional del grup biològic de la Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica (SEHOP), que l'efecte de les mutacions de *NOTCH1/FBXW7/PTEN/RAS* sembla depenent de l'esquema terapèutic emprat, mentre que els nivells de MRM prediuen de forma constant el pronòstic en els pacients pediàtrics amb LLA-T (121).

b) Alteracions en la via de senyalització JAK/STAT:

Aquestes alteracions són especialment comuns en LLA-T amb fenotip ETP. Inclouen mutacions activadores en *IL7R*, *JAK1*, *JAK3*, *STAT5*, delecions en *PTPN2* o translocacions afectant a gens de la via com la fusió *ETV6::JAK2*.

c) Alteracions en la via de senyalització PI3K/Akt/mTOR:

Aquesta via es sol trobar activada en pacients amb LLA-T. La causa principal es l'activació de *PTEN*, ja sigui per mutacions o delecions en aquest gen o altres gens en vies de senyalització que alteren la seva transcripció o traducció. Aquesta via pot activar-se

directament per mutacions en *AKT1*, *PI3KCA*, *PI3KR1* i *IL7R* i indirectament per alteracions de les vies JAK/STAT, NOTCH o MAPK (122).

d) Alteracions en la via de senyalització MAPK:

Inclouen mutacions en *KRAS*, *NRAS*, *FLT3* i *BRAF*. Aquestes alteracions són més freqüents en LLA-T de fenotip ETP (109,118–120,122–125).

e) Altres alteracions:

S'han trobat lesions en reguladors epigenètics (*PHF6*, *SUZ12*, *EZH2*, *KDM6A*), factors de transcripció i reguladors del cicle cel·lular (*ETV6*, *GATA3*, *RUNX1*, *LEF1*, *WT1*, *BCL11B*) i reguladors de la traducció (*CNOT3*, *RPL5*, *RPL10*) (118,123).

Taula 16: Alteracions genètiques recurrents en la leucèmia limfoblàstica T. Adaptada de (117,126).

<i>Categoria genètica</i>	<i>Gen</i>	<i>Alteració genètica</i>	<i>Freqüència¹</i>	<i>Pronòstic</i>
Via de NOTCH1	<i>NOTCH1</i>	t(7;9)(q34;p13) Mutacions activadores	<1% >50%	Desconegut Controvertit
	<i>FBXW7</i>	Mutacions inactivadores	14%	Favorable o sense impacte
Defectes en el cicle cel·lular	<i>CDKN2A/B</i>	Deleció 9p21	61%	Favorable
	<i>CCND2</i>	t(7;12)(q34;p13) deleció 11p13	1%	Indeterminat
	<i>RB1</i>	Deleció 13q14	4-12%	Sense impacte
	<i>CDKN1B</i>	Deleció 12p13	2%	Indeterminat
Factors de transcripció / creixement cel·lular i supressors de tumors	<i>MYC</i>	t(8;14)(q24;q11)	1%	Indeterminat
	<i>WT1</i>	Mutació o deleció inactivadora	10%	Sense impacte
	<i>LEF1</i>	Mutació o deleció inactivadora	10%	Indeterminat
	<i>ETV6</i>	Mutació o deleció inactivadora	8%	Sense impacte

	<i>BCL11B</i>	Mutació o delectió inactivadora	10%	Sense impacte
	<i>RUNX1</i>	Mutació o delectió inactivadora	8%	Sense impacte Desfavorable
	<i>GATA3</i>	Mutació o delectió inactivadora	5%	Desfavorable
Transducció de senyals	<i>PTEN</i>	Mutació inactivadora Delectió 10q23	19%	Desfavorable
	<i>NUP214::ABL1</i>	Amplificació 9q34	8%	Desfavorable
	<i>EML1::ABL1</i>	t(9;14)(q34;q32)	<1%	Indeterminat
	<i>ETV6::ABL1</i>	t(9;12)(q34;p13)	<1%	Indeterminat
	<i>BCR::ABL1</i>	t(9;22)(q34;q11)	<1%	Desfavorable
	<i>NRAS</i>	Mutació activadora	14%	Desfavorable
	<i>KRAS</i>	Mutació activadora	6%	Desfavorable
	<i>NF1</i>	Mutació i delectió inactivadora	4%	Sense impacte
	<i>JAK1</i>	Mutació activadora	5-18%	Sense impacte
	<i>ETV6::JAK2</i>	t(9;12)(p24;p13)	<1%	Indeterminat
	<i>JAK3</i>	Mutació activadora	8%	Indeterminat
	<i>FLT3</i>	Mutació activadora	6%	Sense impacte
	<i>IL7R</i>	Mutació activadora	10%	Sense impacte
Remodelació de la cromatina	<i>EZH2</i>	Mutació o delectió inactivadora	12%	Desfavorable
	<i>SUZ12</i>	Mutació o delectió	11%	Sense impacte

		inactivad ora		
	<i>EED</i>	Mutació o deleció inactivad ora	5%	Sense impacte
	<i>PHF6</i>	Mutació o deleció inactivad ora	19%	Sense impacte

¹Freqüència en leucèmia limfoblàstica aguda de llinatge T pediàtrica (117).

2.7.3 Subtipus genètics i moleculars en la LMA:

La LMA representa entre un 15-20% de les leucèmiques pediàtriques. Tot i les millores en els protocols de tractament, només un 60-70% dels pacients es curen. L'heterogeneïtat de la LMA s'observa en les diferències en la morfologia, immunofenotip, així com en les aberracions citogenètiques i moleculars (Figura 12A) (37,38,127,128). D'altra banda, les alteracions citogenètiques i moleculars en el diagnòstic varien en relació amb l'edat, no només entre pacients adults i pediàtrics, sinó també entre els pacients pediàtrics (Figura 12B). En aquest sentit, el lactants (23%, 0-2 anys) presenten menys alteracions de grups citogenètics favorables com les leucèmies *core binding factor* (CBF) t(8;21) i la leucèmia promielocítica aguda (LPA) t(15;17), i molt pocs casos amb mutacions de *NPM1* o *CEBPA*, mentre que els casos de reordenaments de *KMT2A* són més comuns, sobretot la t(9;11) *KMT2A::MLLT3*. En l'interval de 2 a 12 anys, les leucèmies CBF són les més predominants i disminueixen els casos de t(9;11) *KMT2A::MLLT3*. Els cariotips normals augmenten amb l'edat, del 14% en lactants al 27% en pacients més grans. (129).

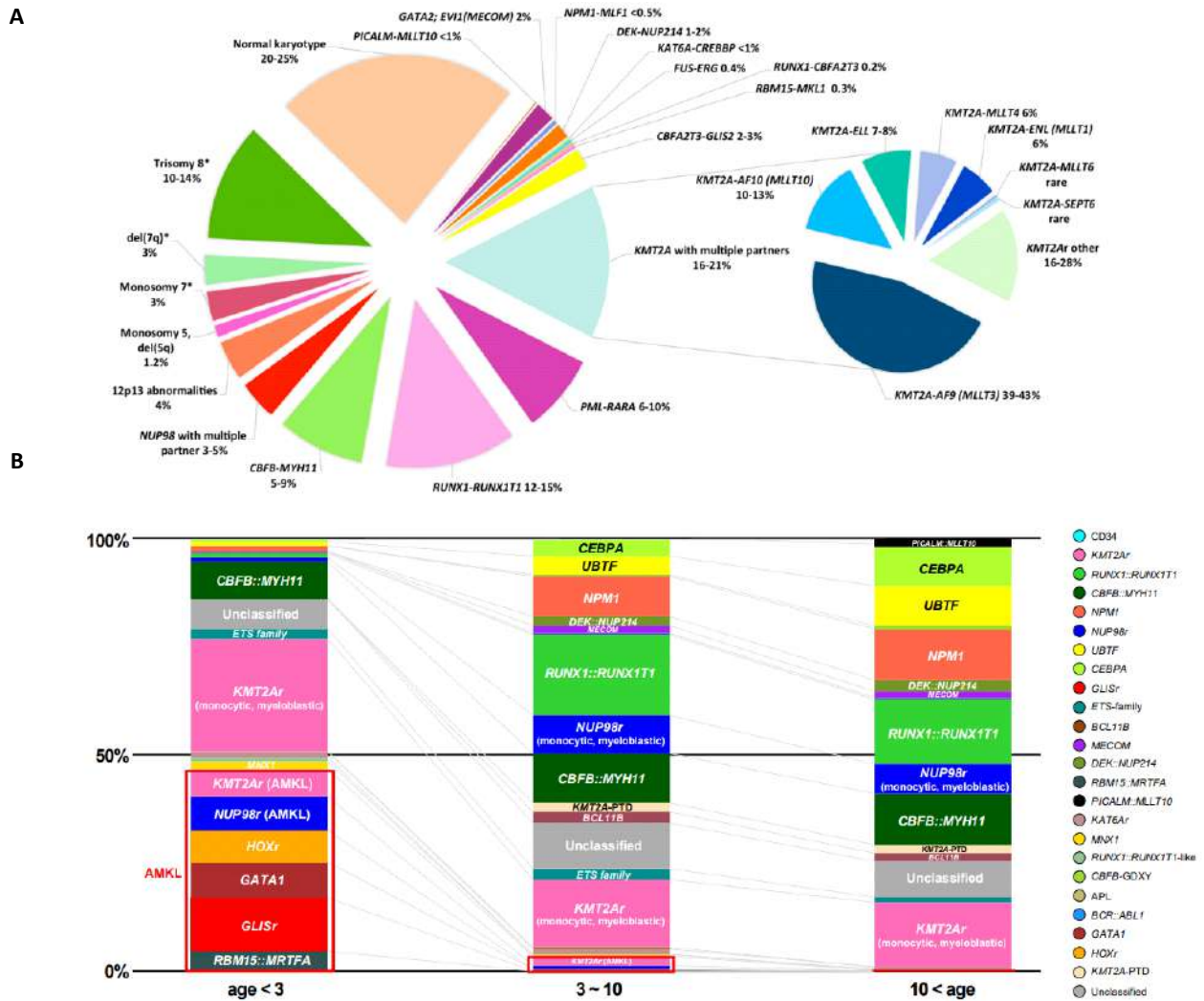


Figura 12: A) Distribució dels subgrups citogenètics i moleculars en la leucèmia mieloide aguda pediàtrica (130). B) Alteracions genètiques en la leucèmia mieloide aguda distribuïdes segons l'edat (129).

En els últims anys, les tècniques de seqüenciació massiva han permès determinar noves alteracions en la LMA. Les aberracions genètiques que podem trobar en la LMA es poden classificar en tres categories: a) aberracions cromosòmiques que inclouen translocacions balancejades, inversions, delecions, monosomies i trisomies; b) mutacions gèniques; c) alteracions epigenètiques. Totes aquestes alteracions tenen lloc en gens rellevants per a la diferenciació mieloide. A nivell molecular, la LMA és conseqüència de la col·laboració d'almenys tres tipus d'alteracions genètiques que ocorren en l'HSC:

- **Alteracions de tipus I:** alteracions que activen les vies de transducció de senyals, augmenten la proliferació i confereixen major supervivència a les HSC (inclouen activacions del receptor de *FLT3* o *KIT* i la via de senyalització de RAS).

- **Alteracions de tipus II:** afecten a factors de transcripció o a proteïnes implicades en la diferenciació hematopoètica. Aquests tipus d'alteracions alteren la diferenciació de la cèl·lula progenitora hematopoètica, que a la vegada manté o adquireix propietats d'auto-renovació. En aquesta categoria destaquen les translocacions $t(8;21)(q22;q22)/RUNX1::RUNX1T1$, la $t(15;17)(q22;q21)/PML::RARA$, la $inv(16)/t(16;16)(p13;q22)/CBFB::MYH11$, així com mutacions en *CEBPA* o en *NPM1*.
- **Alteracions epigenètiques:** La desregulació epigenètica és una característica comú tant a la LMA pediàtrica com a la de l'adult, però hi ha diferències en les alteracions associades. De forma interessant, el perfil mutacional de la LMA pediàtrica de *novo* mostra una gran similitud amb el descrit en adults que han desenvolupat una LMA secundària com a progressió d'una síndrome mielodisplàsica o de neoplàsies mieloproliferatives (131). Ambdós grups de pacients mostren de forma freqüent mutacions en gens modificadors de la cromatina, del spliceosoma, de la via de senyalització RAS i membres del complex cohesina (128,132).

2.7.3.1 Reordenaments cromosòmics

a) Alteracions del complex de transcripció CBF:

El complex de transcripció CBF està format per la interacció de la proteïna RUNX1 i la proteïna CBFB. Ambdues subunitats funcionen com un activador transcripcional heterodimèric, amb l'activitat d'unió al DNA present en RUNX1. Les translocacions $t(8;21)$, $t(16;16)$ i la inversió $inv(16)$ trobades en un 20-25% dels casos amb LMA pediàtrica, desestabilitzen i desorganitzen aquest complex (127,133). La $t(8;21)(q22;q22)$ es presenta en el 12-15% de les LMA i produeix el reordenament $RUNX1::RUNX1T1$. La $inv(16)$ i la $t(16;16)(p13;q22)$ formen el reordenament $CBFB::MYH11$ i es presenten amb una freqüència del 5-9% de la LMA pediàtrica. Les leucèmies CBF, juntament amb la $t(15;17)(q22;q21)/PML::RARA$, es troben en la categoria citogenètica de bon pronòstic (Figura 13). Les proteïnes que es formen d'aquests reordenaments s'associen de forma aberrant a complexes correpressors amb activitat deacetiladora d'histones (histona deacetil-transferasa, HDAC), el que produeix la inhibició de la transcripció de gens

específics de l'hematopoesi (134,135). De manera general, les mutacions en els gens *NRAS*, *KIT*, *NF1*, *FLT3* i *RAS* es troben associades a totes les LMA amb alteració de CBF. Tanmateix, les LMA amb reordenaments *RUNX1::RUNX1T1* presenten de forma recurrent mutacions en gens modificadors de la cromatina (42-44%), que inclouen *ASXL2* i mutacions en gens del complex de la cohesina (18-20%), pràcticament absents en les LMA amb reordenaments *CBFB::MYH11* (136)

b) Leucèmia promielocítica aguda (LPA) amb reordenament de *RARA*:

Aquest tipus de leucèmia representa un 10% de les LMA pediàtriques (39) (Figura 13). En la majoria dels casos, es produeix la translocació $t(15;17)(q22;q21)$, que genera la proteïna *PML::RARA*. *RARA* es un receptor hormonal nuclear que inhibeix la transcripció reclutant correpressors i proteïnes HDAC. La unió de l'àcid 9-cis-retinoic a *RARA* allibera els factors repressors i activa la transcripció de gens claus per la diferenciació mieloide (137). Quan es produeix la proteïna de fusió *PML::RARA* no s'alliberen els correpressors, el que provoca la diferenciació només fins a l'estadi de promielòcit. L'administració d'àcid trans-retinoic (*all trans-retinoic acid*, ATRA) permet superar aquest bloqueig de la diferenciació i s'administra com a tractament dirigit en aquests pacients. Tot i que la fusió *PML::RARA* es considera l'esdeveniment primari, s'han descrit també en aquests pacients la freqüent duplicació interna en tàndem del gen *FLT3* (*Internal Tandem Duplication*, *FLT3-ITD*) com a esdeveniment secundari (138–140).

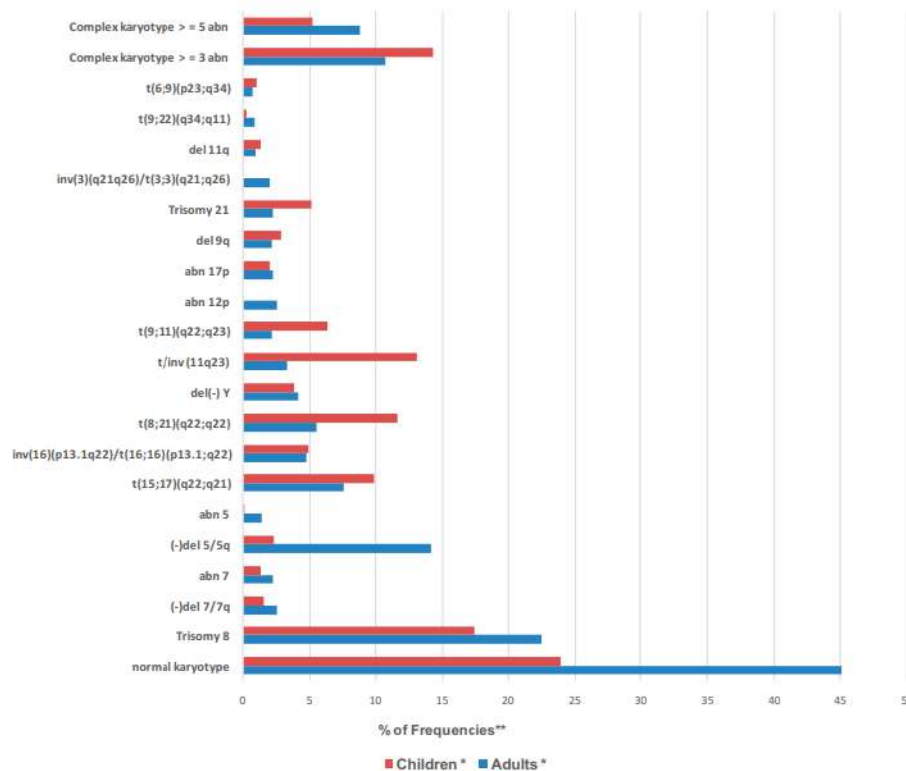


Figura 13: Freqüència de les anomalies citogenètiques més freqüents en la leucèmia mieloide aguda pediàtrica i en edat adulta. Figura de (39).

c) t(v;11q23); reordenaments del gen *KMT2A* (*MLL*):

Els reordenaments de *KMT2A* en pacient amb LMA pediàtrica són particularment comuns en lactants (35-60%) i la seva freqüència disminueix amb l'edat, sent molt menys comú en adolescents i adults joves. El partner de *KMT2A* més comú (40% dels casos) en pacients amb LMA és *MLL3* t(9;11)(p22;q23), seguit de la *MLL10* t(10;11)(p12;q23). Al contrari que en la LLA, el partner *AFF1* es troba en menys d'un 5% dels casos. En general, s'associa a mal pronòstic, tot i així, aquest pot canviar en funció del *partner*. Donada la importància d'aquestes alteracions en aquesta tesi, es desenvoluparà aquest apartat en un capítol específic (141).

d) Reordenaments de *NUP98*:

El gen nucleoporina 98kD (*NUP98*) està situat al cromosoma 11p15, i les translocacions més habituals en les que està implicat normalment són críptiques. Recentment s'ha descrit el paper crític de *NUP98* en la regulació de la transcripció gènica en el sistema hematopoètic (142). S'han identificat fusions de *NUP98* en aproximadament 4-9% dels casos de LMA pediàtrica. Els *partners* més comuns són el gen *NSD1* i el gen *KDM5A*, però

s'han descrit més de 30 partners diferents. La incidència de les diverses fusions depèn de l'edat de presentació, per exemple, les fusions de *NUP98::KMT5A* són més freqüents en nens <3 anys. Els reordenaments de *NUP98* estan associats amb cariotip normal, amb subtipus M4/M5 de la FAB a excepció dels reordenaments de *NUP98::KMT5A*, que es troben en pacients amb leucèmia megacarioblàstica aguda (M7). En un estudi recent s'ha observat que aquests pacients sovint presenten lesions gèniques concomitants. En particular, *NUP98::NSD1* es produeix conjuntament amb mutacions de *WT1* i *FLT3-ITD*, i *NUP98::KMT5A* amb alteracions del cromosoma 13. De forma global, les fusions de *NUP98* comporten un mal pronòstic amb altes taxes de refractarietat al tractament, però sembla que un subgrup de pacients amb *NUP98::KMT5A* podria tenir un pronòstic més favorable (143).

e) Reordenaments de *MNX1*:

Una altra translocació rara però recurrent a la LMA pediàtrica és la t(7;12)(q36;p13), que implica el gen *ETV6* en el cromosoma 12 i el gen homeobox, *MNX1*, al cromosoma 7. Tot i que, en general, només es troba en un 1% de tots els casos de LMA pediàtrica, es troba en un 4-30% de la LMA en nens menors de 2 anys, però no la trobem en casos de LMA congènita. A diferència de la resta de leucèmies del lactant que morfològicament són M4/M5 o M7 segons la FAB, les leucèmies amb t(7;12) acostumen a ser M0/M1. La majoria d'estudis han correlacionat aquesta fusió amb mal pronòstic, però un estudi recent suggereix que es podria reservar el transplantament al·logènic de progenitors hematopoètics (al·lo-TPH) per la recaiguda (144).

f) *CBFA2T3::GLIS2*:

CBFA2T3::GLIS2, causada per una inversió críptica del cromosoma 16 (inv(16)(p13.3q24.3)), és la fusió més freqüent en els pacients amb leucèmia aguda megacarioblàstica sense síndrome de Down associat, tot i que no és exclusiva dels pacients amb M7. Aquesta fusió està molt lligada a l'edat, mai ha estat identificada en adults i en nens la trobem quasi exclusivament en menors de 4 anys. *CBFA2T3* es troba al mateix complex que *CBFA2T1*, la proteïna codificada pel gen *RUNX1T1*. *CBFA2T3* està implicat en el manteniment i diferenciació de les *stem cell* hematopoètiques, i és fonamental pel desenvolupament dels progenitors megacario-eritroides. *GLIS2* forma

part de la família de factors de transcripció GLI relacionada amb la via Hedgehog (145). La fusió d'ambdós gens produeix un augment de la capacitat de auto-renovació dels progenitors megacariocítics per una desregulació d'*ERG* i de *GATA1*.

Les leucèmies amb aquesta fusió presenten un fenotip característic, anomenat fenotip "RAM", que es caracteritza per una expressió de CD56 d'alta intensitat, i expressió baixa o absent de HLA-DR, CD45 i CD38. A nivell clínic, són extremadament agressives amb taxes de SG entre el 15 i el 30% (129,146).

g) Altres alteracions en leucèmia aguda megacarioblàstica:

A part de les fusions *NUP98::KMT5A* i *CBFA2T3::GLIS2*, en els pacients amb leucèmia aguda megacarioblàstica no associada a síndrome de Down, trobem: reordenaments de *KMT2A* en el 15-20%, fusions que impliquen els gens *HOX* en el 15%, i aproximadament un 10% tindran la $t(1;22)(p13;q13)$, que produeix la fusió *RBM15::MKL1 (MRTFA)*. L'impacte pronòstic d'aquestes fusions en la leucèmia aguda megacarioblàstica varia des del pronòstic relativament favorable per a aquells amb reordenaments de *HOX*, resultats intermedis per aquells amb *RBM15::MKL1 (MRTFA)* i mal pronòstic per aquells pacients amb reordenaments de *KMT2A* i *NUP98::KMT5A*. En canvi, els pacients amb mutacions de *GATA1* tenen un pronòstic favorable (147).

h) *DEK::NUP214*:

La leucèmia amb $t(6;9)(p22;q34)$ dona lloc al gen de fusió *DEK::NUP214* i és relativament poc freqüent durant la infància (<2%). S'associa a una edat d'inici superior (mediana de 11,4-12,6 anys) comparat amb la resta de casos de LMA, a subtipus M2 de la classificació de la FAB, i a alts percentatges de blasts en sang perifèrica i al moll d'os en el moment del diagnòstic. El 67% dels pacients presenten *FLT3-ITD*, i el 6% mutacions del domini quinasa de *FLT3*. Respecte al seu impacte pronòstic, aquesta fusió s'associa a baixa taxa de remissions completes, altes taxes de recaiguda i una baixa SG (148).

i) *MECOM 3q26.2*:

Les inversions o translocacions que impliquen el gen *MECOM* són esdeveniments rars en la LMA pediàtrica, es troben en menys de l'1% dels pacients. El reordenament més comú és la $inv(3)(q21;q26.2)$ o $t(3;3)(q21;q26.2)$, altres partners descrits són *CDK6*

(t(3;7)(q26.2;q21), *TCRB* (t(3;7)(q26.2;q34)), *ETV6* (t(3;12)(q26.2;p13) i *RUNX1* (t(3;21)(q26.2;q22)) (67).

j) Reordenaments de *BCL11B*:

En estudis recents s'ha identificat un subgrup de leucèmies agudes immadures que presenten reordenaments en 14q32/*BCL11B* i que es caracteritzen per presentar un fenotip variable, que abasta la leucèmia mieloide aguda (M0 o M1), la leucèmia aguda de fenotip mixte T/mieloide i la leucèmia aguda limfoblàstica *early T-cell precursor*. S'ha suggerit que el pronòstic d'aquests pacients és intermedi (130,149,150).

k) Altres reordenaments recurrents en la LMA:

Existeixen altres reordenaments recurrents en la LMA recollits a la taula 17, alguns d'ells recollits en la classificació de la WHO de 2016, en la cinquena edició de la classificació de la WHO de tumors hematolímoides i a l'ICC (veure taules prèvies) (11,14,151). A més, s'han descrit altres reordenaments balancejats, els quals, tot i considerar-se rellevants en la leucèmia, són molt poc freqüents i el seu impacte clínic encara és controvertit.

Taula 17: Altres alteracions genètiques recurrents i reordenaments genètics poc freqüents en la leucèmia mieloide aguda recollides en classificacions internacionals. Taula adaptada de (11,14,151).

<i>Reordenament</i>	<i>Freqüència</i>	<i>Impacte clínic</i>
LMA amb t(9;22)(q34.1;11.2)/ <i>BCR::ABL1</i>	<1%	Desfavorable
LMA amb t(8;16)(p11.2;p13.3)/ <i>KAT6A::CREBBP</i>	<1%	
LMA amb t(16;21)(p11;q22)/ <i>FUS::ERG</i>	<1%	Desfavorable
LMA amb t(16;21)(q24;q22)/ <i>RUNX1::CBFA2T3</i>	0.2%	Favorable
LMA amb t((3;5)(q25;q35)/ <i>NPM1::MLF1</i>	<0.5%	Desfavorable
LMA amb t(10;11)(p12-13;q14-21)/ <i>PICALM::MLLT10</i>	<1%	

2.7.3.2 Aneuploidia en LMA

Les pèrdues del cromosoma 5 (-5)(o-5q) i del cromosoma 7 (-7) són força rares, les trobem en <5% dels nens amb LMA. Com en l'adult, estan associades a mal pronòstic i en alguns protocols els pacients amb aquestes alteracions són candidats a al·lo-TPH en primera remissió completa (RC). Els cariotips complexos (>3 alteracions cromosòmiques estructurals sense citogenètica favorable i sense reordenaments de *KMT2A*) són relativament comuns en la LMA pediàtrica, però a diferència dels adults no s'ha

correlacionat de forma sòlida amb el pronòstic i per aquest motiu no s'utilitza en l'estratificació del risc. A la LMA pediàtrica són freqüents altres alteracions cromosòmiques numèriques, però no tenen implicacions pronòstiques, per exemple: trisomia 8 (10-15%), trisomia 21 adquirida (5%) i rarament trisomies 4, 6, 13 i 19 (67).

2.7.3.3 Mutacions en la LMA

a) Mutacions en vies de transducció de senyals

Un dels gens més freqüentment mutat en nens amb LMA és el gen *FLT3*. Les mutacions poden ser provocades per una duplicació interna en tàndem en el domini jxtamembrana (*FLT3-ITD*) o bé mutacions puntuals en el domini tirosin-quinasa (*tyrosine kinase domain*, *FLT3-TKD*). Aquest gen codifica per una proteïna de classe III dels receptors tirosin-quinasa que tenen un paper important en l'hematopoesi normal. La unió de FLT3 al seu lligand activa la senyalització incrementant la proliferació, la supervivència i la diferenciació dels progenitors hematopoètics. Les dues mutacions serien considerades alteracions de tipus I i produeixen una activació constitutiva del receptor, però amb implicacions pronòstiques diferents. El significat pronòstic de *FLT3-TKD* és controvertit, però la presència de *FLT3-ITD* implica un augment del risc de recaiguda i pitjor SG, especialment en aquells casos en els que es produeix una pèrdua de l'al·lel germinal (152,153). El pronòstic desfavorable i la pitjor supervivència depenen la càrrega al·lèlica de *FLT3-ITD*, és a dir, d'un rati elevat de l'expressió de *FLT3* de l'al·lel mutat respecte el *wild type* i de les lesions genètiques concomitants. Així, els pacients amb mutacions a *NPM1* i *FLT3* amb rati de *FLT3-ITD* baix (<0.5) d'al·lel mutat tenen un pronòstic similar als pacients amb *FLT3* no mutat (39,154,155). Altres gens associats a vies de transducció de senyals que s'han observat freqüentment mutats en la LMA són *K/NRAS*, *ckIT*, *CBL*, *NF1* i *PTPN11*.

b) Mutacions en *CEBPA*

Les mutacions en el gen *CEBPA* es troben en un 5-10% dels pacients amb cariotip normal, però també s'han vist en el context de cariotips amb alteracions associades, com la deleció del cromosoma 9. *CEBPA* codifica per un factor de transcripció que promou la diferenciació en els precursors mieloides durant l'hematopoesi. Les mutacions en *CEBPA* són excloents amb la presència d'altres reordenaments cromosòmics i es localitzen en

les regions amino i carboxi-terminal, produint la pèrdua de la longitud completa de la proteïna (*full length form*), p42, i la formació de la isoforma *CEBPA* (p30) truncada. Actualment s'ha observat que els pacients amb mutacions a *CEBPA* i pacients amb mutacions de *CEBPA* i *FLT3-ITD* tenen un pronòstic favorable (39,127,128,155).

c) Mutacions en *NPM1*

El gen *NPM1* codifica per la proteïna NPM1, que es troba localitzada principalment al nucli i es desplaça contínuament entre nucli i citoplasma. Desenvolupa diverses funcions, participant en la biogènesi dels ribosomes, reparació del DNA o mantenint l'estabilitat genòmica. Les mutacions en aquest gen es presenten en un 5-7% dels pacients amb LMA pediàtrica i provoquen la deslocalització de la proteïna al citoplasma i promouen la leucemogènesi. Tant en adults com en nens, les mutacions de *NPM1*, freqüentment, s'associen a la presència de *FLT3-ITD*. Recentment, en la LMA pediàtrica, alguns estudis han demostrat el pronòstic favorable d'aquestes mutacions tant en els pacients que presenten mutacions de *NPM1* de forma aïllada però també en els pacients amb *NPM1/FLT3-ITD* (39).

d) Mutacions d'*UBTF*

En un estudi per identificar l'espectre d'alteracions genòmiques en el context de la LMA pediàtrica en recidiva es va identificar una nova mutació recurrent, la duplicació en tàndem en el exó 13 del factor de transcripció d'unió *upstream* (*UBTF-TD*). Les mutacions d'*UBTF* representen el 4% de totes les LMA pediàtriques *de novo*, són menys freqüents en adults i s'associen a mal pronòstic i a persistència de MRM. Solen tenir cariotip normal o trisomia del cromosoma 8, i coexisteixen amb mutacions de *WT1* i *FLT3-ITD*, però no amb altres fusions conegudes. Les *UBTF-TD* són estables durant la progressió de la malaltia i estan presents en el clon fundador (156).

2.7.3.4 Mutacions en modificadors epigenètics

a) Mutacions en reguladors de la metilació del DNA:

DNMT3A és una metiltransferasa que produeix la metilació del DNA, i està mutada aproximadament en el 20% de les LMA de l'adult i s'associa amb mal pronòstic. Les mutacions en TET2, enzim que regula l'inici de la metilació del DNA, es produeix en el 10-

15 % dels casos de LMA en adults. Les mutacions d'*IDH1* i *IDH2*, presents en el 20% de les LMA d'adult, contribueixen al desenvolupament de la leucèmia per inhibició de les proteïnes TET. Si bé aquests reguladors de la metilació del DNA són freqüents en la LMA de l'adult, són força rars en la LMA pediàtrica. Les mutacions de *TET2* estan presents aproximadament en un 6% dels casos de LMA pediàtrica, les mutacions d'*IDH2* en un 2-3% i les mutacions de *DNMT3A* i *IDH1* pràcticament són inexistents.

b) Mutacions en gens modificadors de la cromatina:

En la LMA són comuns les mutacions que afecten a les proteïnes que pertanyen o interactuen amb el complex repressiu *polycomb 2* (PRC2), que regula l'expressió gènica durant l'hematopoesi i dels gens *HOX*. Les mutacions en LMA que afecten la funció de PRC2 inclouen les mutacions d'*EZH2*, *ASXL1* i *KDM6A*. En la LMA pediàtrica la freqüència de mutacions d'*EZH2* i *ASXL1* són similars a les de l'adult, al voltant del 5%.

c) Mutacions en gens del complex de cohesina:

El complex cohesina és una estructura composta per *SMC1A*, *SMC3*, *RAD21* i *STAG1* o *STAG2*, i està implicat en l'intercanvi de cromàtides durant l'anafase, la regulació de la reparació del DNA, i el control de la transcripció. Aquestes mutacions són rares a l'edat pediàtrica, però es troben de forma recurrent a les LMA amb reordenament de *RUNX1::RUNX1T1* (141).

d) Mutacions de *WT1*:

La proteïna *WT1* s'expressa a l'uroepiteli i en els progenitors hematopoètics CD34+, i té un paper en la regulació del creixement i del desenvolupament normal. Com *WT1* contribueix a la leucemogènesi no es coneix del tot, però recentment s'ha suggerit que la pèrdua de funció de *WT1* a causa de la disminució de l'expressió o la pèrdua de funció secundària a les mutacions, produeix una inhibició de la funció TET i una disminució de la hidroximetilació contribuint a la leucemogènesi. Les mutacions en el gen *WT1* es produeixen en el 10% dels adults i el 15% dels pacients pediàtrics amb LMA, i són més freqüents en nens de 3 a 14 anys. S'associen a la presència de cariotip normal, mutacions de *FLT3-ITD* i mal pronòstic (128).

2.8 Pronòstic

En general, el pronòstic de la leucèmia pediàtrica ha millorat de manera significativa en les últimes dècades i sobretot en el cas de les LLA de fenotip B. Les LMA i les LLA-T presenten en general un pitjor pronòstic, fet que evidencia la necessitat urgent de disposar de millors biomarcadors per identificar el risc en aquests pacients.

La millora en la supervivència de la leucèmia pediàtrica les últimes dècades ve donada per una combinació de factors: 1) uns millors esquemes terapèutics; 2) millor tractaments de suport i 3) una millor estratificació dels pacients en els diferents grups de risc de recaiguda al diagnòstic i durant el seguiment. Això permet aplicar estratègies terapèutiques adaptades al risc per a cada pacient, de manera que s'intensificarà en aquells pacients d'alt risc i es reduirà en els de baix risc, disminuint també la toxicitat. Per classificar els pacients al diagnòstic segons el seu grup de risc cal tenir en compte diferents factors pronòstics, que venen determinats per les característiques del pacient, de la malaltia i del tractament *per se*.

D'altra banda, cal tenir en compte que els diferents factors de risc biològics o clínics no afecten la supervivència de la mateixa manera en tots els protocols de tractament, posant de manifest la importància del tractament en sí mateix.

2.8.1 Factors pronòstics propis del pacient

- **Edat:**

En general, la leucèmia aguda pediàtrica presenta millors taxes de supervivència que la leucèmia en l'edat adulta. L'edat, doncs, es considera un dels principals factors pronòstics. Pel que fa a la LLA, els nens entre 1 i 9 anys presenten millor pronòstic que els lactants i els adolescents. En el cas de les LMA, els pacients entre els 2-14 anys tenen millor pronòstic respecte els lactants i els pacients majors de 15 anys. Els grups de pitjor pronòstic tenen un risc de recaiguda més elevat, presenten subtipus genètics més agressius i en ells el maneig clínic resulta més difícil (157).

2.8.2 Factors pronòstics propis de la malaltia

- **Xifra de leucòcits al diagnòstic:**

Una xifra de leucòcits elevada confereix un pronòstic desfavorable, particularment en els pacients amb LLA. En alguns protocols s'agrupa l'edat i la xifra de leucòcits per classificar els pacients. EL *United States National Cancer Institute* (US NCI) distingeix un grup de baix risc definit per edat entre 1 i 9 anys i leucòcits al diagnòstic per sota de $50 \times 10^9/L$. Aquest tipus de classificacions que tenen en compte les dues variables resulten útils per a la comparació dels resultats entre els diferents protocols de tractament (158).

- **Immunofenotip de la cèl·lula leucèmica:**

L'immunofenotip de la cèl·lula defineix el llinatge i el grau de maduresa dels blasts leucèmics. En general, un fenotip immadur s'associaria a un pronòstic més desfavorable, per exemple, seria el cas de les LLA-ETP. El llinatge, com s'ha esmentat, impacta en el pronòstic dels pacients pediàtrics amb leucèmia, de manera que els pacients amb LLA-B presenten millor pronòstic en general que els pacients amb LLA-T o LMA.

- **Citogenètica i genètica:**

Les alteracions cromosòmiques són, en general, esdeveniments primaris iniciadors del procés de leucemogènesi. Normalment, els reordenaments cromosòmics es mantenen en totes les cèl·lules leucèmiques i perduren en la recaiguda (44,66,159). La freqüència de les alteracions citogenètiques varia significativament segons l'edat (60). Així, s'ha observat que les alteracions genètiques de mal pronòstic apareixen amb més freqüència de forma significativa en grups de major edat. També s'ha vist que els pacients amb reordenament del gen *KMT2A* són més freqüents en lactants, els quals presenten una pitjor supervivència. D'altra banda, els cariotips associats a bon pronòstic són més freqüents en pacients d'edat entre 1 i 9 anys. No es coneixen els motius d'aquesta distribució desigual, tot i així, juguen un paper decisiu en la diferència de pronòstic entre els pacients de diferents edats.

Les noves alteracions genètiques que s'han anat descobrint darrerament són incorporades de forma progressiva als protocols terapèutics. De forma resumida, els factors genètics que determinen l'estratificació en diferents grups de risc pronòstic i

s'estan aplicant en els protocols terapèutics vigents dels grups cooperatius de leucèmia pediàtrica són:

Per la LLA:

- a) Alteracions associades amb un baix risc de recidiva: *ETV6::RUNX1*, alta hiperdiploidia (51-67 cromosomes amb perfil de trisomies típic).
- b) Alteracions associades amb major risc de recidiva: reordenaments de *KMT2A*, *BCR::ABL1*, LLA *Ph-like* (fusions de classe ABL o de classe JAK segons el protocols), *TCF3::HLF*, *iAMP21*, hipodiploidia, CNAs (*IKZF1*^{plus} o perfil d'alt risc de CNA segons classificació UKALL).

Per la LMA:

- a) Alteracions genètiques de baix risc de recidiva: *PML::RARA*, leucèmies CBF, mutacions de *NPM1*, *CEBPA*.
- b) Alteracions associades amb elevat risc de recidiva: reordenaments de *KMT2A* (amb excepció de *KMT2A::MLLT3*), *FLT3*-ITD, *CBFA2T3::GLIS2*, *BCR::ABL1*, monosomia del cromosoma 5 i 7.
 - **Infiltració del sistema nerviós central (SNC):**

La presència de blasts leucèmics al LCR s'associa a un mal pronòstic en totes les edats. Actualment la quimioteràpia intratecal ha reduït l'impacte negatiu de la infiltració del SNC.

- **Leukemic stem cell score (LSC):**

L'elevada taxa de recaigudes en la LMA s'ha atribuït en alguns casos a la persistència de LSC, les quals presenten propietats de cèl·lules mare, inclosa la quiescència, que estan relacionades amb la resistència a la teràpia. Recentment s'han descrit dos *scores*, el *17-gene Leukemic Stem Cell (17LSC) score* i *6-gene pediatric Leukemic Stem Cell (pLSC6) score* en adults i nens respectivament, capaços de predir el pronòstic i la resistència a la teràpia dels pacients amb LMA (160,161). Ambdós *scores* mesuren l'expressió de 17 i 6 gens, respectivament, i els pacients amb *score* elevat presenten de manera significativa pitjor pronòstic. En base a aquestes troballes, actualment ja hi ha autors que proposen un model de classificació per a pacients pediàtric amb LMA integrant la genètica, la identitat

transcripcional (*transcriptional identity*) o perfil d'expressió i la *leukemia stemness* mesurada a partir del pLSC6 *score* (162).

2.8.2 Factors pronòstics que depenen del tractament

- **Resposta al tractament:**

Un dels factors pronòstics més importants en la leucèmia pediàtrica és l'avaluació de la resposta al tractament. Per tal de mesurar aquesta resposta es poden utilitzar diferents metodologies, cada una d'elles amb diferent sensibilitat i especificitat. En la LLA, de manera precoç es pot avaluar la resposta mitjançant el recompte del número absolut de blasts en l'estudi morfològic en sang perifèrica després d'una setmana de tractament amb corticoides al dia +8, o bé als 15 dies del tractament quimioteràpic en moll d'os (163,164).

Més enllà de l'avaluació morfològica, l'avaluació de la resposta al tractament i el seguiment de l'evolució de la malaltia es pot realitzar determinant els nivells de la MRM, que es defineix com el número de cèl·lules leucèmiques que persisteixen després del tractament. Actualment es considera el factor pronòstic evolutiu més important, ja que permet avaluar la sensibilitat de les cèl·lules leucèmiques al tractament. A banda del seu valor pronòstic, la MRM ha permès dirigir la intensitat del tractament i augmentar la taxa de curació dels pacients (165–167). En els darrers anys, la majoria dels protocols ja han incorporat la informació de la MRM per a l'estratificació dels pacients.

Per mesurar la MRM es disposa de la citometria de flux i de tècniques moleculars, tant per la LLA com la LMA (165,168). La citometria de flux analitza el perfil proteic dels blasts i permet seguir la MRM en funció dels perfils aberrants en cada cas i les diferències fenotípiques respecte les cèl·lules normals. El nivell de sensibilitat de la tècnica és elevat, però en algunes ocasions les aberracions fenotípiques són mínimes, parcials o poden canviar durant el tractament, el que dificulta el seu seguiment, sobretot en la LMA (169). En quant a les tècniques moleculars, l'anàlisi dels transcrits dels gens de fusió per RT-PCR quantitativa (RT-qPCR), permet detectar i quantificar la majoria de gens de fusió produïts com a conseqüència de les translocacions típiques. Aquesta metodologia té elevada sensibilitat però és un mètode basat en RNA, de manera que el número de transcrits no reflexa de forma exacta el número de blasts residuals. D'altra banda, el seguiment de les

seqüències específiques d'immunoreceptors de cada pacient (IG/TR PCR) està molt estandarditzat i és la tècnica *gold standard* en la majoria de protocols internacionals per mesurar la MRM en la LLA, però és una tècnica complexa i demandant que requereix temps i expertesa i únicament serveix per les leucèmies de llinatge limfoide (50,165,170). Les noves tècniques de seqüenciació massiva juguen un paper important en la implementació de millores en les anteriors metodologies. La seqüenciació massiva aporta major especificitat i menor taxa de falsos positius i permet l'observació de tota la diversitat clonal en l'estudi IG/TR al seguiment de la MRM. D'altra banda, pel que fa als reordenaments cromosòmics, aquesta metodologia facilita l'estudi del punt de trencament a nivell de DNA genòmic, el que permet identificar la seqüència específica de cada pacient i dissenyar la quantificació posterior de la MRM de forma més específica i precisa en els pacients amb gens de fusió emprant DNA. Tot i així, cal destacar que la seqüenciació massiva és una tècnica complexa i cara (171).

- **Farmacogenòmica**

La resposta del tractament ve determinada principalment per dos factors, la farmacocinètica dels fàrmacs citostàtics, és a dir, com s'absorbeixen, distribueixen, metabolitzen i excreten i per la farmacodinàmica, que és l'efecte farmacològic en funció de la farmacocinètica. D'altra banda, la farmacogenètica és el conjunt de factors constitutius de l'individu que expliquen les variacions en la farmacocinètica i la farmacodinàmica durant el tractament del pacients. Per aquest motiu, tant la farmacocinètica com la farmacodinàmica presenten una gran variabilitat interpersonal. Dins de la farmacogenètica, trobem els polimorfismes o mutacions d'enzims que participen en el metabolisme dels fàrmacs (172).

2.9 Supervivència

2.9.1 Supervivència en la LLA

La SG i la SLE de la LLA en nens és del 85-90% i, com s'ha esmentat, ha anat augmentant en els últims anys amb la millor aplicació dels protocols terapèutics i millor estratificació en grups de risc en el context de grans grups cooperatius (Figura 14) (173).

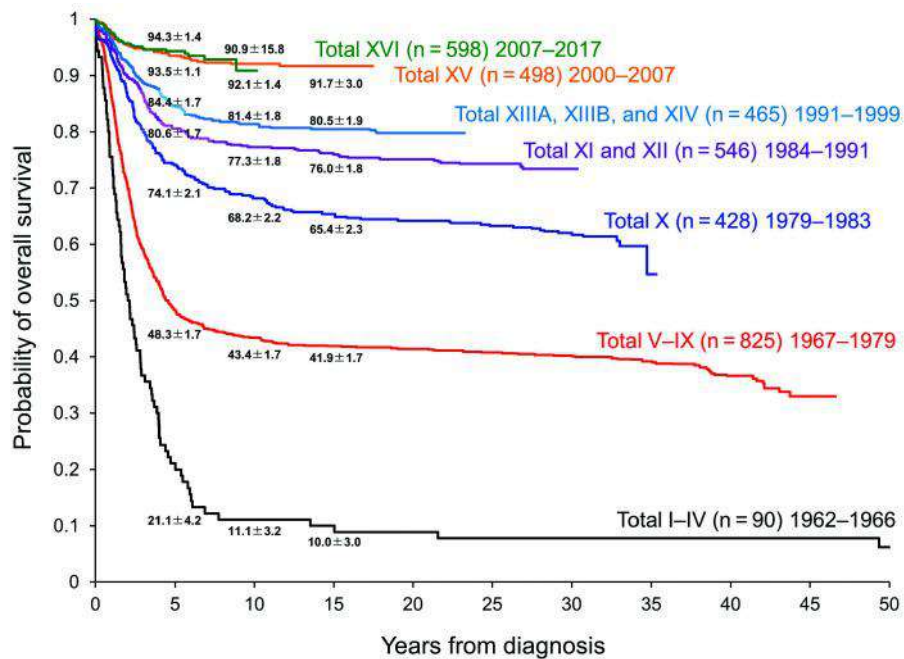


Figura 14: Millora en la supervivència global dels pacients pediàtrics tractats històricament amb diferents protocols consecutius a l'hospital St. Jude. Imatge adaptada de (56).

Nogensmenys, hi ha subgrups de pacients pediàtrics amb LLA amb pronòstic més desfavorable com les LLA-T, les leucèmies amb reordenament de *KMT2A*, les hipodiploides, les LLA *Ph-like* o els lactants, entre altres.

2.9.2 Supervivència en la LMA

La supervivència en la LMA també ha millorat en els darrers anys; tot i així, a dia d'avui encara es troba lluny dels resultats aconseguits per la LLA. Com en el cas de la LLA, la millora en la supervivència ve determinada per una millora en l'estratificació dels pacients en grups de risc, l'increment de la intensitat en el tractament quimioteràpic i una millora en la selecció de donants per a la realització de l'al·lo-TPH i l'ús de nous tractaments. No

obstant, la recaiguda (30-40% dels pacients) segueix sent la principal causa de mort d'aquests pacients (174,175).

2.10 Tractament

A Espanya, actualment els pacients amb LLA pediàtrica es tracten segons la *Guía de recomendación terapéutica* SEHOP-PETHEMA 2013 (Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica, SEHOP, i Programa Español de Tratamientos en Hematología, PETHEMA) que es basa en l'esquema utilitzat pel grup cooperatiu I-BFM SG (*International Berlin-Frankfurt-Münster Study Group*). D'altra banda, els pacients pediàtrics amb LMA reben el protocol NOPHO-DBH-AML-2012 del grup NOPHO (*Nordic Society of Paediatric Haematology and Oncology*). Aquests protocols apliquen, tant en LLA com en LMA, un tractament adaptat al risc de cada pacient, basant-se en els factors pronòstics anteriorment esmentats.

En els propers mesos Espanya formarà part del protocol internacional *ALLTogether* per als pacients amb LLA i del protocol CHIP-AML22 per als pacients amb LMA.

2.10.1 Tractament de la LLA

El tractament de la LLA pediàtrica segueix un esquema general que inclou diferents fases. Abans de començar l'esquema de tractament específic segons el grup de risc, pot haver-hi una pre-fase de tractament amb glucocorticoides com la prednisona. Durant aquesta fase es pot avaluar el grau de resposta, ja que és un reflex de la quimiosensibilitat de la leucèmia i constitueix un factor predictiu de resposta al tractament (163). Les fases que inclou l'esquema general de tractament són inducció, consolidació o intensificació i manteniment.

- **Inducció:**

L'objectiu d'aquesta fase és arribar la RC en un període de 4-5 setmanes. S'eliminen les cèl·lules leucèmiques i es produeix una restauració de l'hematopoesi normal. S'avalua el moll de l'os i la RC post-inducció es confirma per la presència de <5% de blasts a medul·la òssia, que actualment s'assoleix en un 97-99% dels casos. Els pacients que no assoleixen una RC o tenen una MRM alta (>1%) són candidats a tractaments més intensius com l'al·lo-TPH (176). Els fàrmacs que inclou aquesta fase

són glucocorticoides (prednisona, prednisolona o dexametasona), vincristina, asparaginasa i un antraciclínic (normalment daunorubicina). En alguns casos, per pacients d'alt risc s'afegeix ciclofosfamida, metotrexat, arabinòsid de citosina (Ara-C) o etopòsid. Aquesta fase també inclou profilaxi al SNC, intercalant dosis de metotrexat, sol o combinat amb Ara-C i prednisona. Aquesta fase presenta una mortalitat baixa (1% aproximadament).

- **Consolidació o intensificació:**

En aquesta fase l'objectiu és consolidar, eliminant la malaltia residual, o bé intensificar en aquells pacients que no han assolit la RC durant la fase anterior. La intensitat i durada del tractament estan ajustades en funció del risc de recaiguda del pacient segons el protocol assistencial. Els fàrmacs que s'administren són metotrexat, mercaptopurina, Ara-C i asparaginasa.

- **Reinducció:**

Aquesta fase inclou, entre d'altres, l'ús de vincristina, doxorubicina, asparaginasa i la disminució progressiva de dexametasona.

- **Manteniment:**

Aquesta fase s'inicia un cop el pacient ha recuperat l'hematopoesi i presenta un bon estat general. L'objectiu es assegurar la persistència de la RC. Durant el manteniment s'administren dosis orals diàries de 6-mercaptopurina amb dosis setmanals de metotrexat. És el tractament que té una durada més llarga, 2 anys després del diagnòstic fins a completar-lo, i en cas de que hagin hagut interrupcions del tractament, cal recuperar el mateix número de setmanes que s'ha interromput.

2.10.1 Tractament de la LMA

El tractament de la LMA, en la majoria de protocols també té varies fases i inclou un o dos cicles d'inducció seguits de dos a tres cicles de consolidació o post-remissió. A diferència de la LLA, la majoria de grups no realitzen el tractament de manteniment, exceptuant el subgrup de LPA (177).

- **Inducció:** l'esquema general és "3+7". Aquest esquema inclou daunorubicina durant 3 dies i citarabina durant 7 dies. Amb aquest esquema s'ha demostrat un augment en la taxa de remissió, assolit actualment pel 90% dels pacients.
- **Post-remissió:** generalment en aquesta fase s'administren altes dosis de citarabina, ja que els estudis de diferents grups cooperatius com el *Children's Oncology Group* (COG) i l'I-BFM SG han demostrat els seus beneficis (178,179).

2.10.3 Pacients amb abordatge diferencial

Els pacients en recaiguda segueixen un protocol diferent. Per al seu tractament es considera el temps fins a la recaiguda, la localització, l'immunofenotip i la presència o no de determinades alteracions genètiques establertes prèviament com a factors pronòstics. La majoria de pacients amb LLA poden arribar a assolir una segona RC, però generalment, els règims quimioteràpics convencionals no solen ser suficients per mantenir la RC. En aquests casos, l'al·lo-TPH pot representar un tractament efectiu per al rescat d'aquests pacients.

D'altra banda, hi ha alguns subgrups de pacients que necessiten aproximacions terapèutiques diferencials, com els lactants, els pacients amb Síndrome de Down, els pacients amb LLA Ph+ o els pacients amb reordenaments de *KMT2A*.

2.10.4 Efectes secundaris, seqüeles i segones neoplàsies

L'abordatge i prevenció dels efectes secundaris i la millora de la qualitat de vida dels pacients que superen la malaltia són aspectes que estan guanyant importància en els darrers anys. Els efectes secundaris poden aparèixer tant a curt com a llarg termini, fins i tot anys després d'acabar el tractament (180,181).

Els efectes secundaris més comuns són:

- Cardiotoxicitat donada per l'ús d'antraciclínics durant el tractament. Pot augmentar el risc de mortalitat.
- Neurotoxicitat: és la principal conseqüència de la profilaxis al SNC. El tractament intratecal pot comportar l'aparició de dèficits neurocognitius, alteracions en la mobilitat, la parla o l'atenció. A llarg termini també pot provocar dolors neurològics focals, disminució de la sensibilitat i alteracions en l'oïda o la vista.

- Desregulació endocrina: l'alteració hormonal més freqüent és la de l'hormona del creixement com a conseqüència de l'afectació de l'hipotàlem i la glàndula pituïtària. S'observa sobretot en pacients que han rebut irradiació cranial.
- Obesitat, produïda tant per l'ús prolongat de corticoides com per la irradiació per la hipòfisi.
- Reproductius i desenvolupament sexual: en aquest aspecte hi influeixen tant la quimioteràpia com la irradiació sobre les gònades, el que pot donar lloc a problemes del desenvolupament durant la pubertat o problemes d'infertilitat.
- Aspectes psico-socials i emocionals: inclou aquells aspectes que poden comprometre la interacció del nen amb l'entorn, dificultats cognitives en processos d'aprenentatge i memòria, angoixa, depressió, etc.
- Segones neoplàsies: la irradiació, especialment cranial, s'ha associat amb un augment de l'aparició de segones neoplàsies.

2.10.5 Altres teràpies i nous tractaments

Prèviament s'ha esmentat el concepte de l'heterogeneïtat, evolució clonal i la seva relació amb la resistència al tractament i l'aparició de recaigudes. Com més heterogeneïtat clonal al diagnòstic, més probabilitat de presentar clons resistents al tractament (182). En aquest sentit, el disseny de noves teràpies i estratègies terapèutiques és important per evitar la progressió de la malaltia.

- **Transplantament de progenitors hematopoètics (TPH)**

El TPH consisteix en la substitució dels progenitors del moll de l'os per uns progenitors sans. El transplantament pot ser al·logènic (d'un donant) o bé autòleg (del propi pacient), i poden obtenir-se de progenitors de medul·la òssia, cordó umbilical o sang perifèrica.

Les indicacions del TPH està en constant revisió, ja que es tracta d'un tractament agressiu amb elevada mortalitat associada (*Treatment Related Mortality*, TRM), greus complicacions a llarg termini (malaltia d'empelt contra l'hoste (*Enfermedad del Injerto Contra el Huésped*, EICH), infertilitat, alteracions en el creixement, etc.) i reduïdes taxes de rescat en recaigudes post-TPH. En el cas dels pacients amb LMA en primera RC, les indicacions són controvertides; en general, els grups nord-americans les recomanen més

sovint que els europeus (183). No obstant, les millores en el TPH estan disminuint els inconvenients i la majoria de pacients en segona RC són candidats a TPH (184,185).

- **Immunoteràpia**

La immunoteràpia utilitza anticossos, bé produïts pel propi organisme o al laboratori, per atacar les cèl·lules cancerígenes. El seu ús ha proporcionat resultats importants en la LLA. Consisteix en el disseny d'anticossos monoclonals dirigits contra antígens propis de la diferenciació limfoide (sobretot de línia B) conjugats amb immunotoxines o quimioteràpics. Alguns exemples són el rituximab (anti-CD20) i l'ilotuzumab (anti-CD22). També trobem els anticossos biespecífics, formats per dues molècules d'immunoglobulines que permeten el reconeixement de dos antígens diferents: un de la cèl·lula leucèmica i l'altre dels limfòcits T. D'aquesta manera s'aconsegueix la unió i el reconeixement directe de la cèl·lula citotòxica, el limfòcit T, amb la cèl·lula leucèmica. Un exemple seria el blinatumomab, que reconeix el CD3 dels limfòcits T i l'antigen CD19 dels blasts de línia B (186). Pel que fa als pacients amb LMA, tot i que inicialment en els estudis en adults s'observaven toxicitats elevades, l'ús de gemtuzumab ozogamicina (anti-CD33), ha demostrat que a dosis més baixes augmenta la SLE i la SG amb menor mortalitat relacionada al tractament. Posteriorment es va incloure en assajos clínics pediàtrics, tant pel tractament de les recaigudes com durant el tractament de inducció, augmentant la supervivència i disminuint el risc de recaiguda (141,187).

- **Chimeric Antigen Receptor (CARs)**

El principi de la immunoteràpia amb receptors quimèrics (*Chimeric Antigen Receptor, CAR*) radica en l'enginyeria genètica que es duu a terme *in vitro*. Són constructes sintètics formats per un domini extracel·lular dirigit contra un antigen determinat, una regió bisagra, un domini transmembrana i un domini de senyalització intracel·lular. En el cas de la leucèmia, es modifiquen *in vitro* les cèl·lules T del pacient i s'indueix l'expressió d'un CART (CAR T-cell) dirigit contra les cèl·lules tumorals, en aquest cas CD19, que es troba expressat de forma exclusiva en les cèl·lules de llinatge B. Així, s'extreuen els limfòcits T del pacient i es cultiven *in vitro* per tal d'integrar en el genoma mitjançant lentivirus o retrovirus la seqüència genètica i que codifica per al receptor CAR (188,189). El disseny de CARTs ha evolucionat molt en els darrers anys, augmentant la seva eficàcia millorant

el constructe i les molècules coestimuladores. L'assaig clínic pediàtric ELIANA amb Tisagenlecleucel (*ClinicalTrials.gov number NCT02435849*), va demostrar que amb una única infusió de CART s'aconseguia la RC i perllongada en un elevat percentatge de pacients amb LLA-B refractaris o recaiguts amb efectes secundaris greus però transitoris, com la síndrome d'alliberació de citoquines, la neurotoxicitat i la hipogammaglobulinèmia (190). Actualment ja existeixen assajos clínics en primera línia, com l'assaig en fase II de tisagenlecleucel en pacients pediàtrics i adults joves diagnosticats de LLA-B d'alt risc amb MRM positiva al final del tractament de consolidació (*ClinicalTrials.gov number NCT03876769*).

- **Inhibidors moleculars**

La tendència actual és intentar aplicar un tractament el més personalitzat possible. L'inici de la medicina personalitzada apareix amb la incorporació en el tractament de primera línia d'inhibidors de rutes metabòliques essencials per a les cèl·lules neoplàsiques. L'avantatge d'aquests tractaments és que són més específics, ja que van dirigits contra una diana concreta. Els TKI han revolucionat el tractament de les LLA Ph+, i l'ús d'imatinib ha permet millorar de manera significativa la supervivència d'aquests pacients (80,81). Actualment, s'estan desenvolupant altres tractaments dirigits contra altres molècules rellevants en la leucèmia com FLT3 (quizartinib, midostaurin, sorafenib, etc.), PI3K, RAS, etc. D'altra banda, també està augmentant el nombre d'assajos clínics que inclouen inhibidors de serina/treonina quinases per inhibir vies com JAK/STAT (Ruxolitinib, etc.) o mTOR (Rapamicina, etc.). Els inhibidors del proteasoma com Bortezomib activen el factor NF- κ B, el qual és clau per a la supervivència de les cèl·lules malignes degut a les seves funcions anti-apoptòtiques. Finalment, els nous tractaments es dirigeixen contra dianes epigenètiques. Les modificacions epigenètiques juguen un paper important en l'expressió dels gens, de manera que poden donar lloc al silenciament transcripcional de gens supressors de tumors o l'efecte contrari en oncogens, conduint a la transformació maligna de les cèl·lules. Aquestes modificacions poden tractar-se amb inhibidors de DNA metiltransferases (DNMT), inhibidors d'histona deacetilases (HDAC) o inhibidors de microRNAs (miRNAs), així com inhibidors específics de molècules amb funcions epigenètiques com DOT1L (186).

Així, un dels objectius del tractament de la leucèmia aguda és proporcionar una teràpia dirigida i personalitzada contra aberràncies pròpies de la leucèmia que permetin una millora en la supervivència alhora que una reducció de la quimioteràpia convencional, la disminució de la toxicitat associada i finalment de l'aparició d'efectes secundaris.

3 LEUCÈMIA AGUDA PEDIÀTRICA AMB REORDENAMENTS DEL GEN *KMT2A*

Les translocacions que impliquen al gen *KMT2A* (*Lysine methyltransferase 2A*, abans *Mixed Lineage Leukemia, MLL*,) defineixen un subgrup de leucèmies amb característiques clíniques i biològiques específiques. La incidència d'aquestes leucèmies varia amb l'edat, de manera que el 70-80% dels lactants (<1 any) presenten reordenaments de *KMT2A*, tant en LLA com en LMA, mentre que la freqüència en nens més grans cau fins a un 6-10% en les LLA i un 15-25% en les LMA. La presència de reordenament de *KMT2A* és un factor independent de mal pronòstic tant en nens com en adults i empitjora en els lactants, amb taxes de supervivència inferior al 60% (191–193).

3.1 Estructura del gen *KMT2A*

El gen *KMT2A* es troba al braç llarg del cromosoma 11 al locus 11q23.3, és un gen gran de 90kb que conté 36 exons i codifica per una proteïna nuclear d'aproximadament 431kDa amb diferents dominis funcionals i d'unió (Figura 15). La seva estructura va ser descrita per primer cop al 1992 (194,195) i s'ha vist que és un dels *hospots* de recombinació del genoma humà relacionat amb un elevat nombre de malalties. Catalitza la transferència de grups metil de la S-adenosilmetionina als residus de lisina de les cues de les histones, especialment H3 (196). La proteïna està formada per diferents dominis:

- La porció N-terminal conté diversos dominis, cada un d'ells amb diferents funcions. Tots ells es troben conservats a les proteïnes de fusions resultants dels reordenaments de *KMT2A*.
- La porció intermèdia conté 4 PHD *fingers* (que regulen la interacció proteïna-proteïna) i un *bromodomain* (que media la unió a histones amb residus de lisina acetilats).
- La porció C-terminal conté un domini d'activació transcripcional i un domini SET que catalitza la mono-, di-, i trimetilació de la lisina 4 en la histona 3 (H3K4). Aquests últims quatre dominis, (PHD, bromodomain, domini d'activació i domini SET) es solen perdre en la majoria de reordenaments de *KMT2A* (Figura 15B).

Un cop es tradueix, el *KMT2A wild type* queda escindit en dues porcions (el domini N-terminal i el C-terminal). Els dos dominis s'associen entre ells com a components d'un complex multiproteic que regula les modificacions de la cromatina i l'expressió gènica.

Altres proteïnes essencials per aquest complex són RbBP5, Ash2L i WDR5. Aquestes proteïnes són capaces de formar un complex que uneix metiltransferases H3K4 amb dominis SET (Figura 15C). També es recluten altres proteïnes remodeladores de la cromatina com CBP/p300 i hMOF, crucials per l'expressió del gen diana de *KMT2A* (197).

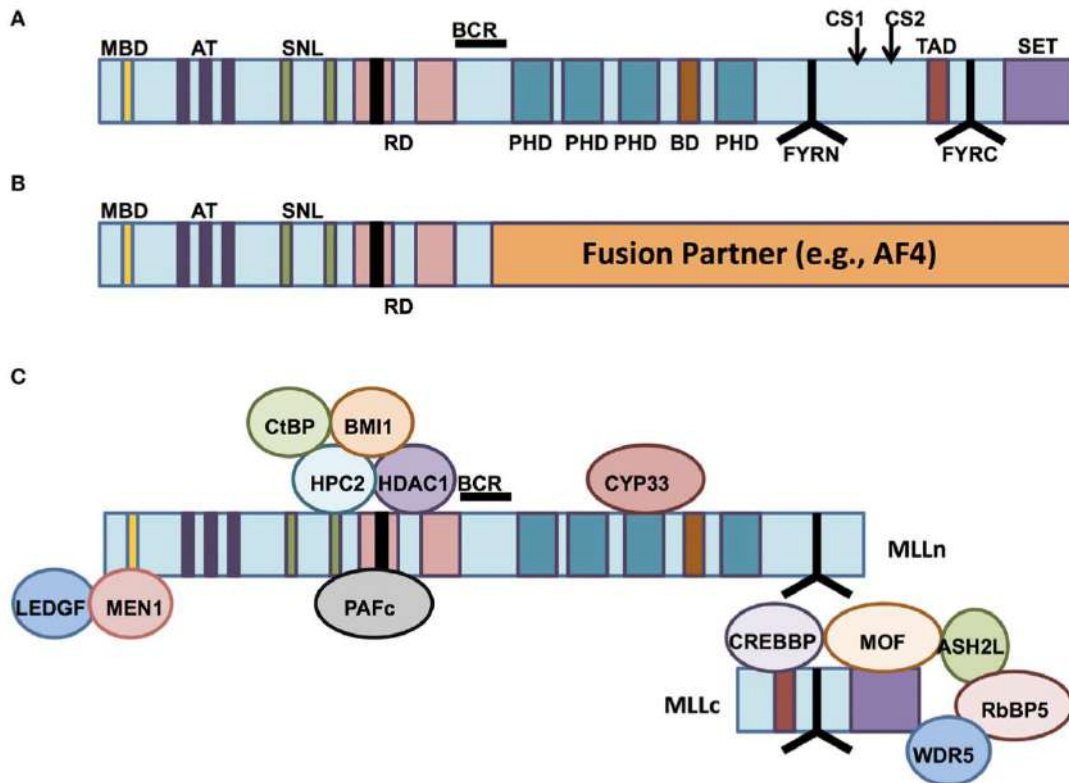


Figura 15: Estructura del gen *KMT2A wild type* i reordenat. A) Estructura de la proteïna *wild type*. S'observen els dominis funcionals: MBD, *menin-binding domain*, AT, *AT hooks*, SNL, *speckled nuclear localization domains*, RD, *repression domains* (els requadres negres representen el domini CXXC), BCR, *breakpoint cluster region*, PHD, *PHD fingers*, BD, *bromodomain*. CS1 i CS2 representen els llocs d'unió de taspa-1 i FYRN i FYRC són els dominis pels que *KMT2A-N* i *KMT2A-C* interactuen. TAD, *transactivation domain*, SET, *H3K4 histone methyltransferase domain*. B) La proteïna de fusió que implica el gen *KMT2A* es forma com a conseqüència del reordenament cromosòmic que té lloc dins del domini N-terminal (BCR) amb més de 90 *partners*. Es perden els dominis PHD, els dominis de transactivació i el domini SET. C) Esquema de les proteïnes que interactuen amb el gen *KMT2A*. Les proteïnes implicades en funcions repressives del gen *KMT2A* es col·loquen per sobre de la proteïna (regulada per CYP33), mentre que les proteïnes implicades en l'activació de la transcripció dependents de *KMT2A* s'agrupen per sota de la proteïna. Figura de (197).

3.2 Funcions fisiològiques de *KMT2A*

El gen *KMT2A* es troba implicat en la regulació epigenètica de gens essencials pel desenvolupament. La funció principal de la proteïna *KMT2A* és la regulació epigenètica i elongació transcripcional a través de la metilació d'H3K4 de les regions promotores del gen diana (198). La proteïna és també responsable del control de la proliferació de les cèl·lules hematopoètiques i de la diferenciació de Meis homeobox 1 (*MEIS1*) i del clúster de gens homeobox A (*HOXA*) (199). En el cas de desregulació d'aquests gens, la inhibició del correcte desenvolupament hematopoètic desencadena l'aparició de leucèmia. Els reordenaments que afecten a *KMT2A* es troben en precursors de LLA-B, LLA-T, LMA, síndromes mielodisplàsiques, leucèmies de llinatge mixte o leucèmies secundàries.

3.3 Reordenaments de *KMT2A*

Actualment, s'han identificat més de 90 *partners* de *KMT2A*, els més freqüents dels quals són *AFF1* (*AF4*) (4q21) (56.5%), *MLLT1* (*ENL*) (19p13) (18.5%) i *MLLT3* (*AF9*) (9p21) (11.8%), *MLLT10* (*AF10*) (10p12.31) (3.7%), *AFDN* (2.1%) (6q21), *EPS15* (1.6%) (1p32.3), *USP2* (0.9%) (11q23.3), *ELL* (0.05%) (19p13.11) que codifiquen per proteïnes que regulen mecanismes epigenètics (200–202). La distribució dels *partners* depèn del llinatge de la leucèmia i l'edat (Figura 16). La fusió *KMT2A::AFF1* està present en aproximadament el 48% dels lactants amb LLA, però es troba en menor freqüència en la població pediàtrica i en pacients amb LMA en els quals, en aquesta edat, predomina la fusió *KMT2A::MLLT3* i la *KMT2A::MLLT10* (28.4% i 27.4% respectivament) (202). Així, pel que fa al llinatge, tot i que tots els grups presenten els reordenaments esmentats, en el cas de les LLA-B, la fusió *KMT2A::AFF1* és la més freqüent en tots els grups d'edat, mentre que en el cas de la LMA és molt més freqüent la fusió *KMT2A::MLLT3*. Els pacients amb LMA, en general, presenten un número més divers de *partners* (202).

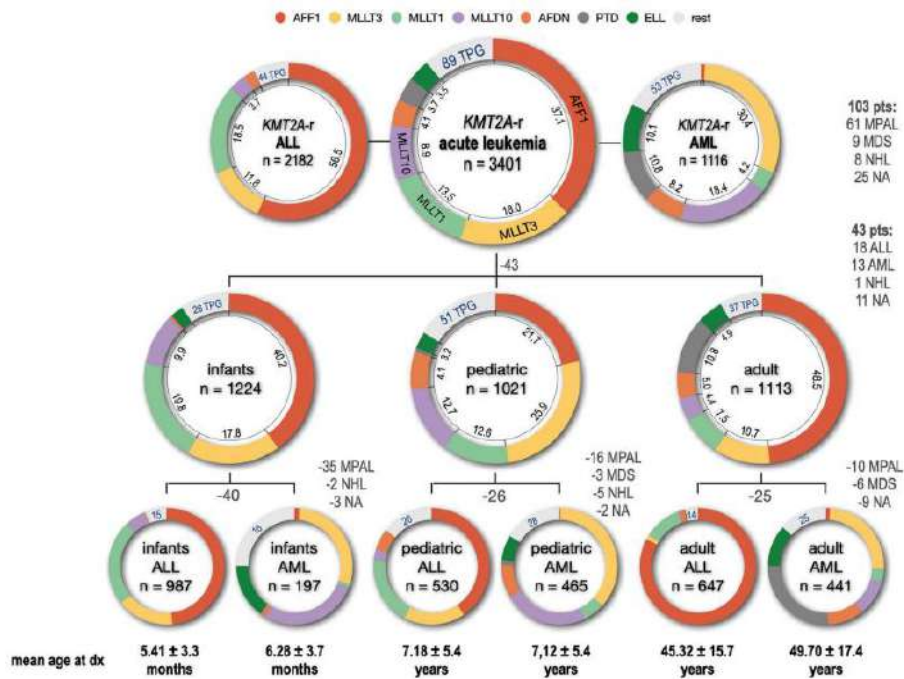


Figura 16: Classificació dels reordenaments del gen *KMT2A* segons el tipus de leucèmia aguda i edat. En la part superior, apareixen els reordenaments més freqüents en la cohort estudiada y separats segons leucèmia mieloides aguda i leucèmia limfoblàstica aguda. Al centre de la figura es pot veure la distribució dels *partners* de fusió segons l'edat: lactants, pediàtrics i adults. A l'última fila la subdivisió segons l'edat i el llinatge de la leucèmia. Els números en negatiu i lletres grises fan referència a aquells pacients en els que falta informació. La freqüència de cada partner es troba indicada a sobre de cada gen de fusió. TPG: *translocation partner gene*. Imatge extreta de (202). *AF4* (*AFF1*), *AF9* (*MLLT3*), *ENL* (*MLLT1*), *ELL* (*ELL1*), *AF10* (*MLLT10*).

En general, totes les fusions presenten un pronòstic advers, únicament la fusió *KMT2A::MLLT3* presenta un pronòstic intermedi. Generalment, les leucèmies amb reordenament de *KMT2A* acostumen a presentar poques alteracions secundàries, suggerint que la desregulació epigenètica seria suficient per desenvolupar la leucèmia (76,198,203). Tot i així, també poden presentar mutacions cooperatives, especialment mutacions en *FLT3* i a la via de PI3K-RAS, afectant a *KRAS* i *NRAS* (reportades entre un 14-70%) tot i que actualment es desconeix l'efecte que podrien tenir aquestes mutacions (76,204–206). Altres estudis també han demostrat que els pacients amb reordenaments de *KMT2A* presenten mutacions a *TP53*. S'ha vist que aquestes alteracions apareixen tant en pacients amb LLA com amb LMA, però es troba present especialment en lactants. Aquests pacients presenten un pitjor pronòstic, sobretot en recaigudes (207,208).

3.4 Presentació clínica i immunofenotip

En general, es lactants presenten una malaltia més agressiva en comparació amb els pacients pediàtrics. Es presenta d'igual manera en el sexe masculí i femení. Els pacients amb reordenaments de *KMT2A* presenten freqüentment hiperleucocitosi $>30 \times 10^9/L$, infiltració al SNC (209,210), hepatoesplenomegàlia i afectació extramedul·lar (211). Les LLA amb reordenaments de *KMT2A* presenten un fenotip immadur amb expressió de CD19 i CD34 i la co-expressió de CD15, CD33, CD56 i CD68, així com en molts casos, l'absència de CD10 (pro-B) (79,203,212,213). La leucèmia *KMT2A* també es caracteritza per l'expressió específica de l'antigen NG2 (*neuron-glia antigen 2*). Es creu que aquest proteoglicà transmembrana podria contribuir a l'agressivitat de la leucèmia, correlacionant-se amb infiltració al SNC, amb una menor SLE i una major freqüència de recaigudes a SNC (214).

3.5 Diagnòstic molecular

La complexitat dels reordenaments de *KMT2A*, amb més de 90 *partners* descrits, fa que el diagnòstic precís sigui extremadament important i a la vegada complex. L'estratègia més utilitzada per al seu diagnòstic es basa en una combinació de tècniques que permeten, en la majoria de casos, detectar no només la presència de *KMT2A-r* sinó també del seu *partner*. Les metodologies més utilitzades són:

- Cariotip: mitjançant un cariotip de bandes G és possible observar les anomalies citogenètiques que afecten a la regió 11q23 que poden ser indicatives de *KMT2A-r*, però no en tots els casos està implicat aquest gen. Per tant, la citogenètica pot ser útil per suggerir *KMT2A-r*, però no és suficient per confirmar el reordenament.
- FISH: degut a que *KMT2A* pot fusionar-se amb múltiples gens, una opció molt utilitzada és l'ús de sondes FISH *break-apart* (215,216).
- RT-PCR: l'ús de la RT-PCR permet la detecció dels reordenaments de *KMT2A* més freqüentment descrits (216,217).

L'aplicació d'aquestes tres tècniques permet la detecció del reordenament de *KMT2A* i els *partners* coneguts més freqüents. Tot i així, els pacients poden presentar cariotips complexos, en alguns casos el patró de FISH pot ser atípic o poden donar-se punts de

trencament diferents dels més freqüents, i això dificulta encara més el diagnòstic. En aquests casos, són necessàries tècniques moleculars més complexes per identificar totes les possibles fusions:

- Long-distance inverse PCR (LDI-PCR): aquesta metodologia es basa en la hidròlisi del DNA utilitzant una combinació d'enzims de restricció. Posteriorment es produeix una lligació dels fragments i finalment una reacció de PCR utilitzant un conjunt de diferents oligonucleòtids. Aquesta estratègia permet identificar *partners* de fusió de *KMT2A* coneguts i desconeguts (218). No obstant, requereix una quantitat de DNA relativament elevada, el flux de treball és laboriós i requereix molt de temps. Només es troba disponible en centres concrets com el *Diagnostic Center of Acute Leukemia* (DCAL; Frankfurt, Germany; <http://web.uni-frankfurt.de/fb14/dcal/>) que duu a terme la LDI i també utilitza la NGS. En la majoria de centres, la LDI s'ha substituït per NGS tant de DNA com de RNA.
- Panells dirigits de NGS de DNA o RNA: els panells d'amplicons o sondes comercials o dissenyats de manera customitzada permeten la detecció de múltiples gens de fusió de *KMT2A* coneguts o desconeguts.
- Seqüenciació de RNA: l'estudi del transcriptoma complet permet la detecció de fusions de *KMT2A* prèviament descrites o no descrites (219). Tot i així, aquesta tecnologia no es troba disponible de manera rutinària en la majoria de laboratoris.

Així, l'abordatge el diagnòstic molecular tant de la fusió com del *partner* de *KMT2A* requereix de diverses tècniques complementàries i complexes. En aquest context, s'ha descrit un perfil d'expressió de determinats gens que es troben característicament sobreexpressats en pacients amb LMA i *KMT2A* reordenat. Karine Lagace *et al.*, mitjançant estudis de RNA-Seq, van descriure una firma molecular definida per l'expressió de 7 gens (*PPP1R27*, *CCL23*, *SCUBE1*, *PHACTR3*, *RET*, *NRG4* i *LOC728606*), sobreexpressats en LMA amb reordenaments de *KMT2A* (especialment en fusions *KMT2A::MLL3*). La detecció d'aquesta firma contribuiria a la detecció d'aquests casos i, potencialment, al seguiment molecular de la MRM. Aquests estudis posen de manifest la importància de la cerca de nous biomarcadors tant per la detecció al diagnòstic com per al seguiment de la MRM en pacients amb reordenaments de *KMT2A* (220).

3.6 Pronòstic i supervivència

Tal i com s'ha esmentat, per determinar el grup de risc de cada pacient és necessari tenir en compte els factors pronòstics propis del pacient, la malaltia i el tractament. La genètica és un factor pronòstic important i, *per se*, tots els pacients amb reordenaments de *KMT2A* presenten un pronòstic pitjor que altres subgrups. La SLE en lactants amb LLA i reordenaments de *KMT2A* és molt pitjor, del 20-40% (221–223). Els pacients entren en remissió, però les taxes de recaiguda són molt elevades (fins a 50-60%) (193). La intensificació de la teràpia pot reduir el risc de recaiguda, però té una morbiditat i mortalitat significatives relacionades amb el tractament, principalment d'etiologia infecciosa (224). En canvi, lactants amb LMA i reordenament de *KMT2A* no presenten pitjor supervivència que els lactants amb LMA sense aquest reordenament.

Pel que fa als *partners* de fusió, en general, en LLA el pronòstic és advers o molt advers independentment del *partner*; en la LMA, pel contrari, el *partner* pot impactar en el pronòstic de forma diferent (193,225,226). La fusió més comú en LMA, la *KMT2A::MLLT3*, confereix un pronòstic intermedi. No obstant això, la MRM és un factor pronòstic independent en els pacients amb *KMT2A* reordenat i s'inclou en l'estratificació de risc (37,227,228).

El fet que existeixin diferents fusions de *KMT2A* amb diferent latència i agressivitat tant en LLA com en LMA, sumat al fet del baix número d'alteracions secundàries en aquestes leucèmies, suggereix que altres factors, probablement epigenètics, contribueixen al pronòstic específic de cada pacient.

3.7 Tractament

Tal i com s'ha comentat en l'apartat 2.10, la tendència actual és realitzar un tractament adaptat al risc de cada pacient basat en els diferents factors pronòstics. Les leucèmies amb reordenaments de *KMT2A* no solen tractar-se amb un protocol unificat, sinó que el tractament s'adapta en gran mesura segons el fenotip (LLA vs. LMA) i l'edat (pediàtrica vs. lactants). Nogensmenys, el seu pronòstic advers i elevat risc de recaiguda requereix sovint d'un abordatge específic amb aproximacions terapèutiques diferencials dins de cada protocol de tractament.

Tot i els avenços en quant a la biologia d'aquesta entitat, aquests no s'han traslladat a una millora en la supervivència. En les últimes dècades s'han desenvolupat diversos fàrmacs amb potencial terapèutic per aquest subtipus de pacients. Entre aquests s'inclouen bloquejadors de les proteïnes *ENL* i *AF9*, de taspasa 1, oligonucleòtids antisentit, inhibidors de DOT1L, BET, SET i de menina (*MEN1*)/LEDGF. Moltes aproximacions han fracassat per l'aparició de resistència a la teràpia. També s'estan estudiant els inhibidors d'histona deacetilases, inhibidors del proteasoma o agents hipometilants (197,198,200,229). Una possible explicació al fracàs terapèutic és que tots aquests inhibidors tenen com a diana algun domini crític per la funció de *KMT2A*, i per tant, no només afecta a la proteïna de fusió oncogènica sinó també al gen normal *wild type*. Per tant, és necessari el desenvolupament d'estratègies terapèutiques més selectives que mantinguin la funcionalitat de *KMT2A* (198). Així, la cerca de noves estratègies terapèutiques per aquests subtipus de pacients d'alt risc és un dels principals objectius per millorar la seva supervivència.

4 MICRO-RNA

4.1 Epigenètica

Els mecanismes epigenètics o reguladors epigenètics són aquells que provoquen modificacions del fenotip sense alterar estructuralment la seqüència de l'ADN. Entre els canvis epigenètics s'inclouen modificacions del DNA (metilació, hidroximetilació), les modificacions d'histones (acetilació, fosforilació i ubiquitinització) i aquelles modificacions produïdes pels RNA no codificants, que inclouen els *long non-coding* RNAs, *enhancers* RNAs i microRNAs (miRNA). Les marques epigenètiques poden considerar-se potencials marcadors del desenvolupament i progressió del càncer (230). En aquest sentit, diversos estudis han demostrat que els pacients pediàtrics amb càncer presenten, en comparació amb la població adulta, un número més baix de mutacions, posant de manifest la importància de l'epigenètica en aquests pacients (Figura 17) (231).

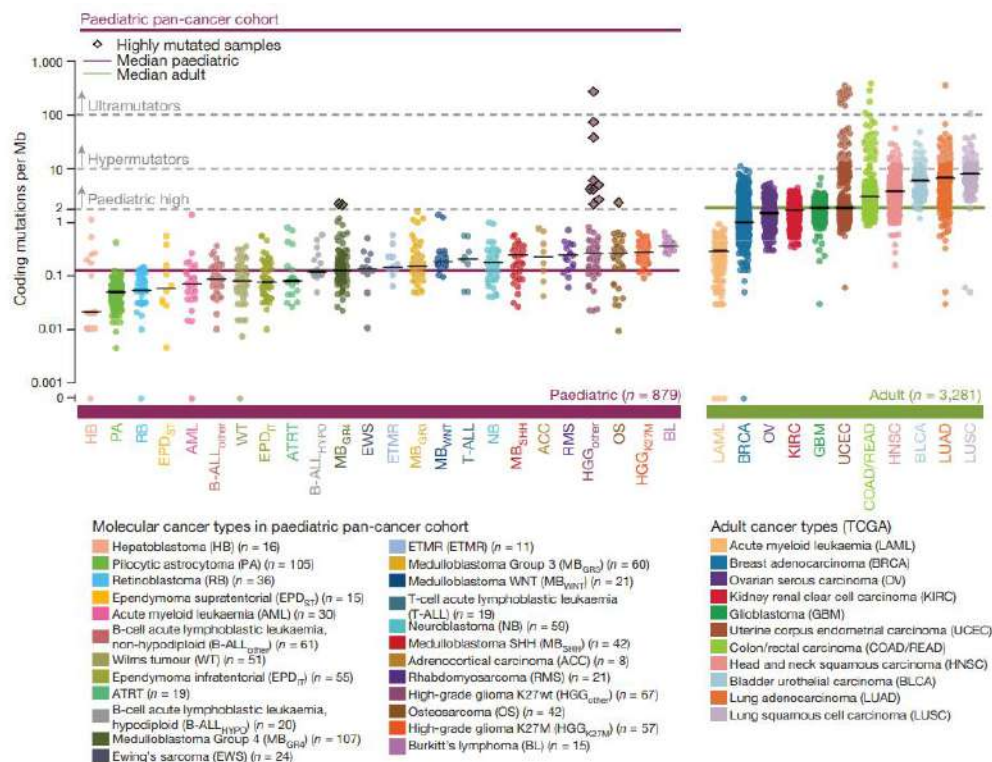


Figura 17: Mutacions somàtiques presents en la cohort de pacients amb neoplàsies pediàtriques estudiada a l'article (231).

4.2 RNAs no codificants

Actualment, s'ha demostrat que la transcripció no està delimitada a regions exclusives del genoma que contenen gens codificadors de proteïnes (232–234). Existeix una gran quantitat de DNA que no codifica per proteïnes, però té funcions rellevants per a la cèl·lula (235–238). Entre aquests elements, es troben regions que es transcriuran a RNA no codificant (RNanc) i, malgrat no codificar per proteïnes, tenen funcions indispensables pel bon funcionament cel·lular. Els RNanc es poden classificar segons la seva mida: RNanc petits, de fins a 200 nucleòtids, i RNanc llargs de >200 nucleòtids (taula 18) (239). Els RNanc controlen l'expressió gènica tant en la fisiologia cel·lular com en el desenvolupament, i també poden tenir un paper important en les malalties neoplàsiques.

Taula 18: Tipus de RNAs no codificants en humans. Taula adaptada de (239).

<i>Nom</i>	<i>Mida</i>	<i>Funció</i>
<i>RNanc petits</i>		
<i>miRNAs</i>	19-24 pb	Regular la transcripció de l'RNA
<i>piRNAs</i>	26-31 pb	Repressió de transposons, regulació de la metilació del DNA, altres
<i>tiRNAs</i>	17-18 pb	Regulació de la transcripció
<i>snoRNAs</i>	60-300 pb	Modificació de l'RNAr
<i>PASRs</i>	22-200 pb	Desconeguda
<i>TSSa-RNAs</i>	20-90 pb	Manteniment de la transcripció
<i>PROMPTs</i>	<200 pb	Activació de la transcripció
<i>RNanc llargs</i>		
<i>lincRNAs</i>	>200 pb	Intervenien en processos de regulació de cromatina i altres
<i>T-UCRs</i>	>200 pb	Regulació de nivells de miRNAs i RNAm
<i>Altres lncRNAs</i>	>200 pb	Inactivació del cromosoma X, regulació de telòmers, <i>imprinting</i> , altres

miRNAs: microRNAs; piRNAs: *piwi interacting RNAs*; tiRNAs: *tiny transcription initiation RNAs*; snoRNAs: *small nuclear RNAs*; PASRs: promoter-associated short RNAs; TSSa-RNAs: *transcription start site antisense RNAs*; PROMPTs: *promotor upstream transcripts*; lincRNAs: *long or large intergenic ncRNAs*; T-UCRs: *transcribed ultraconserved regions*; lncRNAs: *long non coding RNAs*. PB: parells de bases. RNAr: RNA ribosòmic. RNAm: RNA missatger.

4.3 miRNAs: història i característiques

Els miRNAs són RNAs de mida petita, d'uns 21-24 nucleòtids de llargada. Són molècules altament conservades al llarg de l'evolució i juguen un paper important en la regulació gènica post-transcripcional regulada per RNAs en eucariotes. Els miRNAs són components claus de la regulació cel·lular tant en animals com en plantes. Mitjançant la seva unió a un RNA missatger (ARNm) diana, provoquen la seva degradació o a una repressió temporal de la traducció. Així, intervenen en el desenvolupament, manteniment i homeòstasis cel·lular (240).

Victor Ambros, Rosalind Lee i Rhonda Feinbaum van descriure per primer cop l'any 1993 el gen *lin-4* a l'organisme *Caenorhabditis elegans*. Aquest gen no codificava per cap proteïna, sinó per un RNA petit de 22 nucleòtids que provenia d'un altre RNA amb 61 nucleòtids i estructura de *stem loop*, el qual corresponia al seu miRNA precursor (Figura 18A) (241,242). Posteriorment, es va observar que *lin-4* presentava complementarietat *antisense* amb 7 llocs conservats de la regió 3' UTR del gen *lin-14* (Figura 18B). Es va observar que mitjançant aquesta unió complementària es donava una disminució de la proteïna LIN-14, demostrant una regulació de la traducció de *lin-14* sense modificar la quantitat de RNAm (242). La complementarietat entre *lin-4* i la regió 3' UTR de *lin-14* és essencial perquè *lin-4* pugui regular l'expressió de LIN-14, el que demostra un mecanisme de regulació post-transcripcional (243).

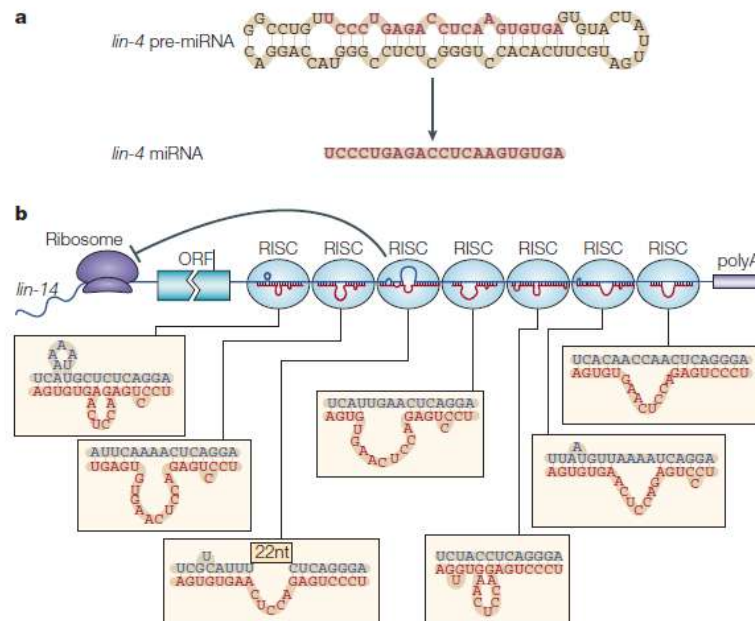


Figura 18: A): Estructura precursora i seqüència madura del microRNA (miRNA) de *lin-4*. B): complementarietat de seqüències entre *lin-4* (vermell) i la regió 3' UTR de l'ARNm (blau) *lin-14*. *Lin-4* presenta complementarietat a 7 posicions a la regió 3' UTR; la seva unió a aquestes regions provoca la repressió de la síntesi de la proteïna LIN-14 (243).

Inicialment es va pensar que aquest mecanisme de regulació post-transcripcional era exclusiu de nematodes. Uns anys més tard, però, es va identificar un altre gen, *let-7*, que codificava per un RNA petit de 21 nucleòtids i que, de forma similar a *lin-4*, realitzava la seva funció unint-se a la regió 3' UTR de *lin-41* i *hbl-1* (*lin-57*) inhibint la seva traducció (244). Aquesta troballa no només va aportar un segon exemple de regulació per petits RNAs, sinó que a més va fer pensar que aquest mecanisme podria trobar-se en altres espècies (243). Es va veure que *let-7* (i també el seu miRNA *let-7*) es trobava conservat al llarg de l'evolució en diferents espècies com mol·luscs, mosques, ratolins i humans (Figura 19) (245,246).



Figura 19: Seqüències genòmiques del gen *let-7*. Estructura en *stem-loop* de *let-7* en *C. elegans*, *D. melanogaster* i *Homo sapiens*. Els 21 nucleòtids de *let-7* es poden veure marcats en gris (245).

Des d'aquest moment, el coneixement dels miRNAs i el número de publicacions fins a dia d'avui ha augmentat molt. S'han descrit més de 38.589 miRNAs segons la base de dades miRBase (versió 22.1, d'abril 2023 <http://www.mirbase.org>), dels quals 1.982 pertanyen a l'*Homo Sapiens* (247). Actualment sabem que l'1-5% del genoma humà conté gens que codifiquen per miRNAs i que un 30% dels gens que codifiquen per proteïnes estan regulats per miRNAs (247). Els miRNAs participen en diferents funcions biològiques com el control del creixement, proliferació, diferenciació i apoptosi cel·lular. Així, és imprescindible una correcta regulació per assegurar la normalitat en les diferents funcions cel·lulars; pel contrari, una desregulació podria contribuir a l'aparició de diverses patologies, com el càncer (246).

4.3.1 Biogènesi

La gran majoria dels miRNAs animals es troben filogenèticament conservats i, en el cas dels mamífers, la majoria de gens de miRNAs presenten isoformes (paràlegs), les quals s'han format per processos de duplicacions (248).

En quant a la seva organització genòmica, els miRNAs es poden diferenciar en dos tipus: miRNAs intergènics i miRNAs intragènics. Els primers es consideren unitats independents de transcripció i tindran els seus propis elements de regulació. Els miRNAs intergènics poden ser monocistrònics, bicistrònics i policistrònics (Figura 20). D'altra banda, els miRNAs intragènics es troben localitzats dins d'un altre gen hoste, el qual pot ser

codificant o no codificant i es transcriuran en el mateix sentit que aquest; així, els miRNAs poden transcriure's en els dos sentits, *sense* i *antisense*. Generalment, es localitzen als introns dels gens hostes, tot i que també els trobem en regions exòniques (Figura 20) (248,249).

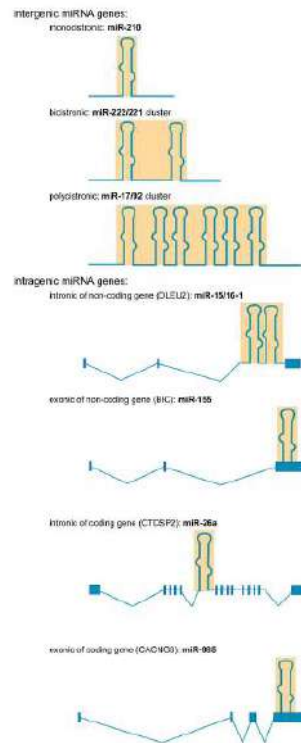


Figura 20: Localització genòmica i estructura gènica dels miRNAs (248).

Aproximadament el 50% dels gens de miRNAs en mamífers es troben en proximitat amb altres miRNAs, formant el que es coneix com a clústers de miRNAs. Aquests grups de miRNAs es troben inicialment codificats com un transcrit policistric, que posteriorment donarà lloc a múltiples miRNAs amb un patró d'expressió similar (249)

La síntesi dels miRNAs s'inicia al nucli de la cèl·lula i la seva maduració es finalitza al citoplasma. La gran majoria dels miRNAs es transcriuen al nucli per la RNA polimerasa II (Pol II) i es forma un transcrit primari o pri-miRNA, amb varies kilobases i estructura de *stem loop*. El primer pas en la maduració del pri-miRNA consisteix en l'escissió d'aquest per la endonucleasa RNAsa III DROSHA associada al cofactor *DiGeorge syndrome critical region 8* (DGCR8) (250). L'enzim i el cofactor formen un complex conegut com *Microprocessor*, el qual escindirà el pri-miRNA per produir un precursor de miRNA, un pre-miRNA de 60-70 nucleòtids (249). Aquest pre-miRNA és exportat del nucli al

citoplasma per un membre de la família de receptors de transport nuclear, l'exportina 5 (XPO5). Un cop al citoplasma, serà processat per DICER, una riboendonucleasa III (RIII), que en humans interacciona amb les proteïnes TRBP i PACT, produint un miRNA de doble cadena i d'aproximadament 22 nucleòtids (dúplex miRNA) (249). Una d'aquestes cadenes serà la cadena guia i formarà el miRNA madur i l'altra serà la cadena passatgera o miRNA*. L'elecció d'una cadena o altra no està clara. Alguns estudis indiquen que aquesta elecció tindria a veure amb l'estabilitat termodinàmica dels extrems del dúplex de miRNA. La cadena amb major estabilitat a l'extrem 5' seria l'escollida per formar el miRNA madur (251). Un cop escollida, la cadena guia es carrega en la proteïna Argonauta (Ago), que junt amb DICER, TRBP i PACT generen el complex efector *ribonucleoproteic ARN induced silencing complex* (RISC) (249). Un cop es produeix la unió del miRNA amb el complex RISC, aquest passa a anomenar-se mRISC (complex RISC unit a miRNA) i aquesta cadena farà de guia al mRISC per unir-se a la regió 3' UTR del miRNA diana (que serà complementari al miRNA) per bloquejar la seva traducció (Figura 21) (248).

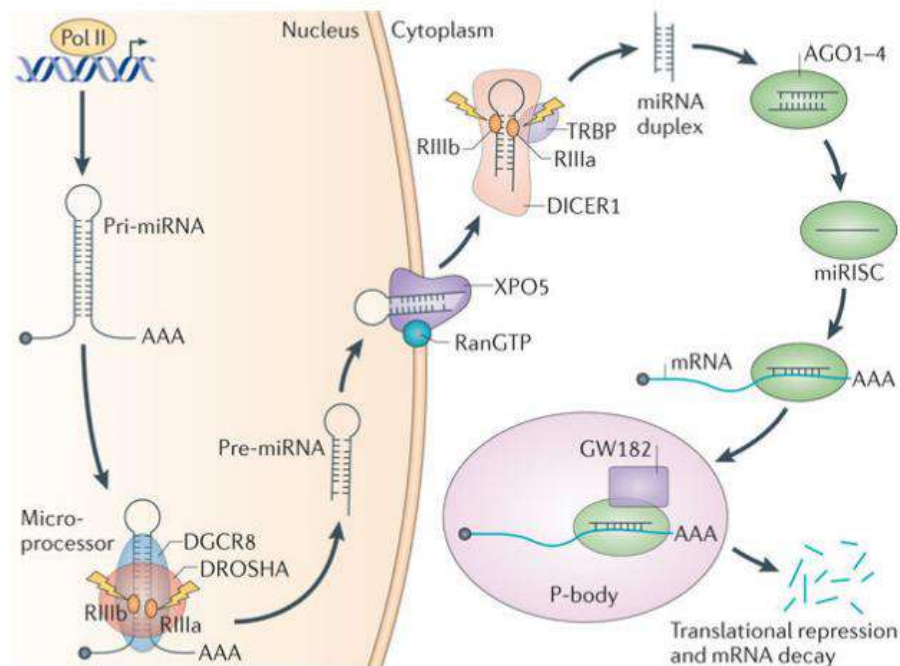


Figura 21: Visió general de la via de biogènesis dels miRNAs (252).

D'altra banda, s'han descrit altres vies no-canòniques de biogènesis de miRNAs (Figura 22). Aquestes vies fan ús de diferents combinacions de proteïnes implicades en la via canònica, principalment de DROSHA, DICER, XPO5 i AGO2. En general, les vies no canòniques de biogènesis es poden agrupar en vies independents de DROSHA/DGCR8 i

vies independents de DICER. Els pre-miRNAs produïts per la via independent de DROSHA/DGCR8 s'assemblen als substrats de DICER, per exemple els miRtrons que provenen dels introns de RNAm. Un altre exemple són els pre-miRNAs marcats amb 7-metilguanosa (m^7G). Aquests RNAs són directament exportats al citoplasma per la exportina i sense necessitat d'escissió de DROSHA. Hi ha un fort biaix de la cadena 3p, probablement perquè el marcatge m^7G impedeix la càrrega de la cadena 5p a Ago. En canvi, els miRNAs independents de DICER com shRNA, es processen per DROSHA a partir de trànscrips endògens. Aquests pre-miRNA requereixen l'acció d'Ago2 per completar la seva maduració dins del citoplasma perquè la seva longitud no permet que siguin substrats de DICER. Independentment de la via escollida, totes acaben en el complex RISC (253–256).

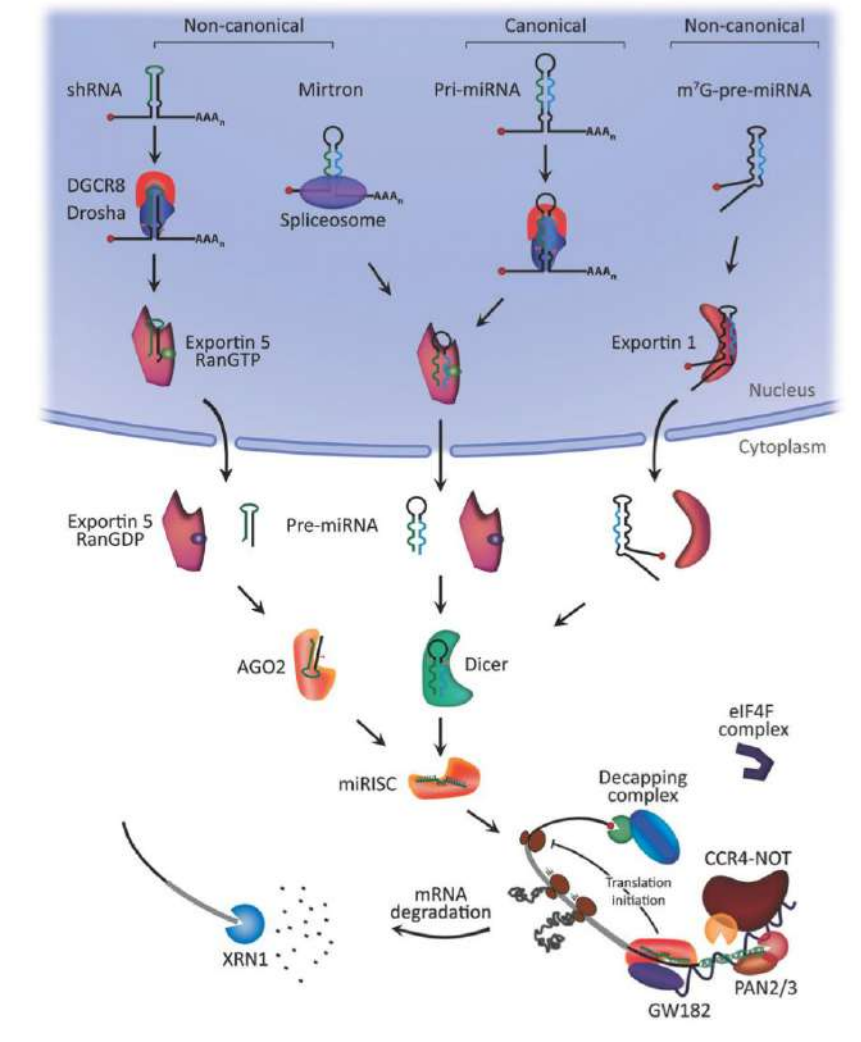


Figura 22: Mecanismes canònics i no-canònics de la biogènesi dels miRNAs (253).

4.3.2 Nomenclatura dels miRNAs

L'any 2003 es van establir les guies per l'anotació dels miRNAs (240). MiRBase recull els miRNAs descrits i les regles bàsiques que determinen la seva nomenclatura. Les tres primeres lletres o prefix fan referència a l'organisme de procedència (per exemple, hsa-miR-196a-1 és un miRNA humà; en canvi, dre-miR-196a-1 és un miRNA descrit en peix zebra). A la majoria de gens de miRNAs, el número té relació amb l'ordre del seu descobriment. Tot i així, quan es descriu un miRNA en una espècie diferent a la humana però que és equivalent en humans, s'anomena amb el mateix número que en l'espècie humana, però amb el prefix diferent. Hi ha excepcions històriques a la norma, com *let-7* o *lin-4*, que conserven els seus noms històrics i s'anomenen igual en diferents espècies. El miRNA madur s'escriu amb R (miR) majúscula, mentre que el gen del que deriva el

miRNA madur s'escriu amb r (mir) minúscula. Si darrera del número principal s'afegeix un guió seguit d'un número significa que diferents seqüències precursoras i locus genòmics expressen seqüències madures idèntiques, per exemple, miR-21-1 i miR-21-2 corresponen a dos miRNAs madurs idèntics que s'han transcrit a partir de gens diferents. També es poden trobar com a sufix lletres darrera del número de miR, com per exemple hsa-miR-181a i hsa-miR-181b. Quan un miR que s'anomena igual té diferent lletra vol dir que ambdues seqüències madures dels miRNAs es troben estretament relacionades que s'expressarien a partir dels seus precursors hsa-mir-181a i hsa-mir-181b, respectivament. Com s'ha esmentat, el miRNA madur que provingui de la cadena guia i per tant s'expressarà s'escriu sense asterisc; en canvi, quan la seqüència madura deriva de l'altre cadena s'escriu amb el número del miRNA seguit d'un asterisc (hsa-miR-181a*). Si bé aquesta seria la norma, la majoria de vegades no es pot identificar quina és la cadena que es transcriurà; per aquest motiu, quan no es pot predir de quina cadena prové el miRNA madur, el miRNAs s'anomenarà segon l'extrem en el qual es trobi codificat: per exemple, hsa-miR-9-5p prové de l'extrem 5' i hsa-miR-9-3p prové de l'extrem 3'.

4.3.3 Mecanismes d'acció

La característica més distintiva dels miRNAs i la funció més estudiada és la d'inhibir l'expressió gènica de les seves dianes mitjançant unions específiques i complementàries a la seva seqüència. L'especificitat de les dianes es produeix per la complementarietat entre les posicions 2-8 de la regió 5'UTR del miRNA (*seed sequence*) amb la regió 3'UTR de l'RNAm diana. La complementarietat entre l'RNAm i el miRNA portarà a dues situacions diferents. Quan la complementarietat és perfecta, el complex RISC induirà la degradació de l'RNAm diana, mentre que quan la complementarietat no és completa es donarà un bloqueig temporal de la traducció de l'RNAm a proteïna. Independentment del mecanisme utilitzat, la finalitat dels dos és inhibir la traducció (Figura 23). La inhibició de la traducció està mediada per proteïnes AGO, que competeixen amb els factors que dirigeixen les subunitats ribosòmiques o que fan accessibles la iniciació de la traducció (246,257,258). Degut a que la complementarietat entre miRNA-RNAm es dona entre molt pocs nucleòtids (2-8 aproximadament), cada miRNA té el potencial d'inhibir un gran número de gens i, a la vegada, un mateix gen pot estar inhibit per diversos miRNAs. Per tant, pot existir una cooperació de diferents miRNAs per regular l'expressió d'un gen.

4.3.4 Regulació dels miRNAs

La majoria dels miRNAs es troben regulats per la senyalització específica de l'estadi de desenvolupament i/o el teixit (249,261). El control dels nivells de miRNAs és indispensable per a mantenir una correcta homeòstasi cel·lular. Alguns dels mecanismes de regulació transcripcional dels nivells d'expressió de miRNAs són:

- Regulació de la transcripció dels gens de miRNAs: processos que poden alterar la seqüència genòmica del miRNAs: mutacions, delecions, amplificacions, translocacions o polimorfismes. Aquests gens també poden patir modificacions epigenètiques causades per la metilació de la regió promotora o modificacions epigenètiques d'histones (262,263).
- Regulació del processament dels miRNAs: l'expressió dels miRNAs també es pot veure modulada per alteracions en qualsevol dels elements que intervenen en el seu processament (264).
- Regulació de la funció de miRNAs: un cop finalitza la biogènesi dels miRNAs aquests també es troben estrictament regulats per diversos mecanismes (265). Un exemple seria la interacció amb les proteïnes AGO: els components de la família AGO tenen diferent potència a l'hora de reprimir la síntesis proteica, de manera que l'abundància relativa de les diferents proteïnes AGO pot afectar a la intensitat de la repressió de determinats miRNAs. Un exemple seria la interacció miR-451 i AGO2, que sembla tenir una funció específica en l'hematopoesi (266,267).
- Regulació de la destrucció dels miRNAs: la destrucció, recanvi o *turnover* dels miRNAs es troba molt menys descrita que la seva biogènesi. La vida mitjana dels miRNAs pot ser d'hores o dies; per tant, es consideren molècules estables amb un lent *turnover*. Tot i així, s'ha vist que alguns miRNAs presenten un ràpid *turnover* i que el recanvi lent no seria un mecanisme universal i pot dependre del moment del cicle cel·lular (268).
- Decoy activity sobre els efectes dels miRNAs: l'activitat dels miRNAs pot veure's també regulada per mecanismes de *decoy activity*. Per exemple, alguns pseudogens poden funcionar com un *decoy* sobre els efectes dels miRNAs en els gens codificadors de proteïnes, com és el cas del pseudogen de *PTEN*, *PTEN1*. Tant

PTEN com *PTEN1* són dianes del miR-19b i miR-20a. Quan es sobreexpressa la regió 3'UTR del pseudogen *PTEN1* els miRNAs s'uneixen al pseudogen i no tant al gen, de manera que el gen *PTEN* deixa d'estar reprimat (269,270).

4.4 miRNAs i hematopoesis

L'hematopoesi es troba regulada per diferents factors de transcripció, però diversos miRNAs també juguen un paper important en la seva regulació. L'any 2004 es va demostrar que els miRNAs participaven en la diferenciació dels diferents llinatges hematopoètics (271). Des d'aquell moment, s'ha demostrat l'important paper dels miRNAs en la regulació de totes les fases de l'hematopoesi. Els miRNAs participen tant en el manteniment com en la diferenciació hematopoètica, en *feedbacks* positius i negatius, i en la regulació de la transcripció, associant-se amb repressors o activadors transcripcionals (272–276). També s'ha observat que molts dels miRNAs que participen tenen funcions redundants i presenten especificat tissular (sobretot miRNAs d'una mateixa família) (277). D'altra banda, mitjançant experiments en models animals s'ha vist que en modificar la biogènesi dels miRNAs, per exemple, modificant alguns dels elements que la regulen, es veia afectada la reconstitució hematopoètica (278). Així, totes aquestes evidències demostren la importància dels miRNAs i la seva regulació en l'hematopoesi.

4.5 miRNAs i càncer

Considerant la implicació dels miRNAs en els processos de regulació cel·lular, no és d'estranyar que juguin un paper important en les malalties i en concret en processos cancerígens. L'any 2002, Croce *et al.* van demostrar que el clúster miR-15a/16-1 es trobava en una regió delecionada en pacients amb leucèmia limfàtica crònica (LLC), definint així aquests miRNAs com a supressors de tumors (279). A partir d'aquest descobriment s'han publicat múltiples estudis que defineixen el paper dels miRNAs en la patogènesi del càncer. Una de les troballes més sorprenents és la gran alteració de l'expressió dels miRNAs en les cèl·lules malignes en comparació amb la seva contrapartida sana. A més, s'ha vist que les alteracions en l'expressió són càncer-dependents, i varien segons la neoplàsia i el teixit afectat, el que converteix els miRNAs en potencials

biomarcadors (248). Els miRNAs poden actuar com a oncogens o oncomiRs (amb guany de funció) o com a miRNAs supressors de tumors o anti-oncomiRs (amb pèrdua de funció). Els oncomiRs generalment tenen com a diana gens supressors de tumors, mentre que la diana dels anti-oncomiRs generalment és un oncogen. Cal remarcar que, degut a que un mateix miRNA pot regular diferents dianes, podrà funcionar com a oncomiR o com a miRNA supressor de tumor depenent del teixit en el que actui (280,281). En quant al seu potencial terapèutic, donat que aquestes molècules controlen els nivells d'expressió d'un potencial elevat nombre de proteïnes, podrien ser dianes de diferents fàrmacs i útils en el desenvolupament de nous règims terapèutics (281). En els darrers anys, s'han anat establint firmes de miRNAs específiques de diferents tipus de càncer incloent la leucèmia pediàtrica; aquestes firmes d'expressió de miRNAs es correlacionarien amb el diagnòstic, progressió, pronòstic i resposta al tractament.

4.6 miRNAs i leucèmia aguda

4.6.1 Rol dels miRNAs com a biomarcadors en el diagnòstic, pronòstic i la classificació de les leucèmies agudes

Els primers perfils de miRNAs que es van descriure relacionats amb la leucèmia aguda mostraven que hi havia una diferència d'expressió de miRNAs entre CD34+ de donants sans i els blasts dels pacients amb leucèmia. Posteriorment, s'ha observat que la classificació basada en les alteracions d'expressió de miRNAs permet la diferenciació de llinatges limfoide i mieloide (LLA vs. LMA), també dins del llinatge limfoide (LLA-B vs. LLA-T) i dels diferents subtipus (Figura 24). També s'ha demostrat una associació entre l'immunofenotip, alteracions genètiques i l'expressió de miRNAs en tots els subtipus de leucèmia aguda (280–283).

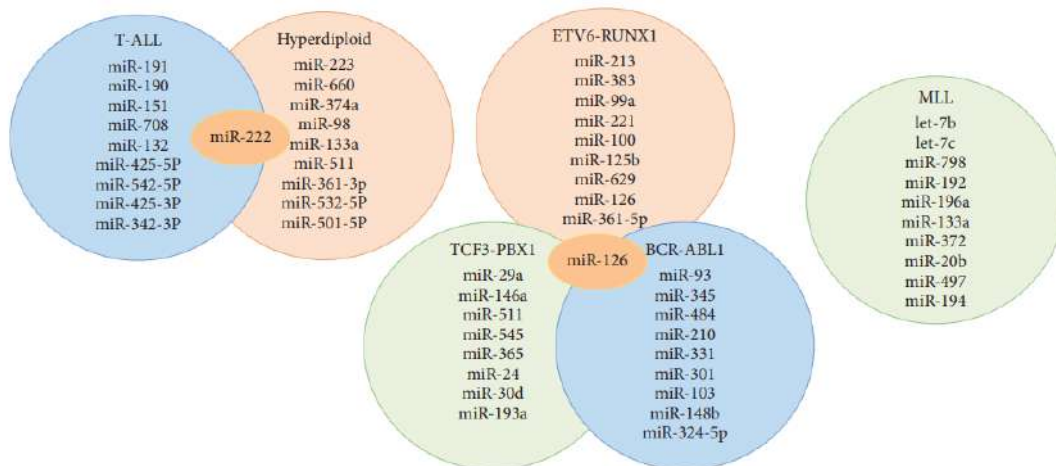


Figura 24: Conjunt dels 10 miRNAs capaços de discriminar entre els subgrups de leucèmia limfoblàstica aguda segons l'estudi de Grobbelaar and Ford, 2019. Els únics miRNAs compartits entre diferents subgrups estan marcats en taronja (282).

Zhang *et al.* van descriure un patró de 21 miRNAs sobreexpressats i 11 infraexpressats en pacients amb LLA, en contraposició a 17 miRNAs sobreexpressats i 18 infraexpressats en pacients amb LMA. També van observar que la sobreexpressió de diferents miRNAs estava significativament relacionada amb el grau de maduresa i diferenciació cel·lular: pacients amb M1 i M2 (*RUNX1::RUNX1T1*) segons la classificació FAB i M3 (*PML::RARA*), presentaven una elevada expressió de miR-335, miR-126 i miR-125b respectivament. En aquest cas, miR-125b i miR-126 es van considerar com a factors favorables en pacients amb M3 i M2, respectivament (284). L'any 2007, Mi *et al.*, basant-se en anàlisis d'expressió de miRNAs de tot el genoma, van demostrar que l'expressió de dos miRNAs pot discriminar amb precisió superior al 95% les LLA de les LMA. En el mateix estudi, van identificar 27 miRNAs expressats diferencialment en pacients amb leucèmia aguda com a marcadors per al diagnòstic i tractament. D'aquests, miR-128a i miR-128b es trobaven sobreexpressats en pacients amb LLA respecte els pacients amb LMA, mentre que els miRNAs let-7b i miR-223 es trobaven infraexpressats en LLA (283). Schotte *et al.* van observar en el seu treball diferents perfils d'expressió de miRNAs per diferents subtipus de LLA pediàtrica. L'expressió elevada de miR-223, miR-222, miR-98 i miR-511 era característica de pacients amb LLA hiperdiploide. D'altra banda, també es va veure que la firma d'alguns miRNAs dels casos positius per *ETV6::RUNX1* i els casos hiperdiploides es superposava parcialment, el que suggeria una biologia subjacent comú. Tot i així, a dia

d'avui, encara es desconeix el perfil d'expressió d'alguns subtipus, com els que integren les LLA-B-other (285). Altres autors, com Nabhan *et al.* o Yang *et al.*, suggereixen que es podria millorar i fer més precís el diagnòstic de la LLA pediàtrica utilitzant un conjunt de miRNAs com a marcadors. Segons els seus estudis, l'ús combinat de miR-181a i Smad7 feia augmentar la sensibilitat del diagnòstic al 90%, mentre que l'ús combinat de miR-181a i TFG-11 feia augmentar la sensibilitat a un 100% (286,287). Així, en els darrers anys, s'ha demostrat que existeix una associació entre l'expressió de diferents miRNAs al diagnòstic i les diferents variants clíniques i biològiques, com el número de leucòcits, l'edat o les alteracions citogenètiques o moleculars (288–294).

D'altra banda, també s'han identificat miRNAs implicats en l'evolució de la malaltia. Un dels biomarcadors més freqüentment associats amb el desenvolupament de la leucèmia aguda és el miR-125b, que és un regulador molecular important en l'homeòstasi cel·lular, metàstasi i progressió de malalties. Així, la sobreexpressió de miR-125b a través de la repressió d'*IRF4* promou la LMA i LLA induint la leucemogènesi i l'auto-renovació dels progenitors cel·lulars (295–297).

Alguns miRNAs també s'han associat amb característiques clíniques al diagnòstic o amb factors pronòstics ben coneguts. Per exemple, els canvis d'expressió en miR-100 i miR-99a no només permeten diferenciar llinatge, sinó que també són diferents en funció del recompte de leucòcits, i la presència dels gens de fusió *BCR::ABL1* i *KMT2A* (298). Kaddar *et al.*, van veure que existia una relació estadísticament significativa entre els baixos nivells de miR-16, de leucòcits i alteracions moleculars de bon pronòstic en els pacients amb LLA-B. En el cas dels pacients amb LLA-T, van observar que la sobreexpressió de miR-16 estava relacionada amb la resistència a corticoesteroides. Tot i així, no van poder assignar un perfil específic d'expressió de miR-16 associat als subgrups de LLA-B i LLA-T (299). Els estudis de Organista-Nava *et al.*, proposen el miR-24 com a biomarcador independent per predir la supervivència tant en LMA com en LLA. La sobreexpressió de miR-24 es va associar significativament amb pitjor pronòstic, menor SG i elevat risc de recaiguda (300). Uns nivells baixos d'expressió de miR-335 s'associen amb un pronòstic desfavorable, una pitjor SLE als 5 anys i resistència als glucocorticoides en la LLA (301).

En definitiva, determinar el subtipus de leucèmia és crucial per al tractament dels pacients i fins i tot dins de cada grup de risc es podria refinar el pronòstic dels pacients.

Els miRNAs podrien actuar com uns bons biomarcadors diagnòstics i pronòstics ajudant a una millor classificació en els diferents grups de risc.

4.6.2 Rol dels miRNAs en el tractament de la leucèmia aguda i la resistència a fàrmacs

Així com la correcta assignació en els diferents grups de risc és molt important per aplicar la teràpia més adequada, també ho és anticipar la resposta al fàrmac administrat. Diferents grups han centrat les seves investigacions en intentar trobar un conjunt de miRNAs implicats tant en el fracàs terapèutic com en el seu ús com a molècules amb potencial terapèutic.

La multi-resistència farmacològica seguida de la recaiguda es considera un dels problemes clínics més importants en els pacients amb leucèmia aguda. Els perfils de miRNAs s'utilitzen cada vegada més en la investigació de fenòmens multifactorials com la resistència a fàrmacs (302). Basant-nos en el perfil genètic, és possible predir la resposta al tractament establint una correlació entre l'expressió de firmes específiques de miRNAs i la sensibilitat/resistència a un determinat agent quimioteràpic. En els darrers anys, s'han dut a terme diferents estudis, els quals posen de manifest l'acció dels miRNAs com a reguladors de la resposta a l'administració de fàrmacs. En aquest sentit, Ghodousi *et al.* van analitzar els transportadors ABCA2 i ABCA3 i els seus potencials reguladors, miR-326 i miR-200c. En primer lloc, van confirmar que els nivells d'ambdós miRNAs eren més baixos en pacients diagnosticats de LLA. Van observar que els pacients recaiguts i amb multi-resistència a fàrmacs presentaven una disminució de miR-326, posant de manifest un impacte advers en la resposta al tractament. L'associació negativa entre l'expressió del miR-326 i la multi-resistència a fàrmacs podria augmentar el risc de quimio-resistència en 4.8 cops. Els perfils d'expressió de miR-326 i el transportador ABCA2 estaven inversament correlacionats, de manera que aquest podria considerar-se un gen diana de miR-326 a través del qual podria exercir el seu impacte en la resistència a fàrmacs (303). Piatopoulou *et al.* van avaluar la importància clínica de miR-125b per al pronòstic de la LLA i la predicció de la resposta dels pacients al protocol de quimioteràpia. En aquest estudi, nivells baixos dels miRNAs estaven relacionats amb un pronòstic desfavorable, però després del tractament amb aquest protocol van observar un increment de l'expressió de miR-125b en alguns pacients. L'elevada expressió de miR-125b el dia +33

estava relacionada amb major risc de recaiguda a curt termini i pitjor supervivència. Aquestes dades suggerien l'ús de miR-125b com a predictor clínic de resistència a la quimioteràpia en el context d'aquest protocol (304). El grup de Gefen *et al.* va observar una sobreexpressió del clúster miR-125b-2 (miR-125b, miR-99a i let-7c) en pacients amb LLA i *ETV6::RUNX1*. Els autors van observar que l'augment dels nivells de miR-125-2 protegia a les cèl·lules leucèmiques de la mort i la sobreexpressió podria estar relacionada amb la resistència a estaurosporina i doxorubicina (305). Pel que fa als nivells d'expressió, s'ha vist que els canvis d'expressió de miRNAs concrets confereixen resistència a diferents fàrmacs. Així, canvis en l'expressió de miR-454 estan relacionats amb la resistència a L-asparaginasa; en canvi, augments d'expressió en miR-125b, miR-99a i miR-100 estan correlacionats amb la resistència a la vincristina i a la daunorubicina (285). En aquest sentit, Zhang *et al.* van identificar 8 miRNAs (miR-18a, miR-532, miR-218, miR-625, miR-193a, miR-638, miR-550 i miR-633), que permetien diferenciar els pacients segons la seva resposta a la prednisona (284). A la taula 19 es mostra un llistat dels miRNAs associats a la resistència d'alguns fàrmacs utilitzats per al tractament de la leucèmia aguda.

Taula 19: MicroRNAs associats a la resistència a fàrmacs d'ús comú en el tractament de la leucèmia aguda.

<i>Fàrmac</i>	<i>miRNA</i>
Prednisolona	<i>miR-99a, miR-125a, miR-128b, miR-210, miR-221, miR-550, miR-595, miR-633, miR-638, miR-652</i>
L-asparaginasa	<i>miR-210, miR-454</i>
Vincristina	<i>miR-9, miR-99a, miR-100, miR-124, miR-125b, miR-126, miR-128b, miR-141, miR-200c, miR-218, miR-625, miR-633, miR-629, miR-1206</i>
Prednisona	<i>miR-15a, miR-18a, miR-16-1, miR-128b, miR-193a, miR-218, miR-223, miR-532, miR-550, miR-625, miR-633, miR-638</i>
Daunorubicina	<i>miR-99a, miR-100, miR-125b, miR-126, miR-199b, miR-203, miR-210, miR-335, miR-383, let-7c</i>
Doxorubicina	<i>miR-125b</i>
Metotrexat	<i>miR-595, miR-1206, miR-6083</i>
Citarabina	<i>miR-562</i>
Dexametasona	<i>miR-210</i>
Imatinib	<i>miR-203</i>
Estaurosporina	<i>miR-125b</i>

D'altra banda, la cerca de noves estratègies terapèutiques més individualitzades i específiques ha senyalat els miRNAs com a dianes prometedores. En aquest sentit, el seu ús es pot basar en dues estratègies: la primera consistiria en inhibir l'activitat del miRNA utilitzant inhibidors de miRNAs, seqüències anàlogues (*miRNA antisense therapy*), o

miRNA esponges o emmascarant el miRNAs (*miRNA masking*). La segona estratègia consistiria en activar la funció del miRNA (*miRNA replacement therapy*) o bé utilitzant modificadors mimètics de miRNA com plàsmids o utilitzant vectors que incloguin la seqüència del miRNA en qüestió (Figura 25) (306). En definitiva, l'objectiu d'aquestes intervencions moleculars és produir la infraexpressió dels oncomiRs o la sobreexpressió dels miRNAs supressors de tumors. Tot i així, aquestes teràpies encara es troben en desenvolupament i la seva seguretat i eficàcia, així com els seus efectes a llarg termini, s'han de definir.

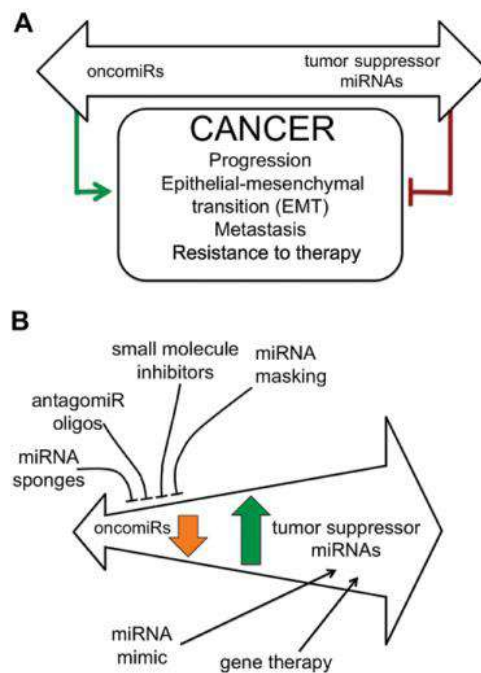


Figura 25: A) Esquema de l'acció dels miRNAs con a oncomiRs promotors de càncer (línia verda) i con a supressors de tumors (línia marró). B) Diferents estratègies proposades per al desenvolupament de noves dianes terapèutiques per modular l'activitat biològica dels miRNAs implicats en càncer amb l'objectiu de regular a la baixa els oncomiRs (fletxa taronja) i augmentar l'expressió dels miRNAs supressors de tumors (fletxa verda). Figura de (306).

HIPÒTESI

HIPÒTESI

Donat que:

- La supervivència dels pacients pediàtrics amb leucèmia aguda ha millorat notablement en les últimes dècades gràcies a les millores en els tractaments i millor estratificació en grups de risc al diagnòstic i durant el seguiment. Nogensmenys, encara hi ha alguns subtipus de pacients de molt alt risc com els pacients amb reordenaments del gen *KMT2A*, per als quals és necessari el desenvolupament de noves teràpies dirigides i personalitzades per tal de millorar la supervivència i disminuir els possibles efectes secundaris de la quimioteràpia.
- Les tècniques actuals per la detecció dels reordenaments de *KMT2A* són útils i permeten detectar la majoria de fusions, però en alguns casos no es pot detectar el *partner* de fusió. La incorporació de noves tecnologies com la NGS o l'avaluació de panells de gens amb expressió diferencial en aquests pacients al diagnòstic podria ser útil per aconseguir una millor i en alguns casos més sensible identificació dels reordenaments de *KMT2A*.
- L'activació de les vies d'immaduresa és un factor de mal pronòstic en pacients amb leucèmia aguda.
- Diferents grups han confirmat una funció important dels miRNAs en la regulació de les cèl·lules mare hematopoètiques. D'altra banda, s'ha descrit un paper dels miRNAs en la leucemogènesi.
- Alguns estudis proposen l'ús de reguladors epigenètics com a possibles dianes terapèutiques.

En aquest context, en el present projecte de tesi **ens plantegem la següent hipòtesi:**

L'estudi de marcadors **genètics i epigenètics** implicats en l'auto-renovació de les cèl·lules mare hematopoètiques i vies d'immaduresa en leucèmies pediàtriques d'alt risc permetrà un **diagnòstic més precís**, la **identificació de nous biomarcadors pronòstics** i **l'anàlisi del seu valor afegit** respecte altres factors pronòstics.

OBJECTIUS

OBJECTIUS

L'**objectiu general** d'aquest treball és estudiar l'expressió de marcadors genètics i miRNAs com a reguladors epigenètics, en pacients pediàtrics amb diferents subtipus de leucèmia aguda, per tal de millorar el diagnòstic i identificar possibles biomarcadors pronòstics i/o dianes terapèutiques.

Els **objectius específics** adreçats en el projecte s'enumeren a continuació i cada un d'ells té associat el seu treball:

1. Analitzar el paper dels miRNAs implicats en la regulació de les cèl·lules progenitores hematopoètiques i vies d'immaduresa (NOTCH, WNT/beta-catenina, HOX i FLT3) en una cohort de pacients pediàtrics diagnosticats de leucèmia aguda, i de forma específica en pacients amb reordenaments del gen *KMT2A*.
Aquest objectiu correspon a l'article publicat.
2. Determinar el perfil d'expressió dels pacients pediàtrics amb leucèmia aguda dels gens *PPP1R-27*, *CCL23*, *SCUBE1*, *PHACTR3* i *NRG4*.

MATERIAL I MÈTODES

MATERIAL I MÈTODES

1 Material i mètodes treball I:

Analitzar el paper dels miRNAs implicats en l'auto-renovació de les cèl·lules progenitores hematopoètiques i vies d'immaduresa (NOTCH, WNT/beta-catenina, HOX i FLT3) en una cohort pediàtrica de pacients diagnosticats de leucèmia aguda, especialment en pacients amb reordenaments del gen KMT2A, en els quals s'han descrit poques mutacions.

El disseny de l'estudi es representa a la Figura 26.

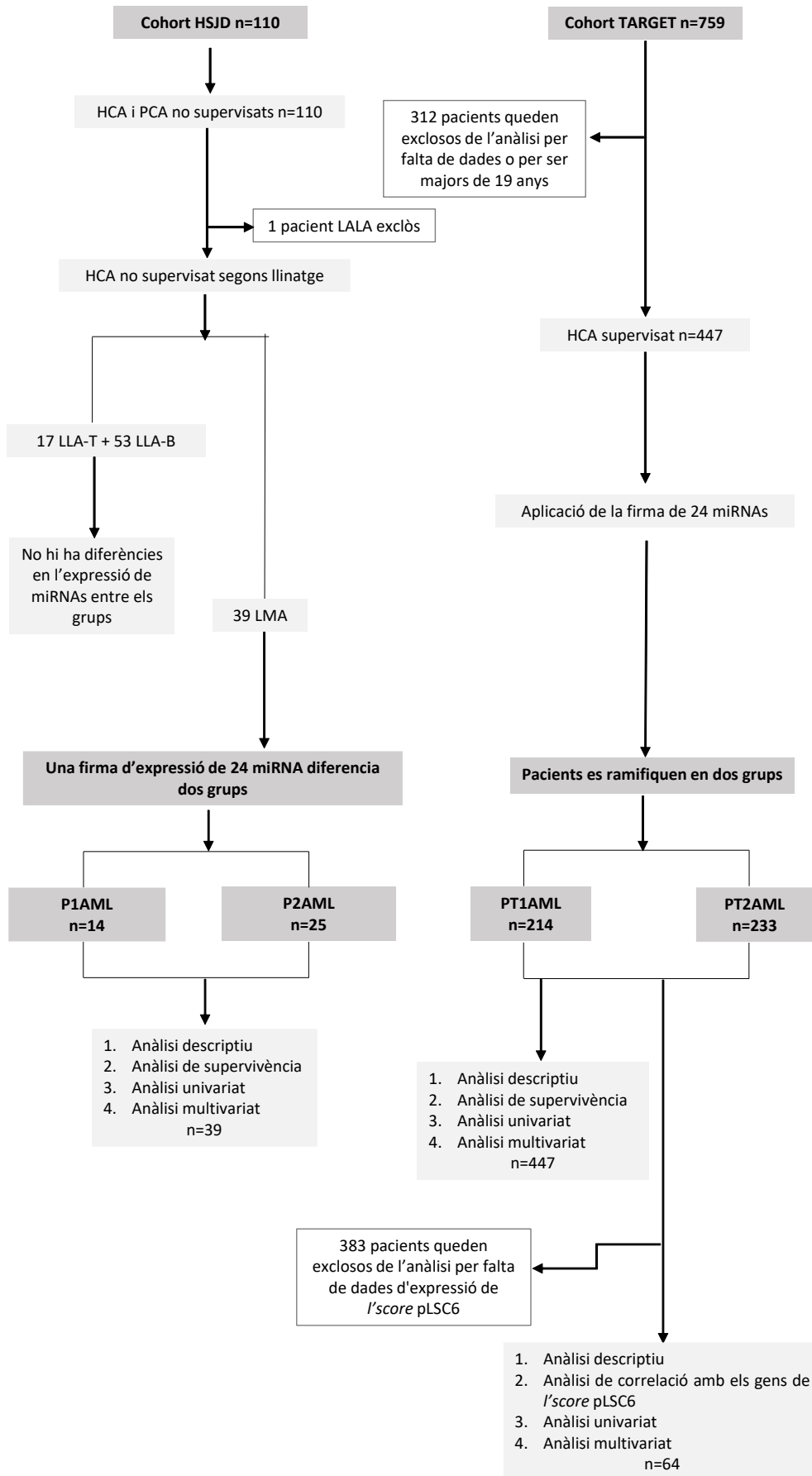


Figura 26: Esquema de l'estudi I. HSJD: Hospital Sant Joan de Déu. HCA: *hierarchical cluster analysis*. PCA: *principal component analysis*. LALA: leucèmia aguda de llinatge ambigu. LMA: leucèmia mieloide aguda. LLA: leucèmia limfoblàstica aguda. miRNA: microRNA. P1AML i P2AML: nomenclatura assignada als dos grups de pacients amb leucèmia mieloide aguda de la cohort d'estudi de l'HSJD amb diferències significatives en supervivència en funció de l'expressió dels miRNAs. Els pacients amb P1AML presentaven una pitjor supervivència respecte als pacients P2AML. PT1AML i PT2AML: nomenclatura assignada als dos grups de pacients amb leucèmia mieloide aguda de la cohort de validació del repositori TARGET (*Therapeutically applicable research to generate effective treatments*, <https://target-data.nci.nih.gov/>), amb diferències significatives en supervivència en funció de l'expressió dels miRNAs. Els pacients amb PT1AML presentaven una pitjor supervivència respecte als pacients PT2AML. pLSC6 score: *pediatric leukemic stem cell score*.

1.1 Pacients:

Es van estudiar 110 pacients pediàtrics (0-18 anys al diagnòstic) amb leucèmia aguda *de novo* diagnosticats i tractats a l'Hospital Sant Joan de Déu (HSJD) amb mostra disponible entre els anys 2000-2020. Donat que la freqüència de pacients amb *KMT2A-r* és baixa, diferents hospitals (Hospital Universitari Vall d'Hebron, Hospital Universitari Parc Taulí, Hospital Universitario de Cruces, Hospital Universitari Son Espases i Hospital Universitario Miguel Servet) van contribuir enviant mostres de pacients amb *KMT2A-r*. Es va realitzar un diagnòstic integrat de la leucèmia combinant la morfologia, citometria de flux multiparamètrica (amb panells de 4 i 8 colors i l'índex de DNA), cariotip, FISH, i RT-PCR per als principals reordenaments.

Els pacients diagnosticats de LLA es van classificar i tractar segons els protocols vigents de la Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica (SEHOP) i del grup Programa Español de Tratamientos de Hematología (PETHEMA). Els lactants amb LLA es van tractar segons els protocols INTERFANT-99 i INTERFANT-06. Els pacients amb LMA es van tractar amb els protocols SHOP LAM, LANL 2002 i el protocol de la *Nordic Society for Paediatric Haematology and Oncology* (NOPHO) NOPHO-DBH AML 2012. Els pacients amb LPA van seguir els protocols consecutius PETHEMA LPA 2005 i 2012. La cohort d'estudi de l'HSJD inclou 53 pacients amb LLA-B, 17 pacients amb LLA-T, 39 pacients amb LMA i un pacient amb leucèmia aguda de llinatge ambigu (LALA), amb representació dels

principals subtipus genètics. Cal destacar que la nostra sèrie inclou un alt nombre de pacients amb *KMT2A*-r en tots els llinatges. El motiu principal és que aquests pacients presenten poques alteracions genètiques, el que suggereix que l'epigenètica pot jugar un paper important en aquestes leucèmies. Les característiques clíniques i biològiques al diagnòstic de la cohort d'estudi de l'HSJD es presenten a la Taula 20.

Taula 20: Pacients de la cohort d'estudi de l'HSJD i principals característiques clínico-biològiques al diagnòstic.

Pacients	Total no. (%) 110
Sexe (n=110)	
Femení	42 (38,2%)
Masculí	68 (61,8%)
Edat, anys (n=110)	
Mediana [rang]	6,1 [0,0-17,4]
< 1 any	17 (15,5%)
1-9 anys	59 (53,6%)
≥ 10 anys	34 (30,9%)
Recòmpte leucocitari, x10⁹ /L, mediana [rang] (n=110)	59,2 [0,6-741,0]
Infiltració del SNC (n=108)	
SNC-1	76 (70,3%)
SNC-2	14 (13%)
SNC-3	18 (16,7%)
Llinatge (n=110)	
LLA-B	53 (48,2%)
LLA-T	17 (15,5%)
LMA	39 (35,5%)
LALA	1 (0,9%)
Fenotip LLA (n=70)	
<u>LLA-B (n=53)</u>	
CD10+ comú	43 (61,4%)
Pro-B CD10-	10 (14,4%)
<u>LLA-T (n=17)</u>	
Pro-T	1 (1,4%)
Pre-T	5 (7,1%)
Early T-cell Precursor	5 (7,1%)
Cortical	3 (4,3%)
Madur	3 (4,3%)
Categoria Molecular (n=110)	
<u>LLA-B (n=53)</u>	
Alta Hiperdiploïdia	5 (9,4%)
Hipodiploïdia	1 (1,9%)
t(12;21)(p13;q22) <i>ETV6::RUNX1</i>	5 (9,4%)
t(1;19)(q23;p13) <i>TCF3::PBX1</i>	5 (9,4%)
t(9;22)(q34;p11) <i>BCR::ABL1</i>	5 (9,4%)
<i>KMT2A</i> reordenat	13 (24,5%)
iAMP21	6 (11,3%)
<i>B-other</i>	13 (24,5%)
<u>LLA-T (n=17)</u>	
LLA-T no definides en altres grups	15 (88,2%)
<i>KMT2A</i> reordenat	2 (11,8%)
<u>LMA (n=39)</u>	

Pacients	Total no. (%) 110
t(8;21)(q22;q22.1) <i>RUNX1::RUNX1T1</i>	4 (10,3%)
inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22) <i>CBFB::MYH11</i>	4 (10,3%)
t(15;17)(q22;q12) <i>PML::RARA</i>	4 (10,3%)
<i>KMT2A</i> reordenat	16 (41,0%)
LMA no definides en altres grups	11 (28,1%)
<u>LALA (n=1)</u>	
<i>KMT2A</i> reordenat	1 (100,0%)
Partner de <i>KMT2A</i> (n=32)	
<u>LLA-B (n=13)</u>	
<i>AFF1</i>	2 (15,4%)
<i>MLLT3</i>	2 (15,4%)
<i>MLLT1</i>	1 (7,7%)
<i>MLK1</i>	1 (7,7%)
<i>TNRC18</i>	1 (7,7%)
Partner desconegut*	6 (46,2%)
<u>LLA-T (n=2)</u>	
<i>MLLT1</i>	1 (50,0%)
Partner desconegut*	1 (50,0%)
<u>LMA (n=16)</u>	
<i>MLLT3</i>	7 (43,8%)
<i>ABI1</i>	1 (6,3%)
<i>MLLT10</i>	1 (6,3%)
<i>ELL1</i>	2 (12,5%)
Partner desconegut*	5 (31,3%)
<u>LALA (n=1)</u>	
Partner desconegut*	1 (100,0%)
Protocol terapèutic (n=110)	
<u>LMA (n=39)</u>	
PETHEMA LPA 2005/2012	4 (10,3%)
SHOP AML 2001/2007	24 (61,5%)
NOPHO-DBH AML 2012	9 (23,1%)
LANL 2002	2 (5,1%)
<u>LLA (n=70)</u>	
SEHOP-PETHEMA 2013	40 (57,1%)
SHOP 1999/2005	22 (31,4%)
INTERFANT-06/99	5 (7,1%)
PETHEMA	1 (1,4%)
SHOP 2001	2 (2,9%)
<u>LALA (n=1)</u>	
INTERFANT-06	1 (100,0%)
SLE (n=109)	
Als 5 anys (IC 95%)	73,9% (65,4%-83,5%)
Als 10 anys (IC 95%)	69,6% (60,0%-80,7%)
SG (n=109)	
Als 5 anys (IC 95%)	84,6% (78,0%-91,9%)
Als 10 anys (IC 95%)	76,8% (66,9%-88,3%)

HSJD: Hospital Sant Joan de Déu. SNC: Sistema nerviós central. LLA-B: leucèmia limfoblàstica aguda B. LLA-T: leucèmia limfoblàstica aguda T. LMA: leucèmia mieloide aguda. LALA: leucèmia aguda de llinatge ambigu. SLE: supervivència lliure d'esdeveniment. SG: supervivència global. IC: interval de confiança. *Altres reordenaments de *KMT2A* amb *partners* desconegut (reordenaments de *KMT2A* confirmats per FISH).

1.2 Elecció dels miRNAs estudiats:

Mitjançant una cerca bibliogràfica es van escollir 89 miRNAs per la seva possible rellevància en la leucèmia pediàtrica i/o la seva relació amb vies de *stemness*. Es va dissenyar una placa de PCR quantitativa incloent els 89 miRNAs seleccionats segons la literatura, 3 miRNAs com a controls endògens (hsa-miR-103a-3p (repetit dos cops), hsa-miR-191-5p, i U6 snRNA) i 3 *spike-in*, dos d'ells interplaca (UniSp3 IPC) i un d'ells intraplaca (UniSp6). Els miRNAs seleccionats, agrupats per clústers i famílies, les seves dianes en les vies d'auto-renovació i immaduresa i/o la seva possible rellevància clínica al diagnòstic, pronòstic o tractament en la leucèmia pediàtrica es troben a la taula 21 i Figura 27. Les seqüències dels miRNAs i els controls es troben a la taula 22.

Taula 21: Llistat dels 89 miRNAs seleccionats, agrupats per família i clúster, i les seves dianes descrites en vies d'auto-renovació, immadura i/o la seva possible rellevància clínica en el diagnòstic, pronòstic i tractament en la leucèmia aguda pediàtrica. miRNA: microRNA. pLSC6: *pediatric leukemic stem cell score* de 6 gens. LSC17: *leukemic stem cell score* de 17 gens descrit a pacients adults (160,161).

Gene family (307–313)	Clustered miRNAs (308,309,313–317)	miRNA	Stemness pathways	Clinical relevance in diagnosis, leukemogenesis, prognosis and treatment	Target genes included in pLSC6 and/or LSC17 (318,319)	Target genes involved in stemness pathways (318,319)	References
let-7	hsa-let-7a-1, hsa-let-7f, hsa-let-7d	hsa-let-7a-5p	X	X	CDK6, DPYSL, NYNRIN	FZD3, DTX2, HOXB1, TP53, CCND2, HOXA1, NRAS, POLR2D, PBX1, WNT9A, NKD1, VANGL2, HOXD1, ABL2, SENP2, CBL, WNT9B, CCND1, DTX4, SH2B3, MEIS1, PPP3CA, FZD4, YY1, PSENNEN, GAB2, KMT2D, APC2, NCOR1, AKT2, NLK, SMAD2, CSNK2A1, MAPK8, DVL3, PIK3CA, WNT1	(285,320)
let-7	hsa-let-7a-3, hsa-let-7b	hsa-let-7b-5p	X	X	CDK6, DPYSL, NYNRIN	HDACs, FZD3, DTX2, HOXB1, TP53, CCND2, HOXA1, NRAS, POLR2D, PBX1, WNT9A, NKD1, VANGL2, HOXD1, ABL2, SENP2, CBL, WNT9B, CCND1, DTX4, SH2B3, MEIS1, PPP3CA, FZD4, YY1, PSENNEN, GAB2, KMT2D, APC2, NCOR1, AKT2, NLK, SMAD2, CSNK2A1, MAPK8, DVL3, PIK3CA, WNT1	(283,320)
let-7	hsa-let-7c-5p, hsa-mir-99a	hsa-let-7c-5p	X	X	CDK6, DPYSL, NYNRIN	HDACs, FZD3, DTX2, HOXB1, TP53, CCND2, HOXA1, NRAS, POLR2D, PBX1, WNT9A, NKD1, VANGL2, HOXD1, ABL2, SENP2, CBL, WNT9B, CCND1, DTX4, SH2B3, MEIS1, PPP3CA, FZD4, YY1, PSENNEN, GAB2, KMT2D, APC2, NCOR1, AKT2, NLK, SMAD2, CSNK2A1, MAPK8, DVL3, PIK3CA, WNT1	(285)
let-7	hsa-let-7a-1, hsa-let-7f, hsa-let-7d	hsa-let-7d-5p	X	X	CDK6, DPYSL, NYNRIN	FZD3, DTX2, HOXB1, TP53, CCND2, HOXA1, NRAS, POLR2D, PBX1, WNT9A, NKD1, VANGL2, HOXD1, ABL2, SENP2, CBL, WNT9B, CCND1, DTX4, SH2B3, MEIS1, PPP3CA, FZD4, YY1, PSENNEN, GAB2, KMT2D, APC2, NCOR1, AKT2, NLK, SMAD2, CSNK2A1, MAPK8, DVL3, PIK3CA, WNT1	(285)
let-7	hsa-let-7g	hsa-let-7g-5p	X	X	CDK6, DPYSL, NYNRIN	FZD3, DTX2, HOXB1, TP53, CCND2, HOXA1, NRAS, POLR2D, PBX1, WNT9A, NKD1, VANGL2, HOXD1, ABL2, SENP2, CBL, WNT9B, CCND1, DTX4, SH2B3, MEIS1, PPP3CA, FZD4, YY1, PSENNEN, GAB2, KMT2D, APC2, NCOR1, AKT2, NLK, SMAD2, CSNK2A1, MAPK8, DVL3, PIK3CA, WNT1	(285,320)

Gene family (307–313)	Clustered miRNAs (308,309,313–317)	miRNA	Stemness pathways	Clinical relevance in leukemogenesis, prognosis and treatment	Target genes included in pLSC6 and/or LSC17 (318,319)	Target genes involved in stemness pathways (318,319)	References
let-7	-	hsa-let-7i-5p	X	X	CDK6, DPYSL, NYNRIN	FZD3, DTX2, HOXB1, TP53, CCND2, HOXA1, NRAS, POLR2D, PBX1, WNT9A, NKD1, VANGL2, HOXD1, ABL2, SENP2, CBL, WNT9B, CCND1, DTX4, SH2B3, MEIS1, PPP3CA, FZD4, YY1, PSENFEN, GAB2, KMT2D, APC2, NCOA1, AKT2, NLK, SMAD2, CSNK2A1, MAPK8, DVL3, PIK3CA, WNT1	(285,320)
let-7	hsa-let-7a-1 hsa-let-7f-1 hsa-let-7d	hsa-let-7f-5p	X	X	CDK6, DPYSL, NYNRIN	FZD3, DTX2, HOXB1, TP53, CCND2, HOXA1, NRAS, POLR2D, PBX1, WNT9A, NKD1, VANGL2, HOXD1, ABL2, SENP2, CBL, WNT9B, CCND1, DTX4, SH2B3, MEIS1, PPP3CA, FZD4, YY1, PSENFEN, GAB2, KMT2D, APC2, NCOA1, AKT2, NLK, SMAD2, CSNK2A1, MAPK8, DVL3, PIK3CA, WNT1	(285,320)
let-7	hsa-mir-99b hsa-let-7e hsa-mir-125a	hsa-let-7e-5p	X	X	CDK6, DPYSL, NYNRIN	FZD3, DTX2, HOXB1, TP53, CCND2, HOXA1, NRAS, POLR2D, PBX1, WNT9A, NKD1, VANGL2, HOXD1, ABL2, SENP2, CBL, WNT9B, CCND1, DTX4, SH2B3, MEIS1, PPP3CA, FZD4, YY1, PSENFEN, GAB2, KMT2D, APC2, NCOA1, AKT2, NLK, SMAD2, CSNK2A1, MAPK8, DVL3, PIK3CA, WNT1	(285)
mir-8	hsa-mir-200c hsa-mir-141	hsa-mir-141-3p	X	X	CDK6, DPYSL3, ZBTB46	YY1, PRKACB, RARB, GRRB2, CCND2, SOX17, ABL2, CHP1, SIAH1, CBL, STAT5A, PPP2CA, STAT5B, PSEN1, PPP2R5E, CSNK1A1, PPP3R1, PRICKLE1, CTBP2, CSNK2A1, EGR2, JAG1, WNT5A, CXCC4, PLCB4, PBX1, FZD4, NCOA3, KMT2C	(320,321)
mir-8	hsa-mir-200b hsa-mir-200a hsa-mir-429	hsa-mir-200b-3p	X	X	DNMT3B	ZEB2, PRKACB, JUN, PPP2CA, RHOA, CDKN1B, GRAP2, PIK3CA, LFN3, CBL, PPP2R5E, PTPN11, KRAS, RAC1, SMAD2, NCOA3, CNOT6, AKT2, NKD1, EP300, FBXW11, NOTCH1, ROCK2, CTBP2, TBL1XR1, PPP2R5C, EED, SUZ12, SIAH1, SOCS6, KMT2C, CAMK2D, PRKCA	(320,322)
mir-8	hsa-mir-200c hsa-mir-141	hsa-mir-200c-3p	X	X	DNMT3B	ZEB2, PRKACB, JUN, PPP2CA, RHOA, CDKN1B, GRAP2, PIK3CA, LFN3, CBL, PPP2R5E, PTPN11, KRAS, RAC1, SMAD2, NCOA3, CNOT6, AKT2, NKD1, EP300, FBXW11, NOTCH1, ROCK2, CTBP2, TBL1XR1, PPP2R5C, EED, SUZ12, SIAH1, SOCS6, KMT2C, CAMK2D, PRKCA	(303,320,322)
mir-9	-	hsa-mir-9-5p	X	X	SOCS2	PIK3R3, NOTCH2, SOCS2, HES1, KCNK10, RHOA, CSNK1A1, TCF7, VANGL1, BCL2L11, HOXD1, SH2B3, PPP2R5D, HOXB1,	(320,323–326)

Gene family (307–313)	Clustered miRNAs (308,309,313–317)	miRNA	Stemness pathways	Clinical relevance in diagnosis, leukemogenesis, prognosis and treatment	Target genes included in pLSC6 and/or LSC17 (318,319)	Target genes involved in stemness pathways (318,319)	References
						GAB2, GSK3B, SOS1, AJUBA, PPARD, FOXO3, NCOA3, NFATC3, PTPRJ, WNT4, CBL, PSEN1, ABL2, RXRA, PRKCA, TBL1XR1, MAML2, FZD5	
mir-10	-	hsa-miR-10a-3p	X	-	CDK6	HOXA3, HOXA, PAX6, PPP2R5A, LRP6, WNT3, PIK3CA, ,APK8, JAG1, SMAD4, PLCB2, WNT16, C15ORF37, FZD6, DTX4, CDKN1B, C15orf37, SOCS6, KRAS, PBX1, HOXB3, PAGR1, UBB, PRICKLE1, FZD1, VANGL1, FZD3, PLCB1, CTNNB1, MAPK10, TCF7L2, NLK, NLK, PRKX, YY1, RBBP5, POLR2D, WNT5A, CNOT6, MAPK9, RBBP4, STAT5B, RPS27A, NFATC2, PPP3R2, CBL, WNT2B, GOLGA6L9, PRICKLE2, ROCK1, KMT2D, ABL2, NCOA3, SMAD3, GSK3B, PSEN1, TBL1XR1, PPP3CB, PPP2R5E, FZD5, SMAD2, PIAS2, CSNK2A1, PKNOX1, NCOR1, SOX17, NKD1	(322,327,328)
mir-10	-	hsa-miR-10a-5p	X	X	CDK6	HOXA3, HOXB3, MAP3K7, PIK3CA, CTNNBIP1, CAMK2B, WNT9B, HOXA1, NCOA6, FZD2, TBL1X, CAMK2G, NFAT5, CNOT6, BCL2L11, BTRC, DVL3, SMAD2	(320,322,327)
mir-10	-	hsa-miR-10b-5p	X	-	CDK6	HOXA3, HOXB3, MAP3K7, PIK3CA, CTNNBIP1, CAMK2B, WNT9B, HOXA1, NCOA6, FZD2, TBL1X, CAMK2G, NFAT5, CNOT6, BCL2L11, BTRC, DVL3, SMAD2	(322,327)
mir-10	hsa-mir-99a hsa-let-7c	hsa-miR-99a-5p	X	X	-	HOXA1, FZD8, PPP3CA, FZD5	(284,285)
mir-10	hsa-mir-100 hsa-mir-10526 hsa-let-7a-2	hsa-miR-100-5p	X	X	-	HOXA1, FZD8, PPP3CA, FZD5	(284,285)
mir-10	-	hsa-miR-125b-5p	X	X	CD34	LFNG, CSNK2A1, GRB10, PPP2CA, PPP2R5C, APC, DAAM1, HOXD1, AKT3, HOXB3, GAB2, SH2B3, ABL2, DAAM2, MAPK10, VANGL2, PPP2R1B, DTX4, SMAD2, VANGL1, DVL3	(284,320)
mir-15	hsa-mir-15a hsa-mir-16-1	hsa-miR-15a-5p	X	X	CDK6, NYNRIN, ZBTB46	PDCD4, ARL2, BTG2, WNT3A, WNT7A, AKT3, CCND1, AXIN2, CCND2, DLL1, BTRC, WNT2B, CCND3, SOCS6, MAPK8, RARB, FLT3, ABL2, CHP1, WNT4, FOSL1, PPP2R5C, CTNNBIP1, FZD6, SIAH1, WIFI, LRP6, SMAD3, NKD1, EED, PIAS2, WNT10B,	(320,329)

Gene family (307-313)	Clustered miRNAs (308,309,313-317)	miRNA	Stemness pathways	Clinical relevance in leukemogenesis, prognosis and treatment	Target genes included in pLSC6 and/or LSC17 (318,319)	Target genes involved in stemness pathways (318,319)	References
						<i>PIK3R1, FZD4, PPP2R1A, NOTCH2, PTPRJ, GRB10, HOXA3, KMT2D, NFATC3, KRAS, TBL1XR1, NFATC2, ROCK1, PPP2R1B, KMT2C, APC, SUZ12, ROCK2, GSK3B</i>	
mir-15	hsa-mir-15b hsa-mir-16-2	hsa-miR-15b-5p	X	X	<i>CDK6, NYNRRIN, ZBTB46</i>	<i>WNT3A, WNT7A, AKT3, CCND1, AXIN2, CCND2, DLL1, BTRC, WNT2B, CCND3, SOCS6, MAPK8, RARB, FLT3, ABL2, CHP1, WNT4, FOSL1, PPP2R5C, CTNNBIP1, FZD6, SIAH1, WIF1, LRP6, SMAD3, NKD1, EED, PIAS2, WNT10B, PIK3R1, FZD4, PPP2R1A, NOTCH2, PTPRJ, GRB10, HOXA3, KMT2D, NFATC3, KRAS, TBL1XR1, NFATC2, ROCK1, PPP2R1B, KMT2C, APC, SUZ12, ROCK2, GSK3B</i>	(330)
mir-15	hsa-mir-15a hsa-mir-16-1	hsa-miR-16-5p	X	X	<i>CDK6, NYNRRIN, ZBTB46</i>	<i>WNT3A, WNT7A, AKT3, CCND1, AXIN2, CCND2, DLL1, BTRC, WNT2B, CCND3, SOCS6, MAPK8, RARB, FLT3, ABL2, CHP1, WNT4, FOSL1, PPP2R5C, CTNNBIP1, FZD6, SIAH1, WIF1, LRP6, SMAD3, NKD1, EED, PIAS2, WNT10B, PIK3R1, FZD4, PPP2R1A, NOTCH2, PTPRJ, GRB10, HOXA3, KMT2D, NFATC3, KRAS, TBL1XR1, NFATC2, ROCK1, PPP2R1B, KMT2C, APC, SUZ12, ROCK2, GSK3B</i>	(320,330)
mir-15	hsa-mir-497 hsa-mir-195	hsa-miR-195-5p	X	X	<i>CDK6, NYNRRIN, ZBTB46</i>	<i>WNT3A, WNT7A, AKT3, CCND1, AXIN2, CCND2, DLL1, BTRC, WNT2B, CCND3, SOCS6, MAPK8, RARB, FLT3, ABL2, CHP1, WNT4, FOSL1, PPP2R5C, CTNNBIP1, FZD6, SIAH1, WIF1, LRP6, SMAD3, NKD1, EED, PIAS2, WNT10B, PIK3R1, FZD4, PPP2R1A, NOTCH2, PTPRJ, GRB10, HOXA3, KMT2D, NFATC3, KRAS, TBL1XR1, NFATC2, ROCK1, PPP2R1B, KMT2C, APC, SUZ12, ROCK2, GSK3B</i>	(320,331)
mir-17	hsa-mir-17 hsa-mir-18a hsa-mir-19a hsa-mir-20a hsa-mir-19b-1 hsa-mir-92a-1	hsa-miR-17-3p	X	X	<i>SOCS2, CDK6, EMP1, DPYSL3, ZBTB46</i>	<i>PPP2CA, POLR2D, WNT5A, AKT3, Cioj220, HRAS, FOSL1, SFRP4, PPARD, BCL2L11, SMAD4, PPP3CA, STAT5A, FZD4, CAMK2D, APC2, CAMK2B, WNT10B, NKD1, SFRP1, RBL1, MEIS1, MAML2, Czojfi5, SLA2, MAPK10, SOCS2, RAC2, ABL2, GOLGA6L9, PIK3R1, GOLGA6L9, CAMK2G, NFATC3, NFAT5, RBL1, CTBP1, WNT4, WNT2B, ROCK1, SLA, SVK, KRAS,</i>	(332)

Gene family (307–313)	Clustered miRNAs (308,309,313–317)	miRNA	Stemness pathways	Clinical relevance in diagnosis, leukemogenesis, prognosis and treatment	Target genes included in pLSC6 and/or LSC17 (318,319)	Target genes involved in stemness pathways (318,319)	References
						HOXD1, PSEN1, WNT5B, JAG1, GRB10, PRKX, TCF7, PPP2R5C, CZORF15, HOXA1, HOXD4, CBL, KMT2C, PPP2R1B, DTX4, AJUBA, PPP2R5A, NFATC2, PRICKLE2, MAPK9, GRAP2, FZD2, RBBP4, HEYL, WNT3, CIORF220, SOX17, CSNK2A1, FZD3, TBL1X, PIK3CA, WNT9B, NFATC4, CAMK2A, SMAD3, CNOT6, TP53, SKP1, PTPRJ, PLCB4, SUZ12, BTRC, FZD10, NRAS, WNT7B, PPP2R5D, DAAM2, HOXB3, FOXO3, HOXD3, TBL1XR1, CCND2, AKT1, GSK3B, YY1, ARRB1, CACYBP, SOS1, PPP3CC, PAX6, ASH2L, UBA52, RBBP5, WNT1, AKT2, NKD2, SAP30, PIAS2, PPP2R1A	
mir-17	hsa-mir-17 hsa-mir-18a hsa-mir-19a hsa-mir-20a hsa-mir-19b-1 hsa-mir-92a-1	hsa-miR-17-5p	X	X	CDK6	BCL11B, PPP3R1, UBC, RBBP7, SOS1, TCF7L1, VANGL1, EGR2, ABL2, CCND1, SOCS6, NCOA3, FZD3, PRKACB, FBXW11, HOXA2, CSNK1A1, AJUBA, BCL2L11, CCND2, PLCB1, PKNOX1, WNT9B, AKT3, PTPRJ, KMT2C, TBL1X, ROCK2, PPARD, RARB, NFAT5, PPP2CA, PIK3R1, FZD4, PSEN1, NCOR1	(320,333,334)
mir-17	hsa-mir-17 hsa-mir-18a hsa-mir-19a hsa-mir-20a hsa-mir-19b-1 hsa-mir-92a-1	hsa-miR-18a-5p	X	X	-	CCND2, DAAM2, SMAD2, PRKACB, WNT8B, FZD3, NOTCH2, WNT9A, GAB2, NFAT5	(320,334,335)
mir-17	hsa-mir-17 hsa-mir-18a hsa-mir-19a hsa-mir-20a hsa-mir-19b-1 hsa-mir-92a-1	hsa-miR-20a-5p	X	X	CDK6	PPP3R1, UBC, RBBP7, SOS1, TCF7L1, VANGL1, EGR2, ABL2, CCND1, SOCS6, NCOA3, FZD3, PRKACB, FBXW11, HOXA2, CSNK1A1, AJUBA, BCL2L11, CCND2, PLCB1, PKNOX1, WNT9B, AKT3, PTPRJ, KMT2C, TBL1X, ROCK2, PPARD, RARB, NFAT5, PPP2CA, PIK3R1, FZD4, PSEN1, NCOR1	(320,327,334,336)
mir-17	hsa-mir-106a hsa-mir-18b hsa-mir-20b	hsa-miR-20b-5p	X	X	CDK6	PPP3R1, UBC, RBBP7, SOS1, TCF7L1, VANGL1, EGR2, ABL2, CCND1, SOCS6, NCOA3, FZD3, PRKACB, FBXW11, HOXA2, CSNK1A1, AJUBA, BCL2L11, CCND2, PLCB1, PKNOX1, WNT9B,	(337,338)

Gene family (307-313)	Clustered miRNAs (308,309,313-317)	miRNA	Stemness pathways	Clinical relevance in leukemogenesis, prognosis and treatment	Target genes included in pLSC6 and/or LSC17 (318,319)	Target genes involved in stemness pathways (318,319)	References
	hsa-mir-19b-2 hsa-mir-92a-2 hsa-mir-363					AKT3, PTPRR1, KMT2C, TBL1X, ROCK2, PPARD, RARB, NFAT5, PPP2CA, PIK3R1, FZD4, PSEN1, NCOR1	
mir-19	hsa-mir-17 hsa-mir-18a hsa-mir-19a hsa-mir-20a hsa-mir-19b-1 hsa-mir-92a-1	hsa-mir-19a-3p	X	X	ZBTB46	CCND1, PKNOX1, PRICKLE2, PPP2R5E, PRKACB, PIK3CA, WNT3, WNT10A, CCND2, FZD6, CNOT6, GRB10, WNT7B, PPP2R5A, HOXD1, PLCB1, PRKY, FBXW11, KDM6A, SOCS6, KRAS, YY1, NFATC2, BCL2L11, TMEM236, NLK, HOXD4, SUZ12, FZD3, VANGL1, RXRA, CSNK2A1, MAPK8, PAX6, WNT1	(320,334,339)
mir-19	hsa-mir-17 hsa-mir-18a hsa-mir-19a hsa-mir-20a hsa-mir-19b-1 hsa-mir-92a-1	hsa-mir-19b-3p	X	X	ZBTB46	CCND1, PKNOX1, PRICKLE2, PPP2R5E, PRKACB, PIK3CA, WNT3, WNT10A, CCND2, FZD6, CNOT6, GRB10, WNT7B, PPP2R5A, HOXD1, PLCB1, PRKY, FBXW11, KDM6A, SOCS6, KRAS, YY1, NFATC2, BCL2L11, TMEM236, NLK, HOXD4, SUZ12, FZD3, VANGL1, RXRA, CSNK2A1, MAPK8, PAX6, WNT1	(320,334,339)
mir-21	-	hsa-mir-21-5p	X	X	CDK6	ST3GAL6, JAG1, PIK3R1, MAPK10, SOCS6, PPP3CA, LRP6, MEIS1, CNOT6, SUZ12, WNT2B, NFAT5, FZD8	(320,340)
mir-22	-	hsa-mir-22-3p	X	X	SOCS2, DPYSL3	TET2, FRA1, ARRB1, CBL, AKT3, HOXA4, CSNK1A1, WNT10B, CAMK2G, TP53, MAPK10, SOCS2, EP300, NRAS, TCF7L2, NFAT5, PAX6, FZD8, WNT1	(320,322,341)
mir-24	hsa-mir-23b hsa-mir-27b hsa-mir-3074 hsa-mir-24-1	hsa-mir-24-3p	X	X	-	BCL2L11, CDKN1B, WNT8B, CAMK2B, RBBP4, TCF7, GSK, CNOT6, WNT4, GSK3B, DLL1, WNT2B, GAB2, CAMK2D, SOCS6, PRKCA, RARG, NFAT5, NLK, FZD5, DVL3, PIAS2	(320,342)
mir-25	hsa-mir-17 hsa-mir-18a hsa-mir-19a hsa-mir-20a	hsa-mir-92a-3p	X	X	ZBTB46	CAMK2A, FZD10, BCL2L11, PTPRR1, CXCC4, DTX2, HOXC4, EZH2, EGR2, CTNWBIP1, SOCS6, NCOA3, DAAM1, TBL1XR1, NLK, MAPK8, NRAS, ABL2, NOTCH1, NFAT5, PIK3CA	(320,334)

Gene family (307–313)	Clustered miRNAs (308,309,313–317)	miRNA	Stemness pathways	Clinical relevance in diagnosis, leukemogenesis, prognosis and treatment	Target genes included in pLSC6 and/or LSC17 (318,319)	Target genes involved in stemness pathways (318,319)	References
mir-25	hsa-mir-19b-1 hsa-mir-92a-1	hsa-mir-92b-3p	X	X	ZBTB46	CAMK2A, FZD10, BCL2L11, PTPRJ, CXC4, DTX2, HOXC4, EZH2, EGR2, CTNNBIP1, SOCS6, NCOA3, DAAM1, TBL1XR1, NLK, MAPK8, NRAS, ABL2, NOTCH1, NFAT5, PIK3CA	(334)
mir-26	-	hsa-mir-26a-5p	X	X	CDK6	EZH2, FRAT2, LEFL, JAG1, PPP3R1, VANGL2, PPP3CB, ABL2, PLCB1, CREBBP, TCF7L2, GRB10 PPP2R5A, EP300, CAMK2A, SLA2, CTNNBIP1, SOX17, GSK3B, KDM6A, KMT2C, WNT5A, SOCS6 TBL1XR1, HOXD4, CCND2, NRAS, ROCK1, NLK, SAP30, APC, ST3GAL6, GRAP2	(320,343)
mir-28	-	hsa-mir-151a-5p	X	X	-	-	(285)
mir-29	hsa-mir-29b-1 hsa-mir-29a	hsa-mir-29a-3p	X	X	DNMT3B, CDK6, DPYSL3, ZBTB46	TMEM236, FRAT2, FOXO3, PIK3R1, FZD4, CCND2, CAMK2G, MAFB, RARB, GRAP2, FZD5, AKT3, DAAM2, CTNNBIP1, VANGL1, DTX4, MAPK10, NOTCH2, YY1, CNOT6, PRICKLE2, LRP6, HEYL, NCOA3, NFATC3, DAAM1, NRAS, EED, GSK3B, WNT10B, WNT8B, NFAT5, MAPK8, PPAR, NFATC4, FOSL1, GAB2, PPP2CA, ARRB1, PIK3CA, APC	(320,344,345)
mir-29	hsa-mir-29b-1 hsa-mir-29a	hsa-mir-29b-3p	X	X	DNMT3B, CDK6, DPYSL3, ZBTB46	TMEM236, FRAT2, FOXO3, PIK3R1, FZD4, CCND2, CAMK2G, MAFB, RARB, GRAP2, FZD5, AKT3, DAAM2, CTNNBIP1, VANGL1, DTX4, MAPK10, NOTCH2, YY1, CNOT6, PRICKLE2, LRP6, HEYL, NCOA3, NFATC3, DAAM1, NRAS, EED, GSK3B, WNT10B, WNT8B, NFAT5, MAPK8, PPAR, NFATC4, FOSL1, GAB2, PPP2CA, ARRB1, PIK3CA, APC	(320,344,345)
mir-29	hsa-mir-29b-2 hsa-mir-29c	hsa-mir-29c-3p	X	X	DNMT3B, CDK6, DPYSL3, ZBTB46	HDAC4, TMEM236, FRAT2, FOXO3, PIK3R1, FZD4, CCND2, CAMK2G, MAFB, RARB, GRAP2, FZD5, AKT3, DAAM2, CTNNBIP1, VANGL1, DTX4, MAPK10, NOTCH2, YY1, CNOT6, PRICKLE2, LRP6, HEYL, NCOA3, NFATC3, DAAM1, NRAS, EED, GSK3B, WNT10B, WNT8B, NFAT5, MAPK8, PPAR, NFATC4, FOSL1, GAB2, PPP2CA, ARRB1, PIK3CA, APC	(320,346)

Gene family (307-313)	Clustered miRNAs (308,309,313-317)	miRNA	Stemness pathways	Clinical relevance in diagnosis, leukemogenesis, prognosis and treatment	Target genes included in pLSC6 and/or LSC17 (318,319)	Target genes involved in stemness pathways (318,319)	References
mir-30	-	hsa-miR-30a-5p	X	-	-	MVC, EED, RARB, HOXA1, FZD3, RARG, PPP3CA, SOCS6, CSNK1A1, SOS1, SAP30, CAMK2D, SH2B3, PSEN2, NFAT5, BCL2L11, KMT2C, GRB10, TCF7, PPP3CB, NFATC3, NCOA3, ABL2, MAPK8, PRICKLE1, LRP6, CNOT6, SMAD2, PPP3R1, FZD2, FOXO3, HOXA2, MAP3K7, PPP2R5E, ROCK2, NFATC2, KRAS, YY1, TBL1XR1, NOTCH1, WNT7B, TBL1X, KMT2D, NLK, CSNK2A1	(320,347)
mir-30	hsa-miR-30d hsa-miR-30b	hsa-miR-30b-5p	X	X	-	MVC, EED, RARB, HOXA1, FZD3, RARG, PPP3CA, SOCS6, CSNK1A1, SOS1, SAP30, CAMK2D, SH2B3, PSEN2, NFAT5, BCL2L11, KMT2C, GRB10, TCF7, PPP3CB, NFATC3, NCOA3, ABL2, MAPK8, PRICKLE1, LRP6, CNOT6, SMAD2, PPP3R1, FZD2, FOXO3, HOXA2, MAP3K7, PPP2R5E, ROCK2, NFATC2, KRAS, YY1, TBL1XR1, NOTCH1, WNT7B, TBL1X, KMT2D, NLK, CSNK2A1	(285)
mir-30	hsa-miR-30e hsa-miR-30c-1	hsa-miR-30e-5p	X	X	-	MVC, EED, RARB, HOXA1, FZD3, RARG, PPP3CA, SOCS6, CSNK1A1, SOS1, SAP30, CAMK2D, SH2B3, PSEN2, NFAT5, BCL2L11, KMT2C, GRB10, TCF7, PPP3CB, NFATC3, NCOA3, ABL2, MAPK8, PRICKLE1, LRP6, CNOT6, SMAD2, PPP3R1, FZD2, FOXO3, HOXA2, MAP3K7, PPP2R5E, ROCK2, NFATC2, KRAS, YY1, TBL1XR1, NOTCH1, WNT7B, TBL1X, KMT2D, NLK, CSNK2A1	(348)
mir-34	-	hsa-miR-34a-5p	X	X	CDK6, ZBTB46	FOSL1, DLL1, LEFT1, NOTCH1, ROCK1, NOTCH2, YY1, DAAM1, JAG1, PRAKCB, KMT2D, PPP3R1, CCND1, RARB, CNOT6, GRAP2, SMAD4, TBL1XR1, WNT1	(284,320)
mir-34	hsa-miR-34b hsa-miR-34c	hsa-miR-34b-5p	X	X	SOCS2, CDK6, EMT1, LAPTM4B, ZBTB46	SIRT1, HDAC1, ZNF281, GABRA3, CREB, DLL1, DKK1, POLR2G, MVC, MAPK10, C2ORF15, MAP3K7, CBL, EP300, FZD5, NCOR1, GRB2, NOTCH1, RBBP5, SKP1, SOCS2, RHOA, RXRA, DAAM1, EGR2, Ccorf15, GSK3B, WNT5B, PPP3R2, HOXD3, HOXB3, RARA, PPP3CA, PRKCA, VANGL1, JAG1, CTNNB1, VANGL2, DAAM2, HEYL, GRB10, BCL2L11, LRP6, NOTCH2, CCND2, WNT7B, PRKX, CNOT6, CTNNB1P1, GOLGA6L9, SH2B3, GOLGA6L9, SMAD4, PRICKLE1, PPP2R5A, RBBP4,	(320,322,349)

Gene family (307–313)	Clustered miRNAs (308,309,313–317)	miRNA	Stemness pathways	Clinical relevance in diagnosis, leukemogenesis, prognosis and treatment	Target genes included in pLSC6 and/or LSC17 (318,319)	Target genes involved in stemness pathways (318,319)	References
mir-34	hsa-mir-34b hsa-mir-34c	hsa-miR-34c-5p	X	X	SOCS2, CDK6, EMPL1, LAPTM4B, ZBTB46	SMAD2, C15orf37, C15orf37, BTRC, POLR2F, GRAP2, UBB, RBBP7, ROCK1, NFAT5, FZD4, KMT2D, CTBP2, NCOA3, RPS27A, EED, PIAS2, NKD1, PKNOX1, PAGR1, SLA, FZD8, PPP2R1A CDK6, DLL1, DKK1, POLR2G, MYC, MAPK10, C2ORF15, MAP3K7, CBL, EP300, FZD5, NCOR1, GRB2, NOTCH1, RBBP5, SKP1, SOCS2, RHOA, RXRA, DAAM1, EGR2, C2orf15, GSK3B, WNT5B, PPP3R2, HOXD3, HOXB3, RARA, PPP3CA, PRKCA, VANGL1, JAG1, CTNNB1, VANGL2, DAAM2, HEYL, GRB10, BCL2L11, LRP6, NOTCH2, CCND2, WNT2B, PRKX, CNOT6, CTNNBIP1, GOLGA6L9, SH2B3, GOLGA6L9, SMAD4, PRICKLE1, PPP2R5A, RBBP4, SMAD2, C15orf37, BTRC, POLR2F, GRAP2, UBB, RBBP7, ROCK1, NFAT5, FZD4, KMT2D, CTBP2, NCOA3, RPS27A, EED, PIAS2, NKD1, PKNOX1, PAGR1, SLA, FZD8, PPP2R1A	(320,322)
mir-126	-	hsa-miR-126-3p	X	X	-	LRP6	(284)
mir-126	-	hsa-miR-126-5p	X	X	-	LRP6	(284)
mir-128	-	hsa-miR-128-3p	X	X	LAPTM4B	PRKX, VANGL1, VANGL2, SOCS6, JAG1, CACYBP, ABL2, DVL2, DTX4, GRB2, WNT3A, CNOT6, PIK3R1, PRICKLE1, DTX1, MAPK10, GSK3B, AXIN1, DKK2, KMT2C, FZD3, RARA, SOS1, PSEN1, NFAT5, SUZ12, LRP6, SFRP1, RXRA, SMAD2, PIK3CA, PAX6	(284,334,350)
mir-132	hsa-mir-212 hsa-mir-132	hsa-miR-132-3p	X	X	SOCS2, DPYSL3	SOCS2, EP300, PPP2R5C, PPP2CB, SMAD2, TCF7L1, DAAM1, NFATC2, SOS1, FOXO3, PPP2R5E, TCF7L2, PPP3CA, MEI51, AKT3, PRICKLE2, GSK3B, PIK3CA, NFAT5, ROCK1, CHD8, NLK, NCOR1	(320,322)
mir-133	hsa-mir-1-2 hsa-mir-133a-1	hsa-miR-133a-3p	X	X	SOCS2	CTBP2, PPP2R5D, KAT2A, PPP2CA, RBBP4, RARB, DAAM2, PPP2CB, CAMK2G, ABL2, MEI51, SOCS2, PSEN1, NFAT5, ARRB1, SENP2	(351,352)

Gene family (307-313)	Clustered miRNAs (308,309,313-317)	miRNA	Stemness pathways	Clinical relevance in diagnosis, leukemogenesis, prognosis and treatment	Target genes included in pLSC6 and/or LSC17 (318,319)	Target genes involved in stemness pathways (318,319)	References
mir-139	-	hsa-miR-139-5p	X	X	SOCS2, CDK6	HOXB2, CAMK2D, JUN, PPP2CA, SOCS2, FZD3, MAPK8, ROCK2, DVL1, PRKCA, ROCK1, PTPRI, NOTCH1, CCND2, CTNNB1, KMT2D, NFAT5	(353,354)
mir-140	-	hsa-miR-140-5p	X	X	-	WNT9A, EGR2, SIAH1, JAG1, NIK, CTCF, NFAT5, SMAD2, PAX6, WNT1, SAPP30	(355)
mir-142	hsa-miR-4736 hsa-miR-142	hsa-miR-142-3p	X	X	-	RAC1, APC, KDM6A, RARG, TBL1X, SKP1, PLCB1, ROCK2, PPP3CA, SOCS6, ABL2, TBL1XR1, MEIS1, PPP3R1, VANGL1	(320,356)
mir-150	-	hsa-miR-150-5p	X	X	-	NOTCH3, SKP1, TP53, EGR2, PSEN1, PRICKLE2, CTNNB1, PPP2CB, EP300, CBL, CSNK1A1, CAMK2G, APC, WNT2B, FZD4, CCND2, PRKCA, ROCK1, NFATC3, AKT3, FBXW11, NOTCH3, GSK3B, ST3GAL6	(357,358)
mir-155	-	hsa-miR-155-5p	X	X	-	CSNK1A1, TCF7L2, KRAS, MEIS1, FOXO3, MAP3K7, PIK3CA, MAFB, CHD8, SOCS6, SLA, CBL, PTPRR1, APC, PIK3R1, GSK3B, SMAD2, NFAT5, SOS1, FZD5	(320,359)
mir-181	hsa-miR-181a-2 hsa-miR-181b-2	hsa-miR-181a-5p	X	X	SOCS2	RBBP7, HOXD1, HOXA1, SLA, KRAS, TCF7L2, BCL2L11, SH2B3, PPP3R1, WNT9A, HOXB4, GRB10, AKT3, TBL1XR1, PRICKLE2, WIF1, EED, YY1, SOS1, SOCS2, NFATC2, SFRP4, TBL1X, CAMK2G, KMT2C, NRAS, SENP2, NFAT5, CSNK1A1, NOTCH2, PPP2R5E, LRP6, NIK, PKNOX1, SMAD2, VANGL1, MAPK8, PBX1	(320,360)
mir-181	hsa-miR-181a-1 hsa-miR-181b-1	hsa-miR-181b-5p	X	X	SOCS2	RBBP7, HOXD1, HOXA1, SLA, KRAS, TCF7L2, BCL2L11, SH2B3, PPP3R1, WNT9A, HOXB4, GRB10, AKT3, TBL1XR1, PRICKLE2, WIF1, EED, YY1, SOS1, SOCS2, NFATC2, SFRP4, TBL1X, CAMK2G, KMT2C, NRAS, SENP2, NFAT5, CSNK1A1, NOTCH2, PPP2R5E, LRP6, NIK, PKNOX1, SMAD2, VANGL1, MAPK8, PBX1	(320,360)
mir-181	hsa-miR-181c hsa-miR-181d	hsa-miR-181c-5p	X	X	SOCS2	RBBP7, HOXD1, HOXA1, SLA, KRAS, TCF7L2, BCL2L11, SH2B3, PPP3R1, WNT9A, HOXB4, GRB10, AKT3, TBL1XR1, PRICKLE2, WIF1, EED, YY1, SOS1, SOCS2, NFATC2, SFRP4, TBL1X, CAMK2G, KMT2C, NRAS, SENP2, NFAT5, CSNK1A1, NOTCH2, CAMK2G, KMT2C, NRAS, SENP2, NFAT5, CSNK1A1, NOTCH2,	(320,360)

Gene family (307–313)	Clustered miRNAs (308,309,313–317)	miRNA	Stemness pathways	Clinical relevance in diagnosis, leukemogenesis, prognosis and treatment	Target genes included in pLSC6 and/or LSC17 (318,319)	Target genes involved in stemness pathways (318,319)	References
mir-183	hsa-mir-183 hsa-mir-96 hsa-mir-182	hsa-miR-183-5p	X	X	-	PPP2R5E, LRP6, NLK, PKNOX1, SMAD2, VANGL1, MAPK8, PBX1 PSEN2, PPP2CA, TCF7L2, PPP2CB, PPP2R5C, LRP6, SMAD4, SOCS6, VANGL1, PRKACB, DAAM1, PRKCA, CAMK2D, NRAS, CBL, CCND2, CSNK2A1, PLCB4	(320,361)
mir-190	-	hsa-miR-190a-5p	X	X	-	SMAD2, CDKN1B, CXXC4, ROCK1, PPP3R1, PAX6, PLCB4, CCND2	(362)
mir-192	hsa-mir-6750 hsa-mir-194-2 hsa-mir-192	hsa-miR-192-5p	X	X	-	YY1, CTNNBIP1, CTCF, PRKACB, NCOA3, NFAT5, CBL	(320,363,364)
mir-193	-	hsa-miR-193a-3p	X	X	CD34	CD34, cKIT, BEX3, KRAS, CCND1, PSEN1, CNOT6, PPP2R5C, SIAH1, CXXC4, TBL1XR1, AJUBA, MAPK10, DAAM2, EED, SKP1	(322)
mir-193	hsa-mir-193b hsa-mir-365a	hsa-miR-193b-3p	X	X	CD34	KRAS, CCND1, PSEN1, CNOT6, PPP2R5C, SIAH1, CXXC4, TBL1XR1, AJUBA, MAPK10, DAAM2, EED, SKP1	(320,365)
mir-194	hsa-mir-194-1 hsa-mir-215	hsa-miR-194-5p	X	X	SOCS2	RBX1, TCF7L2, SOCS2, CAMK2G, AKT2, SOX17, CHD8, RBBP4, DAAM1, ROCK2, KMT2C, CSNK2A1, STAT5B, PPP3R1, NFAT5, RARA, FZD4, FZD5	(320,366)
mir-196	-	hsa-miR-196a-5p	X	X	SOCS2	HOX, NRAS, CDKN1B, HOXB1, SOCS2, ROCK1, POLR2D, PBX1, YY1, PSENE1, CCND2, ABL2, PRICKLE1, MAPK8	(285,320)
mir-196	-	hsa-miR-196b-5p	X	X	SOCS2	HOX, MYC, NRAS, CDKN1B, HOXB1, SOCS2, ROCK1, POLR2D, PBX1, YY1, PSENE1, CCND2, ABL2, PRICKLE1, MAPK8	(285)
mir-199	-	hsa-miR-199a-3p	X	X	-	NLK, PPP2R5E, KDM6A, WNT9A, MAPK8, CHP1, PLCB1, FBXW11, CSNK1A1, ABL2, SUZ12, VANGL1	(320,367)
mir-199	-	hsa-miR-199b-5p	X	X	-	FZD6, GRB10, FZD4, WNT2, CDKN1B, GSK3B, NLK, RBBP4, BTRC, ROCK1, JAG1, WNT7B, CBL, NCOR1, CNOT6, TBL1XR1, MAPK8	(368)
mir-203	hsa-mir-203a hsa-mir-203b	hsa-miR-203a	X	X	ZBTB46	ABL1, BCR::ABL1, DKK2, AKT3, CUL1, MAPK8, PRKCB, SOCS6, SFRP1, PRICKLE2, KMT2C, EP300, APC, AXIN1, HES1, ABL2, WNT2B, MEIS1, PIK3CA, NOTCH2, CSNK1A1, PRKCA, HEYL, HOXD3, CTBP2, MAPK10, NKD1, SOS1, BTRC, NLK, DVL3	(322)

Gene family (307-313)	Clustered miRNAs (308,309,313-317)	miRNA	Stemness pathways	Clinical relevance in leukemogenesis, prognosis and treatment	Target genes included in pLSC6 and/or LSC17 (318,319)	Target genes involved in stemness pathways (318,319)	References
mir-221	hsa-mir-222 hsa-mir-221	hsa-miR-221-3p	X	X	-	CDKN1B, PPP3R1, PIK3R1, SKP1, NLK, TCF7L2, DKK2, CTCF, AXIN2, NFATC3, KMT2C, GRB10, CBL, NFATC2, CHD8, MAPK10, CNOT6, FRAT2, PPP2R5E, BCL2L11, NFAT5, MEIS1	(320,369)
mir-221	hsa-mir-222 hsa-mir-221	hsa-miR-222-3p	X	X	-	CDKN1B, PPP3R1, PIK3R1, SKP1, NLK, TCF7L2, DKK2, CTCF, AXIN2, NFATC3, KMT2C, GRB10, CBL, NFATC2, CHD8, MAPK10, CNOT6, FRAT2, PPP2R5E, BCL2L11, NFAT5, MEIS1	(369)
mir-221	hsa-mir-222 hsa-mir-221	hsa-miR-222-5p	X	-	SOCS2, CD34, C2ORF15, CDK6, C15ORF37, TMEM236, TMEM236	NLK, SOCS2, PPP2R5E, PRKX, AKT3, SFRP4, KDM6A, HOXB2, EP300, PPP3R1, JAG1, GRAP2, NRAS, AJUBA, PTPRJ, ROCK1, CSNK1A1, HOXD4, RBBP4, SH2B3, CACYBP, WNT9B, POLR2D, SOCS6, PPP3CB, CREBBP, PRKCB, MAMML2, PRICKLE1, KRAS, PLCB1, ROCK2, CXXC4, PIK3R1, MAPK8, APC, WNT9A, CAMK2D, ABL2, FZD3, RARA, KMT2C, FZD7, MAP3K7, NOTCH2, SMAD3, C2ORF15, SMAD2, FOXO3, TBL1XR1, PPP2R1B, WNT4, C15ORF37, PRKCA, CAMK2B, CTBP2, FBXW11, WNT5A, UBA52, FZD4, TMEM236, TMEM236, PIK3CA, VANGL1, ARRB1, RBBP5, NCOR1, DVL3, FZD1, PAX6, PPP3CC, PKNOX1, SKP1, FZD8, NKD1, PRKACB, PIAS2, UBC, HEYL, SAP30	(370)
mir-223	-	hsa-miR-223-3p	X	X	-	SIAH1, APC, FOXO3, FZD4, PRKACB, MAFB, SH2B3, RBBP4, KMT2C, PAX6, PKNOX1, EZF1	(283,322,350)
mir-290	hsa-mir-371a hsa-mir-371b hsa-mir-372 hsa-mir-373	hsa-miR-371a-3p	X	X	SOCS2, CDK6	WNT7B, POLR2D, MEIS1, WNT10A, POLR2K, WNT9B, PLCB2, SOCS2, CHP1, NFATC2, GRAP2, WNT2B, DLL1, PPARD, PRKCB, HOXB4, FOXO3, WNT3A, SOS1, NFATC1, PLCB4, PPP2R5C, PPP2CA, PIK3CA, VANGL1, AKT2, PBX1, PIAS2	(292)
mir-290	hsa-mir-371a hsa-mir-371b hsa-mir-372 hsa-mir-373	hsa-miR-372-3p	X	X	-	FZD6, PPP3R1, RBBP7, SMAD2, LEF1, CCND2, FZD3, CCND1, AJUBA, PRKACB, DKK1, HOXB3, ABL2, WNT9B, AKT1, CNOT6, TCF7L1, NCOA3, WNT9A, SUZ12, GAB2, ROCK2, CSNK1A1, BCL2L11, PSEN1, KMT2C, APC, FOXO3	(285)
mir-322	hsa-mir-424 hsa-mir-503 hsa-mir-542	hsa-miR-424-5p	X	X	CDK6, NYNRIN, ZBTB46	WNT3A, WNT7A, AKT3, CCND1, AXIN2, CCND2, DLL1, BTRC, WNT2B, CCND3, SOCS6, MAPK8, RARB, FLT3, ABL2, CHP1, WNT4, FOSL1, PPP2R5C, CTNBP1P1, FZD6, SIAH1, WIF1,	(285,320)

Gene family (307–313)	Clustered miRNAs (308,309,313–317)	miRNA	Stemness pathways	Clinical relevance in diagnosis, leukemogenesis, prognosis and treatment	Target genes included in pLSC6 and/or LSC17 (318,319)	Target genes involved in stemness pathways (318,319)	References
	hsa-mir-450a-2 hsa-mir-450a-1 hsa-mir-450b					LRP6, SMAD3, NKD1, EED, PIAS2, WNT10B, PIK3R1, FZD4, PPP2R1A, NOTCH2, PTPRJ, GRB10, HOXA3, KMT2D, NFATC3, KRAS, TBL1XR1, NFATC2, ROCK1, PPP2R1B, KMT2C, APC, SUZ12, ROCK2, GSK3B	
mir-331	hsa-mir-331 hsa-mir-3685	hsa-mir-331-5p	X	X	SOCS2, CDK6, EMP1	KRAS, RBX1, POLR2K, C1orf220, SOCS2, PTPRJ, RHOA, DKK1, NRAS, WIF1, HOXB3, GOLGA6L9, LRP6, GOLGA6L9, C1ORF220, ABL2, PPP3R2, TP53, SMAD3, SMAD2, SH2B3, PPP2R5E, WNT3, CBL, PPP2R5C, ROCK1, SMAD4, HOXD3, CCND2, CTBP2, SENP2, KMT2D, NFATC2, PRKCB, NKD1, FOXO3, SOS1, CDKN1B, VANGL1, PAX6, FZD5, DVL3, FZD8, HEYL, PPP2R1A, SAP30, NOTCH2, PIAS2, APC	(285,371)
mir-342	hsa-mir-151b hsa-mir-342	hsa-mir-342-3p	X	X	CDK6	EP300, CTBP2, CSK, AKT2, PPP2R5E, KMT2D, FZD5	(372)
mir-373	hsa-mir-371a hsa-mir-371b hsa-mir-372 hsa-mir-373	hsa-mir-373-3p	X	X	-	FZD6, PPP3R1, RBBP7, SMAD2, LEF1, CCND2, FZD3, CCND1, AJUBA, PRKACB, DKK1, HOXB3, ABL2, WNT9B, AKT1, CNOT6, TCF7L1, NCOA3, WNT9A, SUZ12, GAB2, ROCK2, CSNK1A1, BCL2L11, PSEN1, KMT2C, APC, FOXO3	(373)
mir-425	hsa-mir-191 hsa-mir-425	hsa-mir-425-3p	X	X	-	RAC1, PRKCG, CSNK2A2, NFATC2, WNT7B, PBX1, FZD3, CCND2, APC, NOTCH2, WNT2B, PLCB1, WNT7A, CAMK2D, TBL1X, ARRB1, PIK3CA, AKT1, RBX1, PPP2R1A	(285,320)
mir-425	hsa-mir-191 hsa-mir-425	hsa-mir-425-5p	X	X	-	MEIS1, PPP2CB, CBL, FZD4, SMAD2, PPP3CA	(285)
mir-449	hsa-mir-449c hsa-mir-449b hsa-mir-449a	hsa-mir-449a	X	X	CDK6, ZBTB46	FOSL1, DLL1, LEF1, NOTCH1, ROCK1, NOTCH2, YY1, DAAM1, JAG1, PRKACB, KMT2D, PPP3R1, CCND1, RARB, CNOT6, GRAP2, SMAD4, TBL1XR1, WNT1	(349)
mir-449	hsa-mir-449c hsa-mir-449b hsa-mir-449a	hsa-mir-449b-5p	X	X	CDK6, ZBTB46	FOSL1, DLL1, LEF1, NOTCH1, ROCK1, NOTCH2, YY1, DAAM1, JAG1, PRKACB, KMT2D, PPP3R1, CCND1, RARB, CNOT6, GRAP2, SMAD4, TBL1XR1, WNT1	(349)
mir-450	hsa-mir-424 hsa-mir-503 hsa-mir-542	hsa-mir-450a-5p		X	-	-	(285)

Gene family (307-313)	Clustered miRNAs (308, 309, 313-317)	miRNA	Stemness pathways	Clinical relevance in diagnosis, leukemogenesis, prognosis and treatment	Target genes included in pLSC6 and/or LSC17 (318,319)	Target genes involved in stemness pathways (318,319)	References
	hsa-mir-450a-2 hsa-mir-450a-1 hsa-mir-450b						
mir-451	hsa-mir-4732 hsa-mir-144 hsa-mir-451b hsa-mir-451a	hsa-mir-451a	X	X	-	PRICKLE2	(374)
mir-542	hsa-mir-424 hsa-mir-503 hsa-mir-542 hsa-mir-450a-2 hsa-mir-450a-1 hsa-mir-450b	hsa-mir-542-5p	X	X	SOCS2	HOXD3, TCF7L2, TCF7L1, WNT9A, SOCS2, PRKACA, CUL1, FZD10, TBL1X, CSNK2A2, WNT10A, WNT7B, CCND3, DAAM1, PRKCA, BTRC, ABL2, NOTCH1, PBX1, GRAP2, PPP2R1A, NCOR1	(285)
mir-545	hsa-mir-374a hsa-mir-545	hsa-mir-545-3p	X	X	CD34, CDK6, EMP1, LAPTM4B, NYNRIN, ARHGAP22, ZBTB46	CAMK2D, MAP3K7, ABL2, FZD6, RBX1, PPP3R2, CHP2, MAPK8, TP53, PIAS2, FZD10, PTPN11, VANGL1, HOXD4, WNT7A, NRAS, CSNK1E, FZD3, SMAD4, PRKX, GRB2, FOXO3, CSNK1A1L, PSEN1, SOCS6, TBL1X, NFATC1, TCF7L2, RARG, CTNNB1, PIK3R1, CSNK1A1, NCOR1, PPP3R1, CCND1, PRKCA, LRP6, HOXD1, WNT9B, LFNG, POLR2D, PPP3CA, NCOA3, CBL, CAMK2B, PLCB1, RBBP4, FZD4, HDAC3, CTNNBIP1, CAMK2G, RBBP5, CCND3, SYK, CXXC4, HOXD3, ROCK2, PCGF2, PTPRJ, DKK2, WNT5A, TMEM236, HOXA1, TMEM236, PRCB, NFATC4, ROCK1, MAFB, UBB, AKT3, TBL1XR1, SMAD2, CTBP2, PPARD, YY1, BCL2L11, CAMK2A, FRAT2, GRB10, PLCB3, FZD2, MAPK9, NLK, ARRB1, VANGL2, TCF7L1, KMT2D, GAB2, WNT5B, PPP3CB, SMAD3, PRICKLE2, BTRC, KRAS, NKD1, NFAT5, JAG1, NFATC2, STASB, CNOT6, NOTCH2, AKT1, PPP2CA, SKP1, GRAP2, FZD8, SAP30, PBX1, HOXB4, HEYL	(285)
mir-708	-	hsa-mir-708-5p	X	X	-	HOXB3, RARG, NRAS, GSK3B, FOXO3, RBBP5, CBL	(285)

Gene family (307–313)	Clustered miRNAs (308,309,313–317)	miRNA	Stemness pathways	Clinical relevance in diagnosis, leukemogenesis, prognosis and treatment	Target genes included in pLSC6 and/or LSC17 (318,319)	Target genes involved in stemness pathways (318,319)	References
mir-1290	-	hsa-miR-1290		X	SOCS2, CD34, CDK6, EMP1, DPYSL3	CER1, FZD3, GSK3B, CTBP1, CAMK2A, NRAS, CAMK2D, RBBP4, CSNK2A1, SFRP4, FBXW11, WNT7A, PIK3CA, RUVBL1, PLCB1, SMAD3, NFAT5, WNT7B, DVL3, CDKN1B, PPP3CB, HOXD1, CXXC4, PRKX, SOCS2, FOSL1, KRAS, MAP3K7, NKD1, LRP6, PAX6, PRKCB, KMT2D, AXIN2, CREBBP, PRKACA, SOS1, PPP3R1, SUZ12, TCF7, NCOR1, VANGL2, SLA2, NFATC2, FZD4, GAB2, AKT3, PTPRJ, SMAD4, PLCB4, NOTCH3, NOTCH1, HES1, CNOT6, WNT5A, C1ORF220, C1orf220, PRICKLE2, WNT4, NOTCH2, PSEN1, NLK, CACYBP, SKP1, C15ORF37, C15orf37, LEF1, FZD5, SMAD2, AIUBA, PPP3CC, RBBP5, CSNK1A1, POLR2E, PKNOX1, UBC, HEYL, PPP2R1A	(375)

Taula 22: Llistat de les seqüències dels miRNAs i els controls inclosos en la placa de RT-PCR quantitativa.

<i>Nom del miRNA</i>	<i>Seqüència diana</i>	<i>LNA™ PCR primer set, Número de producte</i>
hsa-let-7a-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	205727
hsa-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGUU	204750
hsa-let-7c-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGUU	204767
hsa-let-7d-5p	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU	204124
hsa-miR-140-5p	CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG	204540
hsa-miR-545-3p	UCAGCAAACAUUUUUGUGUGC	206087
hsa-let-7g-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU	204565
hsa-let-7i-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUU	204394
hsa-miR-181c-5p	AACAUUCAACCCUGUCGGUGAGU	204683
hsa-miR-100-5p	AACCCGUAGAUCCGAACUUGUG	205689
hsa-let-7f-5p	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	204359
UniSp3 IPC		n/a
hsa-miR-193a-3p	AACUGGCCUACAAAGUCCCAGU	204591
hsa-miR-342-3p	UCUCACACAGAAUUCGCACCCGU	205625
hsa-miR-132-3p	UACAGUCUACAGCCAUGGUCG	206035
hsa-miR-222-3p	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	204551
hsa-miR-222-5p	CUCAGUAGCCAGUGAGAUCU	204314
hsa-miR-542-5p	UCGGGAUCAUCAUGUCACGAGA	204198
hsa-miR-194-5p	UGUAAACAGCAACUCCAUGUGGA	204080
hsa-miR-125b-5p	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA	205713
hsa-miR-126-3p	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG	204227
hsa-miR-141-3p	UACACUGUCUGGUAAGAUGG	204504
hsa-miR-193b-3p	AACUGGCCCUCAAAGUCCCGCU	204226
UniSp6 CP		n/a
hsa-miR-10b-5p	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG	205637
hsa-miR-128-3p	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU	205995
hsa-miR-449a	UGGCAGUGUAUUGUAGCUGGU	204481
hsa-miR-371a-3p	AAGUGCCGCAUCUUUUGAGUGU	204299
hsa-miR-151a-5p	UCGAGGAGCUCACAGUCUAGU	204007
hsa-miR-16-5p	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	205702
hsa-miR-26a-5p	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	206023
hsa-miR-150-5p	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG	204660
hsa-miR-155-5p	UUAAUGCUAAUUGGUAUAGGGGU	204308
hsa-miR-15a-5p	UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG	204066
hsa-miR-15b-5p	UAGCAGCACAUCAUGGUUACA	204243
UniSp3 IPC		n/a
hsa-miR-196b-5p	UAGGUAGUUUCCUGUUGUUGGG	204555
hsa-miR-17-5p	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	204771
hsa-miR-181a-5p	AACAUUCAACGUCUGCGGUGAGU	206081
hsa-miR-181b-5p	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU	204530
hsa-miR-372-3p	AAAGUGCUGCGACAUUUGAGCGU	204137
hsa-miR-133a-3p	UUUGGUCCCUUCAACCAGCUG	204788
hsa-miR-373-3p	GAAGUGCUUCGAUUUUGGGGUGU	204604
hsa-miR-199b-5p	CCCAGUGUUUAGACUAUCUGUUC	204152
hsa-miR-18a-5p	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG	204207
hsa-miR-191-5p	CAACGGAAUCCAAAAGCAGCUG	204306
hsa-miR-708-5p	AAGGAGCUUACAAUCUAGCUGGG	204490
U6 snARN		203907
hsa-miR-199a-3p	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA	204536
hsa-miR-195-5p	UAGCAGCACAGAAUAUUGGC	205869
hsa-miR-196a-5p	UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGG	204386
hsa-miR-19a-3p	UGUGCAAUCUAUGCAAACUGA	205862
hsa-miR-19b-3p	UGUGCAAUCUAUGCAAACUGA	204450
hsa-miR-20a-5p	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG	204292
hsa-miR-200b-3p	UAAUACUGCCUGGUAUUGAUGA	206071
hsa-miR-200c-3p	UAAUACUGCCGGUAUUGAUGGA	204482
hsa-miR-30a-5p	UGUAAACAUCUCGACUGGAAG	205695
hsa-miR-10a-5p	UACCCUGUAGAUCGAAUUUGUG	204778

<i>Nom del miRNA</i>	<i>Seqüència diana</i>	<i>LNA™ PCR primer set, Número de producte</i>
hsa-miR-17-3p	ACUGCAGUGAAGGCACUUGUAG	206008
hsa-miR-425-5p	AAUGACACGAUCACUCCCGUUGA	204337
hsa-miR-1290	UGGAUUUUUGGAUCAGGGA	2118634
hsa-miR-20b-5p	CAAAGUGCUCAUAGUGCAGGUAG	204755
hsa-miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	204230
hsa-miR-451a	AAACCGUUACCAUUCUGAGUU	204734
hsa-miR-126-5p	CAUUUUUUUUUGGUACGCG	206010
hsa-miR-30e-5p	UGUAAACAUCUUUGACUGGAAG	204714
hsa-miR-92a-3p	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU	204258
hsa-miR-425-3p	AUCGGGAAUGUCGUGUCCGCC	204038
hsa-miR-221-3p	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC	204532
hsa-miR-139-5p	UCUACAGUGCACGUGUCUCCAGU	205874
hsa-miR-223-3p	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA	205986
hsa-miR-449b-5p	AGGCAGUGUAUUGUUAGCUGGC	204751
hsa-miR-203a	GUGAAAUGUUUJAGGACCACUAG	205914
hsa-miR-24-3p	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	204260
hsa-miR-10a-3p	CAAUUUCGUAUCUAGGGGAAUA	205688
hsa-miR-34c-5p	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC	205659
hsa-miR-331-5p	CUAGGUAUGGUCCAGGGAUCC	204423
hsa-miR-30b-5p	UGUAAACAUCUACACUCAGCU	204765
hsa-miR-183-5p	UAUGGCACUGGUAGAAUUCACU	206030
hsa-miR-29a-3p	UAGCACCAUCUGAAUUCGGUUA	204698
hsa-miR-29b-3p	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	204679
hsa-miR-29c-3p	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA	204729
hsa-miR-22-3p	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU	204606
hsa-miR-34b-5p	UAGGCAGUGUCAUUAGCUGAUUG	204424
hsa-miR-190a-5p	UGAUAUGUUUGAUUAUUAGGU	204763
hsa-miR-34a-5p	UGGCAGUGUCUUGCUGGUUGU	204486
hsa-miR-450a-5p	UUUUUGCGAUGUGUUCUAAUUAU	206085
hsa-miR-142-3p	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA	204291
hsa-miR-9-5p	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	204513
hsa-let-7e-5p	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU	205711
hsa-miR-92b-3p	UAUUGCACUCGUCCCGGCCUCC	204384
hsa-miR-424-5p	CAGCAGCAAUUCUAGUUUUGAA	204736
hsa-miR-99a-5p	AACCCGUAGAUCCGAUCUUGUG	204521
hsa-miR-192-5p	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	204099
hsa-miR-103a-3p	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	204063
hsa-miR-103a-3p	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	204063

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	hsa:let-7a-5p	hsa:let-7b-5p	hsa:let-7c-5p	hsa:let-7d-5p	hsa-miR-140-5p	hsa-miR-545-3p	hsa:let-7g-5p	hsa:let-7i-5p	hsa-miR-181c-5p	hsa-miR-100-5p	hsa:let-7f-5p	UNS03 IPC
B	hsa-miR-193a-3p	hsa-miR-342-3p	hsa-miR-132-3p	hsa-miR-222-3p	hsa-miR-222-5p	hsa-miR-542-5p	hsa-miR-194-5p	hsa-miR-125b-5p	hsa-miR-126-3p	hsa-miR-141-3p	hsa-miR-193b-3p	UNS06 CP
C	hsa-miR-10b-5p	hsa-miR-128-3p	hsa-miR-443a	hsa-miR-371a-3p	hsa-miR-151a-5p	hsa-miR-116-5p	hsa-miR-28a-5p	hsa-miR-150-5p	hsa-miR-155-5p	hsa-miR-15a-5p	hsa-miR-15b-5p	UNS03 IPC
D	hsa-miR-196b-5p	hsa-miR-17-5p	hsa-miR-181a-5p	hsa-miR-181b-5p	hsa-miR-372-3p	hsa-miR-133a-3p	hsa-miR-373-3p	hsa-miR-199b-5p	hsa-miR-18a-5p	hsa-miR-191-5p	hsa-miR-708-5p	U6 snRNA
E	hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-195-5p	hsa-miR-196a-5p	hsa-miR-19a-3p	hsa-miR-19b-3p	hsa-miR-20a-5p	hsa-miR-200b-3p	hsa-miR-200c-3p	hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-10a-5p	hsa-miR-17-3p	hsa-miR-425-5p
F	hsa-miR-1290	hsa-miR-200b-5p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-451a	hsa-miR-126-5p	hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-92a-3p	hsa-miR-425-3p	hsa-miR-221-3p	hsa-miR-139-5p	hsa-miR-223-3p	hsa-miR-449b-5p
G	hsa-miR-203a	hsa-miR-24-3p	hsa-miR-10a-3p	hsa-miR-34c-5p	hsa-miR-331-5p	hsa-miR-30b-5p	hsa-miR-183-5p	hsa-miR-29a-3p	hsa-miR-290-3p	hsa-miR-29c-3p	hsa-miR-22-3p	hsa-miR-34b-5p
H	hsa-miR-190a-5p	hsa-miR-34a-5p	hsa-miR-450a-5p	hsa-miR-142-3p	hsa-miR-9-5p	hsa:let-7e-5p	hsa-miR-92b-3p	hsa-miR-424-5p	hsa-miR-99a-5p	hsa-miR-192-5p	hsa-miR-103a-3p	hsa-miR-103a-3p

Figura 27: Disseny de la placa de miRNAs.

1.3 Extracció d'àcids nucleics, transcripció reversa i PCR quantitativa:

Pel diagnòstic molecular i posterior estudis van emprar-se mostres de moll d'os i sang perifèrica obtingudes al diagnòstic.

La separació de cèl·lules mononucleades va fer-se mitjançant un gradient de densitat amb Ficoll-Hypaque (Sigma, St Louis MO, USA). Per a l'extracció de RNA es va utilitzar TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) i Direct-zol ARN MiniPrep (Zymo Research, Califòrnia, CA, USA).

La síntesi de DNA complementari (cDNA) es va fer a partir de 10 ng total de RNA mitjançant el miRCURY LNA™ Universal RT microRNAPCR kit (Bionova científica, Madrid, Spain) i la RT-qPCR en un termociclador LigthCycler 480 (Roche, Basel, Switzerland) amb l'ús de SybrGreen Master Mix (Roche, Basel, Switzerland), seguint les instruccions del proveïdor.

1.4 Anàlisi d'expressió:

1.4.1 Normalització de les dades crues:

Mitjançant la RT-qPCR es van obtenir els valors quantitius de l'expressió dels miRNAs. Els valors de Ct (*Cycle Threshold*) superiors a 35 es van considerar negatius i es van censurar a un valor de Ct de 45. Els valors de Ct crus es van normalitzar utilitzant el control interplaca (*interplate control*, IPC), restant la mitjana global de l'IPC de la mitjana de l'IPC de cada mostra i obtenint així els valors de Ct normalitzats (CTnorm).

D'altra banda, per seleccionar un control endogen de referència es va calcular la desviació estàndard (DE) dels valors CTnorm dels possibles controls endògens de referència: U6 snARN, hsa-miR-191-5p i hsa-miR-103a-3p. Vam escollir el miRNA hsa-miR-191-5p com a control endogen ja que era el miRNA amb una DE menor (DE=2.192) (Figura 28).

1.4.2 Anàlisis no supervisades:

Els valors de Delta CT (Δ CT) es van obtenir calculant per a cada mostra la diferència entre els valors CTnorm del miRNA hsa-miR-191-5p endogen i els valors CTnorm dels miRNAs.

L'estudi no supervisat *Hierarchical cluster analysis* (HCA) dels valors del ΔCT dels miRNAs es va realitzar utilitzant la funció *heatmap.2* del paquet *gplots* de *R/Bioconductor*. Es va utilitzar la distància euclidiana per obtenir la matriu de distàncies i el mètode d'aglomeració completa per crear els clústers.

Els dendrogrames d'agrupació jeràrquica no supervisats es van dividir en clústers utilitzant la funció *cutree* del paquet *stats* de *R/Bioconductor*. L'anàlisi de components principals (*principal component analysis*, PCA) es va realitzar aplicant la funció *prcomp* del paquet *stats* de *R/Bioconductor* als valors ΔCT i es va representar utilitzant el paquet *Plotly*.

1.4.3 Estudis supervisats:

Els valors d'expressió relativa ($\Delta\Delta\text{CT}$) es van calcular utilitzant el mètode de *global mean* de les mostres de leucèmia com a calibrador i es van representar com a *heatmap* amb agrupació jeràrquica. Les diferències d'expressió ($\Delta\Delta\text{CT}$) entre els subgrups d'interès es van calcular mitjançant la funció *lmFit* del paquet *limma* *R*. Es va utilitzar el mètode de *false discovery rate* (FDR) per ajustar els valors de *p* amb un llindar de 0.05 (376). Per calcular les diferències d'expressió entre múltiples subgrups d'interès es va aplicar la funció *aov ANOVA* del paquet estadístic *R* v3.3-1 (377).

1.5 Anàlisi de les vies en les que participen els miRNAs estudiats:

El *heatmap* per entendre la funció dels miRNAs i les vies en les quals es troben implicats es va realitzar mitjançant el servidor web *DIANA-mirPath v3.0*. El servidor identifica totes les vies en les que els miRNAs seleccionats es troben implicats de forma significativa, realitza una anàlisi d'enriquiment i estima els nivells de significació (*p*-valors) entre cada miRNA i cada via. Posteriorment, s'extrau un valor *p* fusionat per a cada via combinant els nivells de significació prèviament calculats utilitzant el mètode de meta-anàlisi de Fisher. El valor *p* resultant representa 1 menys la probabilitat que les vies examinades s'enriqueixin significativament en gens diana per almenys un dels miRNAs seleccionats. Els valors *p* combinats indiquen si una via concreta és diana d'almenys un miRNA del grup seleccionat inicialment (378).

1.6 Predicció de dianes de miRNAs:

Les dianes dels miRNAs d'interès es van identificar utilitzant la base de dades TargetScan V8.0 (<http://www.targetscan.org/>). Aquest recurs permet predir les dianes biològiques de miRNAs buscant llocs d'unió complementaris de miRNAs seleccionats (318,319).

1.7 Cohort de validació

Per tal de validar els resultats obtinguts, es van extraure dades del programa *Therapeutically applicable research to generate effective treatments* (TARGET) (<https://target-data.nci.nih.gov/>), phs000218. Les dades utilitzades per l'anàlisi es poden trobar a <https://portal.gdc.cancer.gov/projects>. Es van utilitzar les dades d'informació clínica, dades de miRNA-Seq i dades d'expressió gènica estudiada per *microarrays* dels pacients amb LMA del repositori.

Per a les dades de miRNA-Seq vam agrupar les lectures per milió de la firma de miRNAs a partir de 447 mostres de pacients amb LMA. Vàrem excloure 312 pacients per la falta de dades de supervivència i els pacients majors de 19 anys. A continuació, vam aplicar la transformació $\log_2(1+\text{lectures per milió})$ a les dades de miRNA-Seq. L'agrupació jeràrquica no supervisada de les dades transformades de miRNAs es va realitzar utilitzant la funció *heatmap.2* del paquet *gplots* de *R/Bioconductor*. La distància d'Euclides es va utilitzar per a obtenir la matriu de distància i el mètode d'aglomeració completa per a l'agrupació. Posteriorment, el dendrograma d'agrupament jeràrquic no supervisat es va dividir en dos grups utilitzant la funció *cutree* del paquet d'estadístiques de *R/Bioconductor*. Finalment, vam realitzar l'anàlisi de supervivència mitjançant Kaplan-Meier dels dos clústers obtinguts a partir de la funció *cutree* utilitzant les funcions *Surv* i *survfit* del paquet *R* de supervivència v3.3-1 (377).

Pel que fa a les dades de *microarrays* d'expressió gènica, vam extreure els valors d'expressió gènica normalitzats per *robust multiarray average* (RMA) (TARGET_AML_RMA_norm_GE_level2.txt) de la signatura d'expressió gènica dels pacients amb LMA. Vam realitzar una correlació de Pearson entre l'expressió de miRNAs obtinguda per miRNA-Seq i l'expressió de l'RNAm obtinguda per *microarrays* d'expressió dels 64 pacients seleccionats amb dades aparellades. També vam calcular el *pediatric*

leukemic stem cell score (pLSC6) (161) per a avaluar la capacitat predictiva del model proposat que integra la informació del pLSC6 i el perfil de miRNAs (descriu als mètodes estadístics de l'estudi d'Elsayed et al, 2020).

1.8 Anàlisis estadístiques

Les variables quantitatives es van descriure mitjançant la mediana, el mínim i el màxim. Les variables qualitatives es van descriure amb freqüències absolutes i percentatges. L'associació entre variables quantitatives es va avaluar mitjançant la correlació d'Spearman. Per comparar les variables quantitatives entre els dos grups es va utilitzar la prova de Mann-Whitney. Per comparar les variables qualitatives entre grups es va utilitzar el test de Fisher o el de Chi-quadrat, segons si complien les condicions d'aplicabilitat d'aquest últim. La SLE es va definir com el temps en anys transcorreguts des del diagnòstic fins el primer esdeveniment d'interès (recaiguda o mort) o, si no es va produir cap esdeveniment, fins l'últim seguiment. La SG es va definir com el temps en anys des del diagnòstic fins la mort o l'últim registre. Els pacients sense esdeveniments es van censurar per la dreta. La supervivència es va avaluar amb l'estimador Kaplan-Meier (379), i les corbes de supervivència es van comparar entre els grups mitjançant la prova de log-rank (380). Es van utilitzar models de risc proporcional de Cox (381) per a realitzar les anàlisis de supervivència univariants i multivariants. A partir d'aquests models es van derivar els *Hazard ratio* (HR) i els seus corresponents intervals de confiança (IC). Només es van incloure en l'anàlisi multivariant les variables estadísticament significatives en l'anàlisi univariant. En els casos en el que els models de Cox no es van poder ajustar degut a l'absència d'esdeveniments en un dels grups es va aplicar la correcció de Firth (382).

Per tal d'estudiar la influència dels miRNAs en la supervivència de manera individual, a més dels models de Cox, es va realitzar una estimació del punt de tall que millor discriminava els grups de pacients segons els nivells d'expressió de cada miRNA i la seva supervivència. Així, aquesta estimació permetia dividir-los segons si presentaven una alta o baixa expressió del miRNA analitzat i determinar si aquest definia el pronòstic dels diferents grups de pacients. Per a estimar el punt de tall es va emprar el mètode Contal i O'Quigley (383).

Es va utilitzar el C-índex (384) per a avaluar la capacitat predictiva de les variables proposades individualment i en combinació. Es van utilitzar *recursive-partitioning Cox regression models* per a la SLE amb la finalitat de trobar un llindar òptim per calcular el pLSC6 (161). Quan es van realitzar comparacions múltiples, es va utilitzar el mètode d'Holm (385) per ajustar els p-valors.

Totes les anàlisis es van realitzar amb el programa informàtic *R*, versió 4.2.1 (386). Tots els valors de p inferiors a 0.05 es van considerar estadísticament significatius.

1.9 Aspectes ètics

Aquest estudi ha seguit els estàndards ètics i la Declaració de Helsinki segons les recomanacions de les guies nacionals i internacionals; a més, l'estudi ha rebut l'aprovació del Comitè d'Ètica de la nostra institució. Totes les mostres s'han emmagatzemat degudament en el Biobanc de l'hospital després d'obtenir la signatura del consentiment informat per part dels pacients, pares o tutors legals.

2 Material i mètodes del treball addicional

Determinar el perfil d'expressió dels gens PPPIR-27, CCL23, SCUBE1, PHACTR3 i NRG4 en pacients pediàtrics amb leucèmia aguda.

2.1 Pacients i controls:

Es tracta d'un estudi retrospectiu enfocat en pacients amb reordenament de *KMT2A*, en el que es va reunir una cohort de 57 pacients pediàtrics (0-18 anys) diagnosticats de leucèmia aguda i 10 controls pediàtrics amb patologia no neoplàsica.

La majoria dels pacients amb leucèmia aguda van ser diagnosticats i tractats a l'HSJD. Donada la baixa freqüència dels reordenaments de *KMT2A*, altres centres van aportar mostres d'aquests pacients: Hospital Universitari Vall d'Hebron, Hospital Universitari Parc Taulí, Hospital Universitario de Cruces, Hospital Universitari Son Espases, Hospital Universitario Miguel Servet i Hospital Materno-Infantil de Málaga. El diagnòstic es va realitzar mitjançant estudi morfològic, genètic, molecular i de citometria de flux multiparamètrica (panells de 4 i 8 colors). Els pacients es van tractar segons el tipus de leucèmia amb els mateixos protocols esmentats en el treball I.

La cohort del treball addicional inclou 57 pacients, 29 diagnosticats de LMA i 28 de LLA (25 pacients amb LLA-B i 3 pacients amb LLA-T). Quaranta dels 57 pacients estudiats presentaven reordenaments confirmats del gen *KMT2A*, amb representació de tots els llinatges (Taula 23).

Taula 23: Principals característiques clínico-biològiques al diagnòstic dels pacients de la cohort d'estudi del treball addicional.

	<i>Total no. (%)</i> <i>67 (100%)</i>
Tipus de mostra (n=67)	
Controls no neoplàsics	10 (15%)
Leucèmia aguda	57 (85%)
Sexe (n=52)	
Femení	15 (28,8%)
Masculí	37 (71,%)
Edat, anys (n=52)	
Mediana [rang]	3,0 [0,0-16,2]
< 1 any	16 (30,8%)
1-9 anys	23 (44,2%)
≥ 10 anys	13 (25%)

	Total no. (%) 67 (100%)
Recòmpte leucocitari, x10⁹/L, mediana [rang] (n=51)	29,5 [0,6-826,0]
Infiltració del SNC (n=51)	
SNC-1	34 (66,7%)
SNC-2	6 (11,8%)
SNC-3	10 (19,6%)
No realitzada avaluació	5 (8,8%)
Llinatge (n=57)	
LLA-B	25 (43,8%)
LLA-T	3 (5,2%)
LMA	29 (51%)
Categoria molecular (n=57)	
<u>LLA-B (n=25)</u>	
Alta hiperdiploïdia	2 (8%)
t(1;19)(q23;p13) <i>TCF3::PBX1</i>	1 (4%)
<i>KMT2A</i> reordenat	19 (76%)
<i>iAMP21</i>	2 (8%)
<i>B-other</i>	1 (4%)
<u>LLA-T (n=3)</u>	
LLA-T no definides en altres grups	1 (33,4%)
<i>KMT2A</i> reordenat	2 (66,6%)
<u>LMA (n=29)</u>	
LMA CBF	2 (6,9%)
t(15;17)(q22;q12) <i>PML::RARA</i>	2 (6,9%)
<i>KMT2A</i> reordenat	19 (65,5%)
LMA no definides en altre grups	6 (20,7%)
<i>KMT2A</i> partner (n=40)	
<u>LLA-B (n=19)</u>	
<i>AFF1</i>	9 (47,4%)
<i>MLLT3</i>	2 (10,6%)
<i>MLLT1</i>	1 (5,3%)
Altres <i>partners</i>	4 (21%)
<i>Partner</i> desconegut*	3 (15,7%)
<u>LLA-T (n=2)</u>	
<i>MLLT1</i>	1 (50,0%)
<i>Partner</i> desconegut*	1 (50,0%)
<u>LMA (n=19)</u>	
<i>MLLT3</i>	10 (52,6%)
<i>ABI1</i>	1 (5,3%)
<i>MLLT10</i>	3 (15,8%)
<i>ELL1</i>	2 (10,5%)
Altres <i>partners</i>	1 (5,3%)
<i>Partner</i> desconegut*	2 (10,5%)
Protocol terapèutic (n=57)	
<u>LMA (n=29)</u>	
PETHEMA LPA 2005/2012	2 (6,9%)
SHOP AML 2001/2007	16 (55,2%)
NOPHO-DBH AML 2012	8 (27,5%)
LANL 2002	2 (6,9%)
Altres	1 (3,5%)
<u>LLA (n=28)</u>	
SEHOP-PETHEMA 2013	8 (28,6%)
SHOP 1999/2005	9 (32,1%)
INTERFANT-06/99	4 (14,3%)
SHOP 2001	2 (7,1%)

	Total no. (%) 67 (100%)
Desconegut	5 (17,9%)
SLE (n=51)	
Als 5 anys (95% IC)	61,3% (49,0%-76,7%)
SG (n=51)	
Als 5 anys (95% IC)	78,3% (67,7%-90,5%)

LLA-B: leucèmia limfoblàstica aguda B. LLA-T: leucèmia limfoblàstica aguda T. LMA: leucèmia mieloide aguda. SLE: supervivència lliure d'esdeveniment. SG: supervivència global. IC: interval de confiança. *Altres reordenaments de *KMT2A* amb *partners* desconegut (reordenaments de *KMT2A* confirmats per FISH).

2.2 Elecció dels gens estudiats:

Es van seleccionar els gens descrits per Lagacé *et al.* amb possible associació amb reordenaments de *KMT2A* (*PPPIR-27*, *CCL23*, *SCUBE1*, *PHACTR3* i *NRG4*). L'estudi es va fer mitjançant els reactius comercials TaqMan® Gene Expression Assays *PPPIR-27* (Hs_01062327m1), *CCL23* (Hs_00270756m1), *SCUBE1* (Hs_00542698m1), *PHACTR3* (Hs_00294903m1) i *NRG4* (Hs_00414766m1) (Applied Biosystems, Califrona, USA).

2.3 Extracció d'àcids nucleics, transcripció reversa i RT-PCR quantitativa:

Van emprar-se mostres de moll d'os i sang perifèrica amb >70% d'infiltració per blasts obtingudes al diagnòstic. La separació de cèl·lules mononucleades va fer-se mitjançant un gradient de densitat amb Ficoll-Hypaque (Sigma, St Louis MO, USA). Per a l'extracció de RNA es va utilitzar TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) i Direct-zol ARN MiniPrep (Zymo Research, Califòrnia, CA, USA). La síntesi del cDNA es va fer a partir de 50-100 ng totals d'RNA amb el Qiagen Quantitect Whole Transcriptome cDNA kit (Qiagen, Hilden, Alemanya), seguint les instruccions del proveïdor. La RT-qPCR es va realitzar en un termociclador ABI7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, California, CA, USA).

2.4 Anàlisi d'expressió:

Mitjançant la RT-qPCR es va obtenir la quantificació dels nivells d'expressió d'RNA missatger. Els valors de Ct superiors a 37 es van considerar negatius. La quantificació relativa es va calcular mitjançant el mètode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilitzant el gen β -*glucuronidase* (*GUS*) com a control endogen. Com a calibrador de les dades es va utilitzar la *global mean*

d'expressió de totes les mostres leucèmiques per a cada gen. A més, també es va dur a terme la quantificació de l'expressió gènica dels diferents gens en mostres de 10 controls no-neoplàsics.

2.5 Anàlisis estadístiques:

L'anàlisi dels resultats es va dur a terme amb els programes informàtics SPSS 24.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, IL, USA), R software versió 4.2.1 (www.R-project.org) (386) i el programa GraphPad Prism versió 7.00 (GraphPad Software, Califòrnia, CA, USA).

Es van emprar els valors normalitzats amb el \log_2 per a una millor representació gràfica.

Les variables quantitatives es descriuen amb la mediana, el mínim i el màxim. Les variables qualitatives es descriuen amb les freqüències absolutes i els percentatges.

En l'anàlisi d'expressió de les mostres vam considerar diferents aproximacions, tant qualitatives com quantitatives. Per a la classificació qualitativa vam categoritzar els pacients en dos grups: aquells que no expressaven un determinat gen (0 = no expressió) en contraposició als pacients que expressaven aquest gen (1 = qualsevol tipus d'expressió). A més, vam analitzar de forma quantitativa aquells pacients amb expressió de cada gen, incloent únicament aquells pacients amb nivells d'expressió quantificables ($Ct < 37$).

Per a avaluar l'associació entre dues variables qualitatives es va utilitzar el test de Fisher o el Chi-quadrat, segons si es complien les condicions d'aplicació d'aquest últim. Per a comparar variables quantitatives entre grups es va utilitzar el test de Mann-Whitney en el cas de 2 grups i el de Kruskal-Wallis per a més de dos grups.

La supervivència es va determinar mitjançant el test de Kaplan-Meier (379) i les diferències de supervivència entre diferents grups amb el test log-rank (387). La SG es va definir com el temps en anys des del diagnòstic fins a la mort o l'última data de seguiment. La SLE es va definir com el temps en anys des del diagnòstic fins el primer esdeveniment (refractarietat, recaiguda, mort o última data de seguiment).

Per a tots els estudis estadístics es van considerar significatius els valors de $p < 0.05$.

2.6 Aspectes ètics

L'estudi addicional ha seguit els estàndards ètics i la Declaració de Helsinki segons les recomanacions de les guies nacionals i internacionals; a més, l'estudi ha rebut l'aprovació del Comitè d'Ètica de la nostra institució. Totes les mostres s'han emmagatzemat degudament en el Biobanc de l'hospital després d'obtenir la signatura del consentiment informat per part dels pacients, pares o tutors legals.

RESULTATS

RESULTATS

El projecte de tesi es **composa de 2 treballs**, els resultats dels quals es resumeixen a continuació.

En el **treball I** s'ha estudiat l'expressió i impacte pronòstic de 89 miRNAs relacionats amb *stemness* en pacients pediàtrics amb leucèmia aguda i els seus resultats s'han publicat a la revista *British Journal of Haematology* amb el títol "*A miRNA signature related to stemness identifies high-risk patients in paediatric acute myeloid leukaemia*".

En el **treball addicional** s'ha estudiat el perfil d'expressió dels gens *PPP1R-27*, *CCL23*, *SCUBE1*, *PHACTR3* i *NRG4* en una cohort de pacients pediàtrics amb leucèmia aguda enriquida en casos amb reordenament del gen *KMT2A*.

A continuació es detallen els resultats dels 2 treballs, agrupats en funció de cadascun dels objectius plantejats.

Resultats del treball I:

Anàlisi del paper dels miRNAs implicats en l'auto-renovació de les cèl·lules progenitores hematopoètiques i vies d'immaduresa (NOTCH, WNT/beta-catenina, HOX i FLT3) en una cohort pediàtrica de pacients diagnosticats de leucèmia aguda.

Selecció del control endogen per a la normalització de les dades d'expressió dels miRNAs: hsa-miR-191-5p és el control més estable

La selecció d'un control endogen és important per a la correcta normalització de les dades. L'objectiu és minimitzar la variació de les dades que podrien estar emmascarant o augmentant canvis biològicament significatius. Es van seleccionar tres gens controls descrits en la literatura (U6 snARN, hsa-miR-191-5p i hsa-miR-103a-3p) i es van incloure en totes les plaques de RT-qPCR. Vam analitzar la seva expressió i la DE corresponent per tal d'escollir el control més adequat. Les DE obtingudes per cada miRNA van ser de 6,771 (U6 snARN), 2,306 (hsa-miR-191-5p) i 3,155 (hsa-miR-103a-3p) (Figura 28). Per tant, es va escollir el miRNA hsa-miR-191-5p com a referència per presentar la menor DE (DE=2,306).

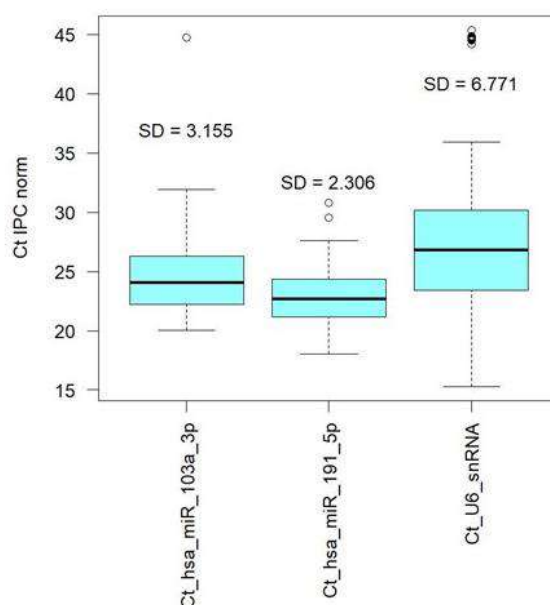


Figura 28: Anàlisi de la desviació estàndard (a la figura, *Standard deviation*, SD) de cada miRNA (U6 snARN, hsa-miR-191-5p i hsa-miR-103a-3p), com a candidats per a control endogen. Ct IPC norm: valor de Ct normalitzat utilitzant el control interplaca (IPC).

Anàlisi no supervisat:***Els perfils d'expressió dels miRNAs agrupen els pacients segons el llinatge de la leucèmia***

Vam realitzar un HCA no supervisat (miRNAs vs. mostres) utilitzant el perfil d'expressió dels 89 miRNAs en els 110 pacients estudiats. Per a visualitzar el patró d'agrupació de forma més efectiva també vam realitzar un anàlisi de components principals (PCA). Com es pot veure a la Figura 29A, els pacients s'agrupaven principalment en dues branques del dendrograma. La primera branca corresponia a la majoria de pacients amb LLA-B (excepte dos pacients amb LMA). La segona branca es dividia en dues branques principals: una incloïa la majoria de pacients amb LLA-T, amb alguns pacients de LMA i LLA-B; l'altra branca es ramificava en 3 braços: un d'ells incloïa majoritàriament pacients amb LLA-B, el segon pacients amb LMA i el tercer braç contenia els tres tipus de leucèmia. Globalment, independentment de la branca a la que corresponguessin, la majoria dels pacients amb la mateixa categoria molecular tendien a agrupar-se. En l'anàlisi del PCA vam observar un agrupament similar de les mostres. Així, els pacients es separaven per llinatges, especialment els pacients amb LMA i els pacients amb LLA-B (Figura 29B).

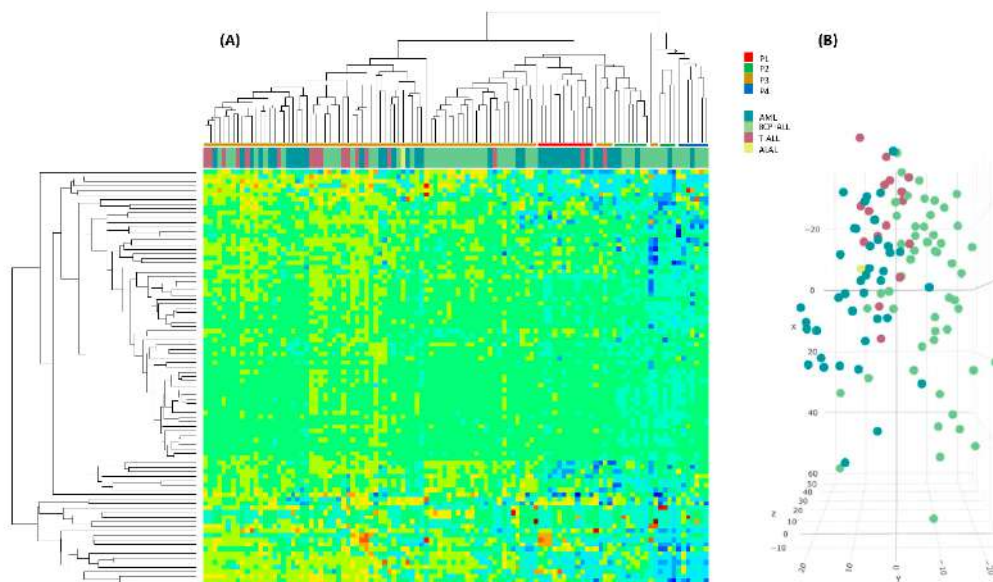


Figura 29: A) *Hierarchical cluster analysis*, HCA i B) Anàlisi de components principals (*principal component analysis*, PCA), basats en l'expressió de miRNAs de 110 mostres de pacients pediàtrics amb leucèmia aguda.

Els perfils d'expressió dels miRNAs diferencien quatre grups de pacients amb diferent supervivència

Basant-nos en les subbranques, vam correlacionar els diferents clústers del HCA amb altres variables clíniques i biològiques diferents del llinatge i la categoria molecular. No vam trobar cap associació amb l'edat, el sexe, la infiltració del SNC o el recompte leucocitari. En canvi, en l'anàlisi de supervivència vam observar que alguns dels grups presentaven diferències significatives en la SLE ($p=0,033$), definint quatre grups (Figura 29 i Figura 30). Així, vam diferenciar dos grups amb pitjor supervivència (P1 i P4), un grup amb bona supervivència (P2) i un quart grup (P3) amb supervivència intermèdia. Destacava que els clústers amb bona i mala supervivència s'agrupaven una altra vegada segons el llinatge (P1 incloïa la majoria de casos de LMA i P4 la majoria de casos amb LLA amb mala supervivència). També vam observar en el PCA que els pacients es separaven de la mateixa manera en els grups esmentats en funció de l'expressió de miRNAs i la supervivència (Figura 30B).

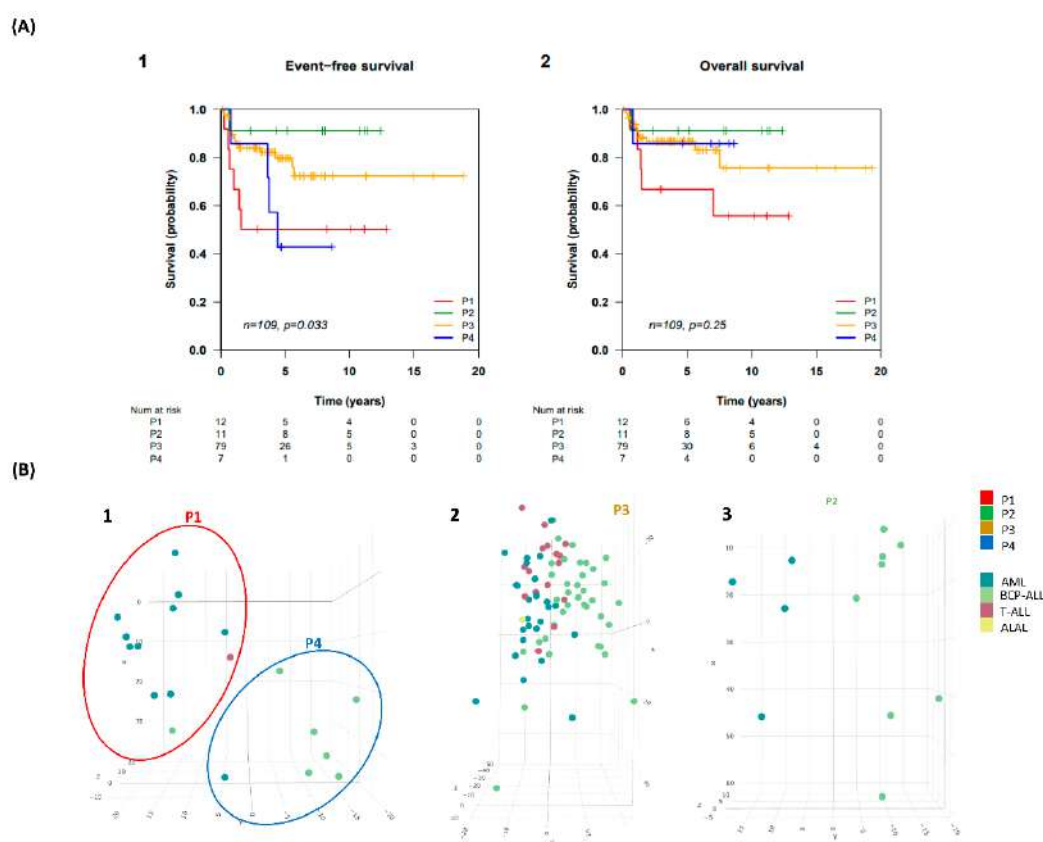


Figura 30: A) Test de *Log-rank* per a la supervivència lliure d'esdeveniment (*event-free survival*) i la supervivència global (*overall survival*) dels pacients segons el clúster assignat (P1, P2, P3 i P4). *Time (years)*:

temps en anys. B) Anàlisi de components principals de les dades d'expressió de miRNA de cada grup. AML: leucèmia mieloide aguda, BCP-ALL: leucèmia limfoblàstica aguda de llinatge B, T-ALL: leucèmia limfoblàstica aguda de llinatge T, ALAL/LALA: leucèmia aguda de llinatge ambigu.

Per tal de refinar els quatre grups generats en l'estudi no supervisat, vam estudiar l'expressió dels miRNAs i la supervivència segons el llinatge dels pacients.

Anàlisi supervisat:

L'expressió de miRNAs no diferencia de forma estadísticament significativa la supervivència dels pacients amb leucèmia limfoblàstica aguda

L'estudi i les corbes de supervivència dels 69 pacients amb LLA (incloent pacients amb LLA-B i LLA-T) es poden visualitzar a la Figura 31. La mediana de seguiment dels pacients va ser de 6,1 anys (rang 0,5-18,8). En base als resultats obtinguts, vam diferenciar tres grups. Els tres grups presentaren SG similars, però un grup, definit com a P1ALL, va presentar pitjor SLE als 5 anys comparat amb la resta de pacients, els quals formaven els grups P2ALL i P3ALL. Així, el grup P1ALL va presentar als 5 anys una SG de 87% (75,3%-98,7%) i una SLE de 50% (32,3%-67,7%); el grup P2ALL una SG i SLE de 85% (71,8%-98,2%) i el grup P3ALL una SG de 86% (81,3%-90,7%) i una SLE de 81% (75,1%-86,9%). Aquests grups coincideixen amb els pacients amb LLA dels grups P4, P2 i P3 de l'anàlisi no supervisat, respectivament.

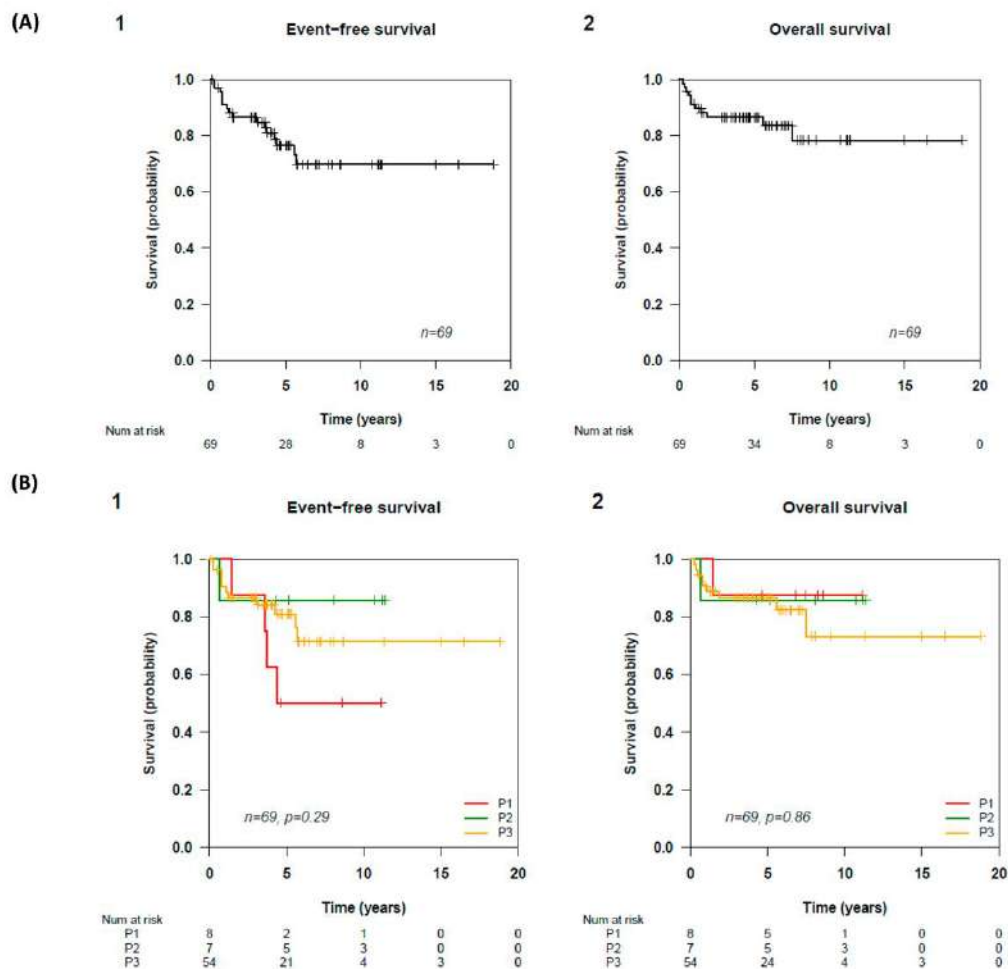


Figura 31: Supervivència lliure d'esdeveniment (*event-free survival*) i supervivència global (*overall survival*) dels pacients amb leucèmia limfoblàstica aguda en conjunt ($n=69$) i separats per grups (designats com a P1, P2 i P3) segons l'anàlisi no supervisat. *Time (years)*: temps en anys.

Els perfils d'expressió de miRNAs identifiquen els pacients amb leucèmia mieloide aguda amb pronòstic bo i advers

Les característiques clíniques i biològiques dels 39 pacients amb LMA es troben a la taula 24. Amb una mediana global de seguiment de 5,7 anys (rang 0,09-19,3) vam observar, tant al HCA com en l'anàlisi de supervivència, que els pacients es dividien en dos grups amb evolució diferent. Un dels dos grups, el qual vam definir com a P1AML, estava format per 14 pacients. Els pacients P1AML presentaven de forma significativa una pitjor supervivència: SG als 5 anys de 64,3% (51,5%-77,1%) en comparació amb la resta de pacients, agrupats en el grup P2AML, que presentaven una supervivència excel·lent amb una SG als 5 anys de 90,9% (84,5%-97,3%) ($p=0,024$). Cal destacar que les diferències en

la SLE als 5 anys eren encara majors: 42,9% (29,7%-56,1%) per als pacients del grup P1AML en comparació al 87,3% (80,1%-94,5%) en els pacients del grup P2AML ($p=0,0027$) (Figura 32).

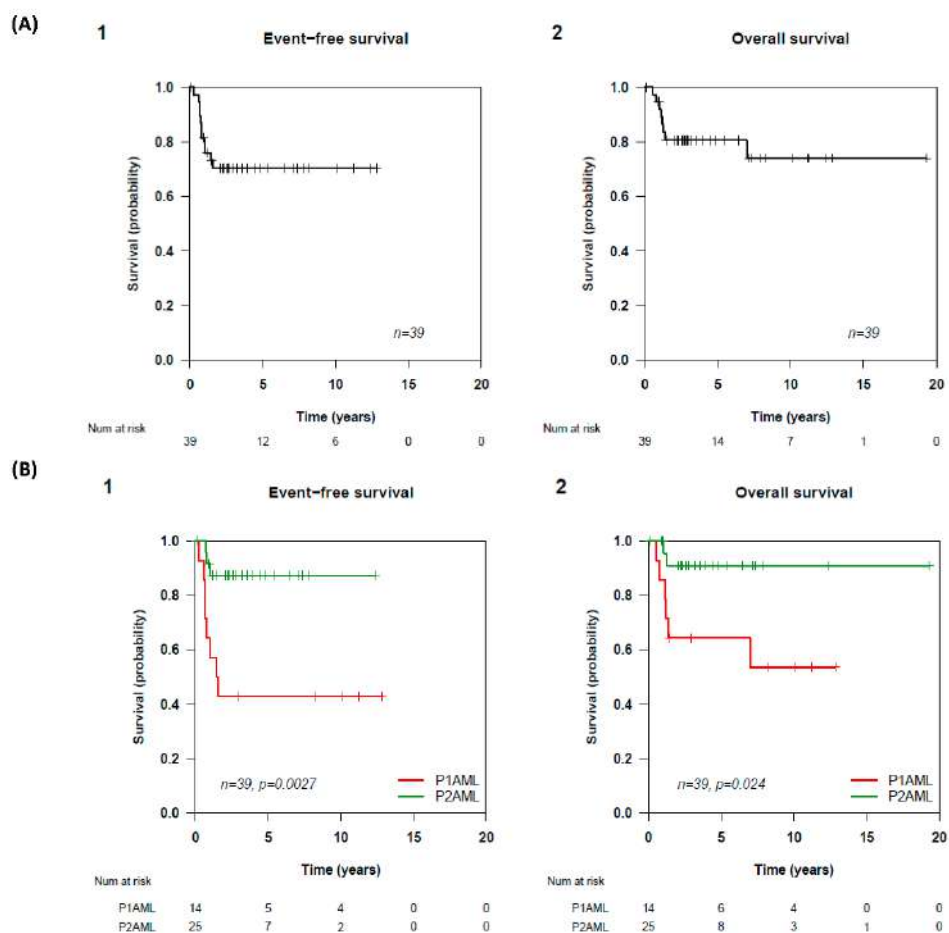


Figura 32: Supervivència lliure d'esdeveniment (*event-free survival*) i supervivència global (*overall survival*) de la cohort de pacients amb leucèmia mieloide aguda ($n=39$), separats per grups designats P1AML i P2AML identificats en l'anàlisi no supervisat. *Time (years)*: temps en anys.

Taula 24: Característiques clíniques i biològiques dels 39 pacients amb leucèmia mieloide aguda classificats segons els perfils d'expressió dels miRNAs en els grups P1AML i P2AML.

	P1AML n=14	P2AML n=25	p-valor
Sexe (n=39)			0,74
Femení (n=14)	6 (42,9%)	8 (32,0%)	
Masculí (n=25)	8 (57,1%)	17 (68,0%)	
Edat, anys (n=39)			
Mediana [rang]	2,7 [0,1;17,0]	3,5 [0,2;16,4]	0,48
[0,2) anys	5 (35,7%)	7 (28,0%)	
[2,10) anys	5 (35,7%)	10 (40,0%)	0,96
[10,15) anys	2 (14,3%)	4 (16,0%)	
[15,19) anys	2 (14,3%)	4 (16,0%)	
Nombre de leucòcits, x10⁹/L mediana [rang] (n=39)	11,9 [3,5;146,0]	9,6 [0,6;253,0]	1,00
Infiltració del SNC (n=38)			0,70
No infiltrat (n=29)	10 (71,4%)	19 (79,2%)	
Infiltrat (n=9)	4 (28,6%)	5 (20,8%)	
t(15;17)(q22;q12) PML::RARA (n=39)	0/14 (0,0%)	4/25 (16,0%)	0,28
t(8;21)(q22;q22.1) RUNX1::RUNX1T1 (n=39)	2/14 (14,3%)	2/25 (8,0%)	0,61
inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1;q22) CBFβ::MYH11 (n=39)	1/14 (7,1%)	3/25 (12,0%)	1,00
KMT2A+ (n=39)	6/14 (42,9%)	10/25 (40,0%)	1,00
t(9;11)(p22;q23) (n=39)	2/14 (14,3%)	6/25 (24,0%)	0,69
t(10;11)(p11.2;q23) (n=39)	1/14 (7,1%)	1/25 (4,0%)	1,00
t(11;19)(q23;p13.1) (n=39)	1/14 (7,1%)	1/25 (4,0%)	1,00
LMA amb altres cariotips* (n=39)	5/14 (35,7%)	6/25 (24,0%)	0,48
FLT3 ITD (n=38)	1/14 (7,1%)	4/24 (16,7%)	0,63
Mutacions NPM1 (n=15)	3/7 (42,9%)	0/8 (0,0%)	0,077
MRM≥0.1% al final de la inducció (n=29)	3/12 (25,0%)	3/17 (17,6%)	0,67
SLE (n=39)			0,0027
5 anys (95% IC)	42,9% (23,4%-78,5%)	87,3% (74,8%-100,0%)	
10 anys (95% IC)	42,9% (23,4%-78,5%)	87,3% (74,8%-100,0%)	
SG (n=39)			0,024
5 anys (95% IC)	64,3% (43,5%-95,0%)	90,9% (79,7%-100,0%)	
10 anys (95% IC)	53,6% (31,5%-91,0%)	90,9% (79,7%-100,0%)	

SNC: Sistema nerviós central. ITD: duplicació interna en tàndem. IC: interval de confiança. MRM: malaltia residual mesurable. *LMA amb altres cariotips inclou pacients amb cariotips normals i dos pacients amb cariotip complex. SLE: supervivència lliure d'esdeveniment. SG: supervivència global.

Els pacients inclosos en els grups P1AML i P2AML es classifiquen en diferents categories moleculars

Els dos grups diferenciats en l'estudi no supervisat, P1AML i P2AML, inclouen casos de la majoria de categories moleculars descrites en pacients amb LMA (*RUNX1::RUNX1T1*, *CBFβ::MYH11*, *KMT2A-r*), i casos sense alteracions genètiques recurrents. De forma interessant, no vam trobar casos amb el gen de fusió *PML::RARA* en el grup P1AML,

mentre que tots els pacients amb mutacions al gen *NPM1* es trobaven en aquest P1AML (Taula 24). No vam trobar diferències en les variables clíniques ni biològiques que expliquessin la diferència en la supervivència entre aquests dos grups, excepte per les diferències d'expressió dels miRNAs. Així, vam identificar 24 miRNAs expressats de manera significativament diferent entre els grups P1AML i P2AML (Figura 33, taula 25). En comparació amb el grup P2AML, els pacients amb LMA i pitjor supervivència (P1AML) es caracteritzaven per infraexpressar 23 miRNAs i sobreexpressar el hsa-miR-9-5p.

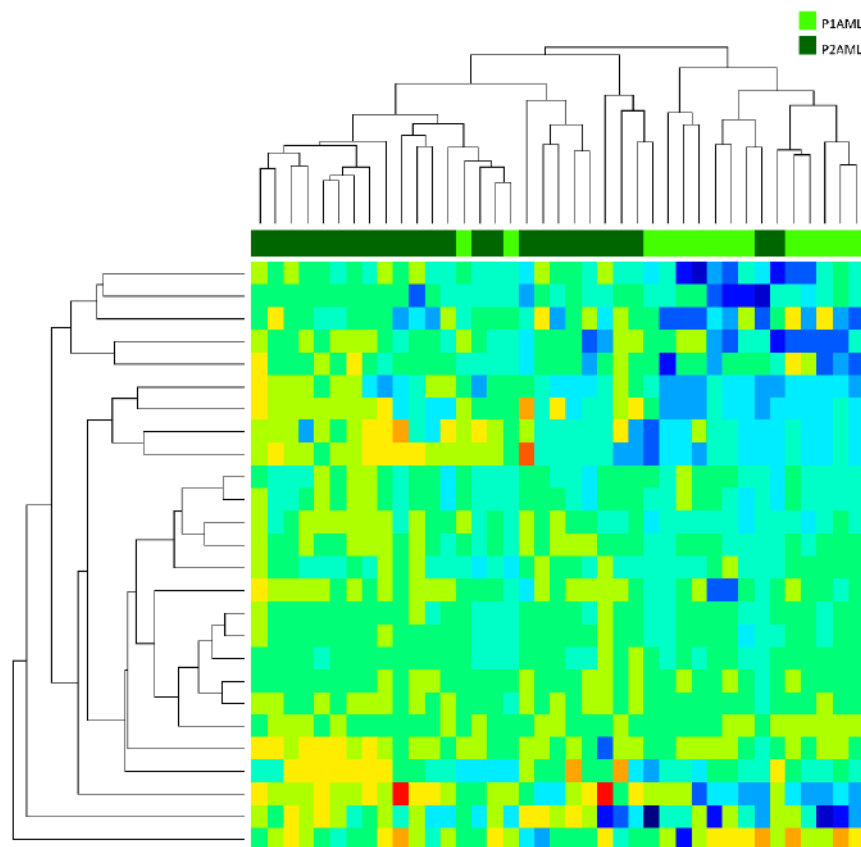


Figura 33: *Hierarchical cluster analysis* amb els perfils d'expressió dels 24 miRNAs capaços de discriminar els pacients amb leucèmia mieloide aguda amb un pitjor pronòstic (P1AML) en comparació amb la resta de pacients, agrupats al grup P2AML, amb un pronòstic favorable.

Taula 25: Llistat dels 24 miRNAs que presentaven expressió significativament diferent entre els grups P1AML i P2AML.

<i>miRNAs</i>	<i>FDR</i>	<i>P1AML</i>	<i>P2AML</i>	<i>P1AML-P2AML</i>
<i>hsa-mir-20b-5p</i>	0,00015197	6,693350649	1,507636364	5,185714286
<i>hsa-mir-223-3p</i>	0,00015197	-1,211285714	-1,3318	0,120514286
<i>hsa-mir-193a-3p</i>	0,000269182	5,462038961	1,535181818	3,926857143
<i>hsa-mir-24-3p</i>	0,001189043	-0,488415584	-0,939872727	0,451457143
<i>hsa-mir-128-3p</i>	0,001608793	4,769103896	2,344818182	2,424285714
<i>hsa-mir-17-5p</i>	0,001608793	2,686285714	-0,1718	2,858085714
<i>hsa-mir-199b-5p</i>	0,005176352	-1,640935065	-1,909563636	0,268628571
<i>hsa-mir-181c-5p</i>	0,006100758	5,088324675	1,336781818	3,751542857
<i>hsa-mir-181a-5p</i>	0,007067649	1,668766234	1,149309091	0,519457143
<i>hsa-mir-181b-5p</i>	0,007067649	1,407714286	1,3186	0,089114286
<i>hsa-mir-21-5p</i>	0,007067649	-0,305467532	-1,126781818	0,821314286
<i>hsa-mir-222-5p</i>	0,007067649	3,906896104	-2,820418182	6,727314286
<i>hsa-mir-331-5p</i>	0,010275888	4,314454545	-0,218145455	4,5326
<i>hsa-mir-373-3p</i>	0,010275888	4,298532468	-1,063781818	5,362314286
<i>hsa-mir-708-5p</i>	0,010275888	4,69387013	1,601527273	3,092342857
<i>hsa-mir-34b-5p</i>	0,018008167	2,970701299	-1,592127273	4,562828571
<i>hsa-mir-195-5p</i>	0,022483156	3,764350649	0,126436364	3,637914286
<i>hsa-mir-151a-5p</i>	0,032429259	1,566597403	0,968854545	0,597742857
<i>hsa-mir-30b-5p</i>	0,035537702	0,705038961	0,503181818	0,201857143
<i>hsa-mir-22-3p</i>	0,042360357	1,803571429	-1,5042	3,307771429
<i>hsa-let-7g-5p</i>	0,04498747	1,139597403	0,142454545	0,997142857
<i>hsa-let-7i-5p</i>	0,04498747	1,267519481	-0,124909091	1,392428571
<i>hsa-mir-1290</i>	0,04498747	3,523251948	-0,381890909	3,905142857
<i>hsa-mir-9-5p</i>	0,045759834	-2,955142857	-1,6118	-1,343342857

FDR: *false discovery rate*

Anàlisi de les vies en les que participen els 24 miRNAs que configuren la firma

Per tal d'entendre el rol d'aquests miRNAs en el procés de leucemogènesi i identificar les seves funcions, vam realitzar un anàlisi mitjançant el servidor web gratuït DIANA-miRPath v3.0 i vam obtenir el *heatmap* de la Figura 34 i les dades mostrades a la taula 26. Basant-nos en aquest estudi, vam observar que, en general, els 24 miRNAs del perfil estaven involucrats en carcinogènesi, desenvolupament i progressió del càncer (per exemple, càncer de pulmó, càncer de pàncrees, melanoma, càncer d'endometri, càncer de tiroides, carcinoma de cèl·lules renals, càncer colorectal, glioma, càncer de pròstata i també leucèmia mieloide aguda). Vam veure una associació entre els miRNAs i les vies de senyalització MAPK, PI3K-Akt, TGF-beta, FoxO, en el cicle cel·lular i en la senyalització i

regulació de les cèl·lules mare. La majoria dels 24 miRNAs presentaven llocs d'unió per regular gens i factors de transcripció involucrats en aquestes vies com *SOCS2* o el factor de transcripció *SP1*, els quals es podien trobar potencialment regulats per 7 o 8 miRNAs estudiats, respectivament. Pel que fa a les potencials dianes, els nostres miRNAs també interaccionaven amb altres gens que podrien actuar modificant l'expressió gènica com *MBNL3*, implicat en la regulació de l'*splicing* alternatiu, o el gen *CPEB3*, que participa en la regulació de la transcripció. Per últim, també vam observar que diferents miRNAs estaven implicats en la comunicació i interacció cel·lular regulant les unions adherents i l'adhesió focal.

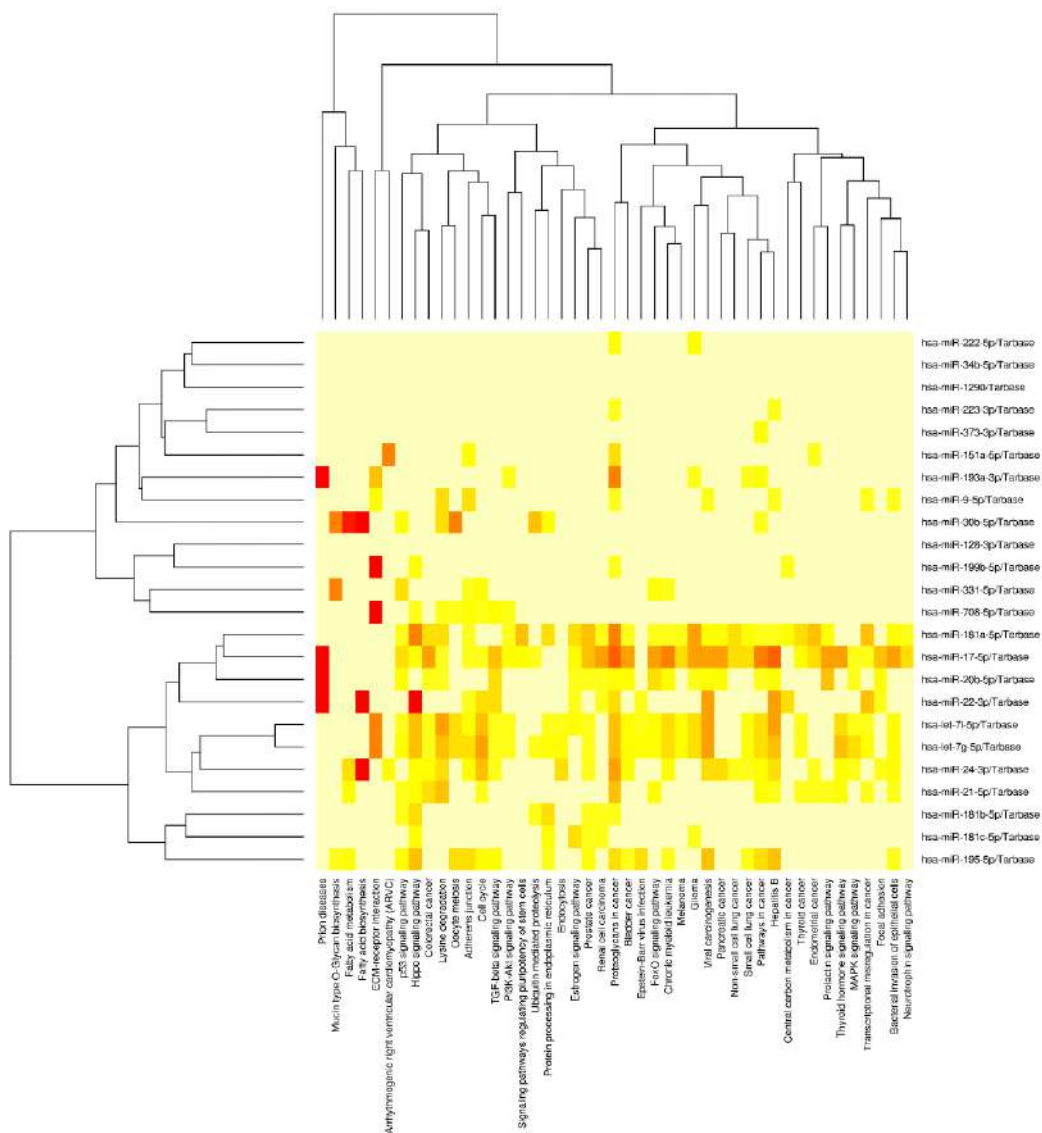


Figura 34: Heatmap amb totes les vies significativament enriquides en els 24 miRNAs seleccionats.

Taula 26. Llista de vies enriquides en els 24 miRNAs seleccionats i el seu p valor

<i>KEGG pathway*</i>	<i>p-valor</i>	<i>#gens</i>	<i>#miRNAs</i>
Proteoglicans en càncer	0	131	16
Via de senyalització Hippo	0	91	12
Hepatitis B	0	92	11
Vies en càncer	5,55E-10	213	11
Unions adherents	5,93E-05	52	11
Degradació de la Lisina	1,11E-10	28	10
Via de senyalització de <i>TP53</i>	3,61E-04	45	10
Carcinogènesi vírica	0	117	9
Cicle cel·lular	2,53E-06	80	9
Càncer de pròstata	9,28E-01	58	9
Glioma	3,88E-07	35	8
Leucèmia mieloide crònica	1,48E-04	48	8
Invasió bacteriana de cèl·lules epitelials	1,43E-01	50	8
Via de senyalització de TGF-beta	3,22E-01	45	8
Càncer colorectal	5,69E-04	40	7
Via de senyalització de FoxO	4,92E-02	68	7
Desregulació transcripcional en càncer	1,29E-01	95	7
Càncer de bufeta	2,00E-01	29	7
Càncer de pulmó de cèl·lules petites	2,07E+00	53	7
Processament de proteïnes en el reticle	0,0002295268	84	7
Receptor-ECM d'interacció	0	26	6
Carcinoma de cèl·lules renals	1,27E+01	42	6
Via de senyalització d'estrogen	0,0004439923	49	6
Via de senyalització PI3K-Akt	0,001097869	132	6
Meiosis d'òcits	2,03E-02	50	5
Via de senyalització de l'hormona tiroide	4,72E-02	65	5
Càncer d'endometri	0,0004592499	28	5
Càncer de tiroides	0,01371944	17	5
Via de senyalització de MAPK	0,04221966	97	5
Malalties priòniques	0	8	4
Càncer de pàncrees	3,34E+00	38	4
Metabolisme dels àcids grassos	4,42E+01	22	4
Adhesió focal	0,0002528746	88	4
Via de senyalització de la prolactina	0,0002609678	31	4
Melanoma	0,004557802	27	4
Proteòlisi mediada per ubiquitina	0,004623076	65	4
Infecció pel virus Epstein-Barr	0,01771869	85	4
Biosíntesi d'àcids grassos	0	5	3
Càncer de pulmó no microcític	0,005083879	29	3
Metabolisme central del carboni en càncer	0,0291216	26	3
Endocitosi	0,03471336	75	3
Biosíntesi d'O-glucans de tipus mucina	0,03962723	8	3
Vies de senyalització que regulen la pluripotència de les cèl·lules mare	0,00580632	50	2
Cardiomiopatia arritmogènica	0,03114162	14	2
Via de senyalització de les neurotrofines	0,04005991	46	2

*KEGG pathway (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) és una col·lecció de mapes de vies que representen les xarxes d'interacció molecular, reaccions i relacions del metabolisme, el processament de la informació genètica, els processos cel·lulars, els sistemes orgànics, les malalties humanes i el desenvolupament de fàrmacs.

Relació entre el perfil de 24 miRNAs i les vies d'immaduresa

Atès que es van descriure elevats nivells dels *leukemic stem cell score* tant en adults (LSC17) com en nens (pLSC6) (158,159) amb LMA amb pronòstic desfavorable i que nosaltres vam identificar un perfil de 24 miRNAs capaç de diferenciar aquests pacients, en aquest punt vam voler analitzar si hi havia alguna relació entre els miRNAs del nostre perfil i les vies d'immaduresa mitjançant l'anàlisi d'ambdós *scores*. Per fer això vam utilitzar el servidor web *TargetScan*, el qual permet predir les dianes biològiques dels miRNAs buscant els llocs d'unió complementària pels miRNAs en els diferents RNAm implicats, en aquest cas, dels dos *scores*. La Figura 35 mostra els gens inclosos a ambdós *scores* i la seva relació com a possible diana dels miRNAs de la signatura de 24 miRNAs.

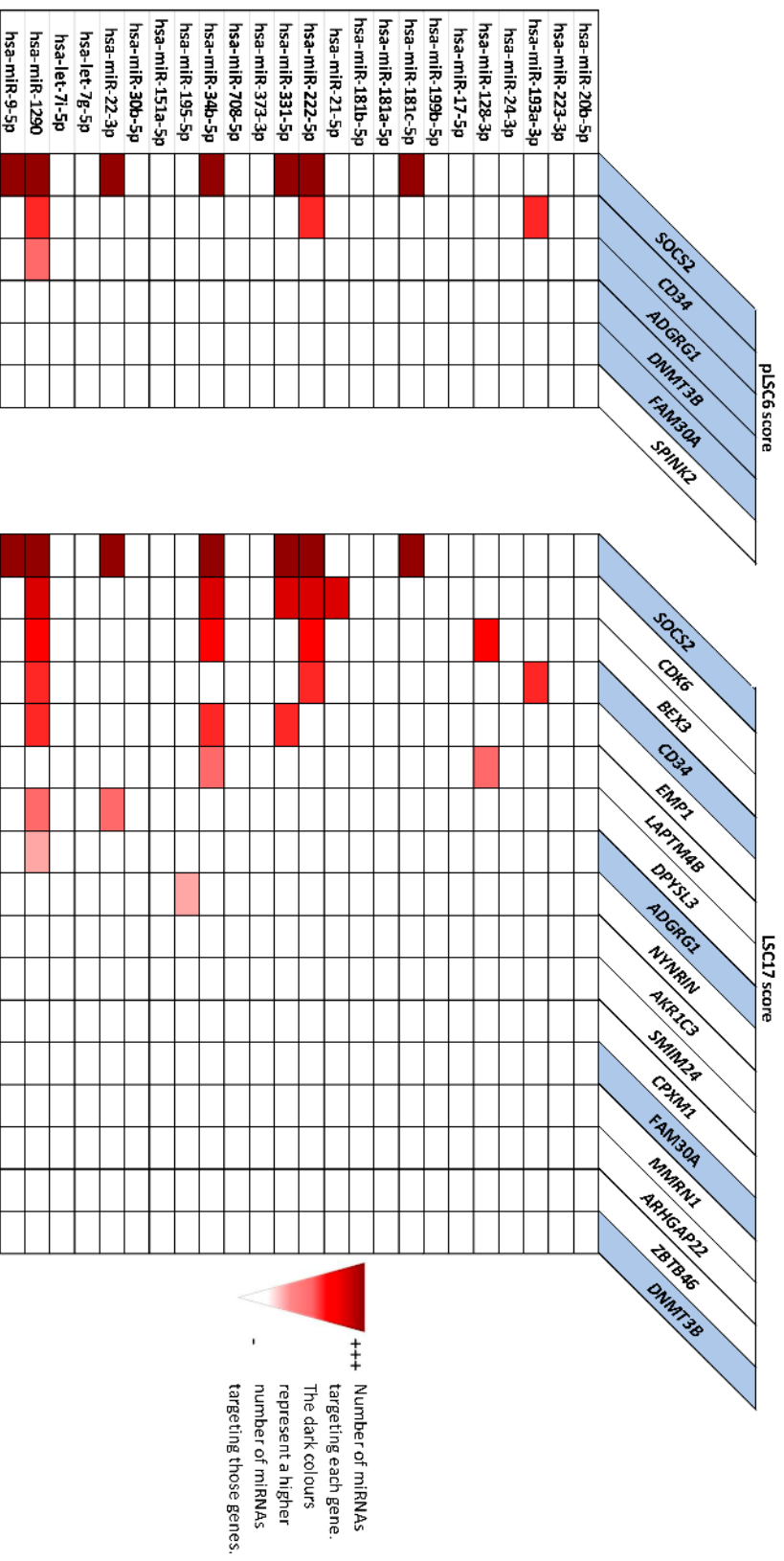


Figura 35: Gens inclosos en els *leukemic stem cell* scores pLSC6 (esquerra) i LSC17 (dreta). Les caselles dels gens que presenten llocs d'unió per als miRNAs es troben pintades de color en tons vermells. Els gens pintats de color blau són comuns entre els dos scores. Pel que fa a la llegenda, les caselles pintades representen el número de miRNAs que regulen cada gen. Els colors més foscos representen un major número de miRNAs regulant el gen donat.

En l'anàlisi vam veure que vuit miRNAs de la nostra firma presentaven llocs d'unió en 3 dels 6 gens del pLSC6 i onze miRNAs presentaven llocs d'unió en 9 gens dels 17 que formaven part del LSC17. Pel que fa al pLSC6, el gen *SOCS2* va ser el gen amb major nombre de llocs d'unió, potencialment sent regulat per 7 miRNAs, seguit del gen *CD34* i del gen *ADGRG1*, el quals podien ser regulats per tres i un miRNA respectivament. Respecte a l'*score* d'adults (LSC17), a més dels ja mencionats, també vam observar que els gens *CDK6*, *BEX3*, *EMP1*, *LAPTM4B* i *DPYSL3* presentaven llocs d'unió per cinc, quatre, tres i dos miRNAs, respectivament. *NYNRIN* només presentava lloc d'unió per a un únic miRNA. El hsa-miR-1290 és el miRNA que podia regular el major número de gens, seguit del hsa-miR-34b-5p i el hsa-miR-222-5p. A més, hi havia alguns gens en ambdós *scores* que no presentaven llocs d'unió per a cap miRNA. Així, diferents miRNAs de la nostra firma potencialment podien regular gens dels dos *scores* d'immaduresa (Figura 35).

La firma de 24 miRNAs prediu la supervivència en l'anàlisi univariat

En l'anàlisi univariat no vam trobar factors predictius per la SG i la SLE (n=39), excepte per la firma de 24 miRNAs, la qual va ser un factor pronòstic advers per ambdues (test de log-rank $p=0,00027$, i $p=0,024$ respectivament). Pel que fa el model de Cox, vam obtenir un *Hazard Ratio* [HR] de 5,97%, amb 95% d'IC 1,58-22,54, $p=0,0084$ i [HR] de 5,26, amb 95% d'IC 1,06-26,22, $p=0,043$, respectivament (Taula 27).

Taula 27: Models de Cox per a l'anàlisi univariat a la cohort de l'Hospital Sant Joan de Déu.

	SLE			SG		
	HR	p-valor	p-valor global	HR	p-valor	p-valor global
Protocol						
SHOP AML	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
NOPHO	1,38 [0,33;4,52]	0,62	0,68	1,55 [0,28;6,47]	0,58	0,78
PETHEMA LPA	0,44 [0,00;3,49]	0,52		0,63 [0,00;5,35]	0,74	
Edat. anys						
[0,2) anys	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
[2,10) anys	0,11 [0,01;0,88]	0,038	0,050	0,20 [0,02;1,11]	0,066	0,085
[10,15) anys	0,88 [0,22;3,55]	0,86		1,40 [0,31;5,76]	0,64	
[15,19) anys	0,23 [0,03;1,93]	0,18		0,18 [0,00;1,65]	0,15	

	SLE			SG		
	HR	p-valor	p-valor global	HR	p-valor	p-valor global
MRM a final d'inducció						
No <0,1%	Ref.	Ref.	-	Ref.	Ref.	-
Sí ≥0,1%	1,92 [0,37;9,97]	0,44		3,28 [0,55;19,74]	0,19	
Genètica						
LMA amb altres cariotips	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
Inv(16) + t(8;21)	0,27 [0,04;1,40]	0,134		0,26 [0,02;2,01]	0,19	
KMT2A+ no t(9;11)	0,48 [0,10;2,28]	0,375		0,74 [0,14;4,54]	0,72	
KMT2A+ t(9;11)	0,26 [0,04;1,35]	0,121	0,71	0,27 [0,02;2,04]	0,20	0,80
NPM1-/FLT3 ITD+	0,52 [0,00;5,46]	0,999		0,75 [0,01;9,30]	0,85	
NPM1+/FLT3 ITD-	0,72 [0,07;4,44]	0,617		0,81 [0,07;6,55]	0,85	
NPM1+/FLT3 ITD+	0,40 [0,00;4,19]	0,999		0,75 [0,01;9,30]	0,85	
t(15;17)	0,13 [0,00;1,40]	0,998		0,22 [0,00;2,80]	0,27	
Firma 24 miRNAs						
P2AML	Ref.	Ref.	-	Ref.	Ref.	-
P1AML	5,97 [1,58;22,54]	0,0084		5,26 [1,06;26,22]	0,043	
Estratificació per risc genètic						
Favorable	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
Intermedi	2,14 [0,41;11,05]	0,36	0,37	2,60 [0,27;25,03]	0,41	0,18
Advers	3,25 [0,59;17,81]	0,17		5,92 [0,66;53,20]	0,11	

HR: hazard ratio. SLE: supervivència lliure d'esdeveniment. SG: supervivència global. ITD: duplicació interna en tàndem. MRM: malaltia residual mesurable.

Els 24 miRNAs de la firma prediuen de manera conjunta la supervivència dels pacients amb leucèmia mieloide aguda

Per tal de facilitar la seva aplicació clínica, ens vam plantejar simplificar la firma i reduir-la a un número menor de miRNAs. Amb aquest objectiu, vam analitzar la firma des de diferents aproximacions.

1. Vam tenir en compte la correlació entre els miRNAs de la firma i els scores relacionats amb immaduresa (LSC17 i pLSC6): en aquest cas, i com es pot observar

en els resultats anteriors, dels 24 miRNAs, només deu regulaven gens involucrats en algun dels dos *scores* (Figura 35).

2. Vam analitzar l'efecte individual de cada miRNAs en la SLE i la SG dicotomitant l'expressió de cada miRNA utilitzant el mètode de Contal-O'Quigley i comparant els dos grups mitjançant el test log-rank (Figura 36 i Figura 37): vam observar que alguns dels deu miRNAs relacionats amb els *scores* LSC17 i pLSC6 (hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-34b-5p i hsa-miR-331-5p), no separaven de forma significativa dos grups de pacients en el test de log-rank. En canvi, altres miRNAs (hsa-miR-181a-5p i hsa-miR-223-3p) que no regulaven gens involucrats en els *scores*, diferenciaven de forma significativa dos grups amb diferents supervivència.
3. Vam analitzar la firma reduint el punt de tall amb una significança més estricta ($\leq 0,01$): alguns dels 24 miRNAs menys significatius de la firma ($p \geq 0,01$ i $p \leq 0,05$), com el hsa-miR-1290 i el hsa-miR-9-5p, relacionats amb el pLSC6 i el LSC17, deixaven de formar part de la firma.

Tenint en compte totes les dades obtingudes des de les diferents aproximacions, vam considerar que els 24 miRNAs de la firma podrien contribuir de forma conjunta a l'efecte predictiu sobre els resultats i que l'intent de simplificar la firma podria comportar perdre informació valuosa per al pronòstic. L'aportació individual de cada miRNA i la interacció amb altres miRNAs i els *scores* impossibilitaven simplificar la firma, pel que vam decidir mantenir-la en 24 miRNAs.

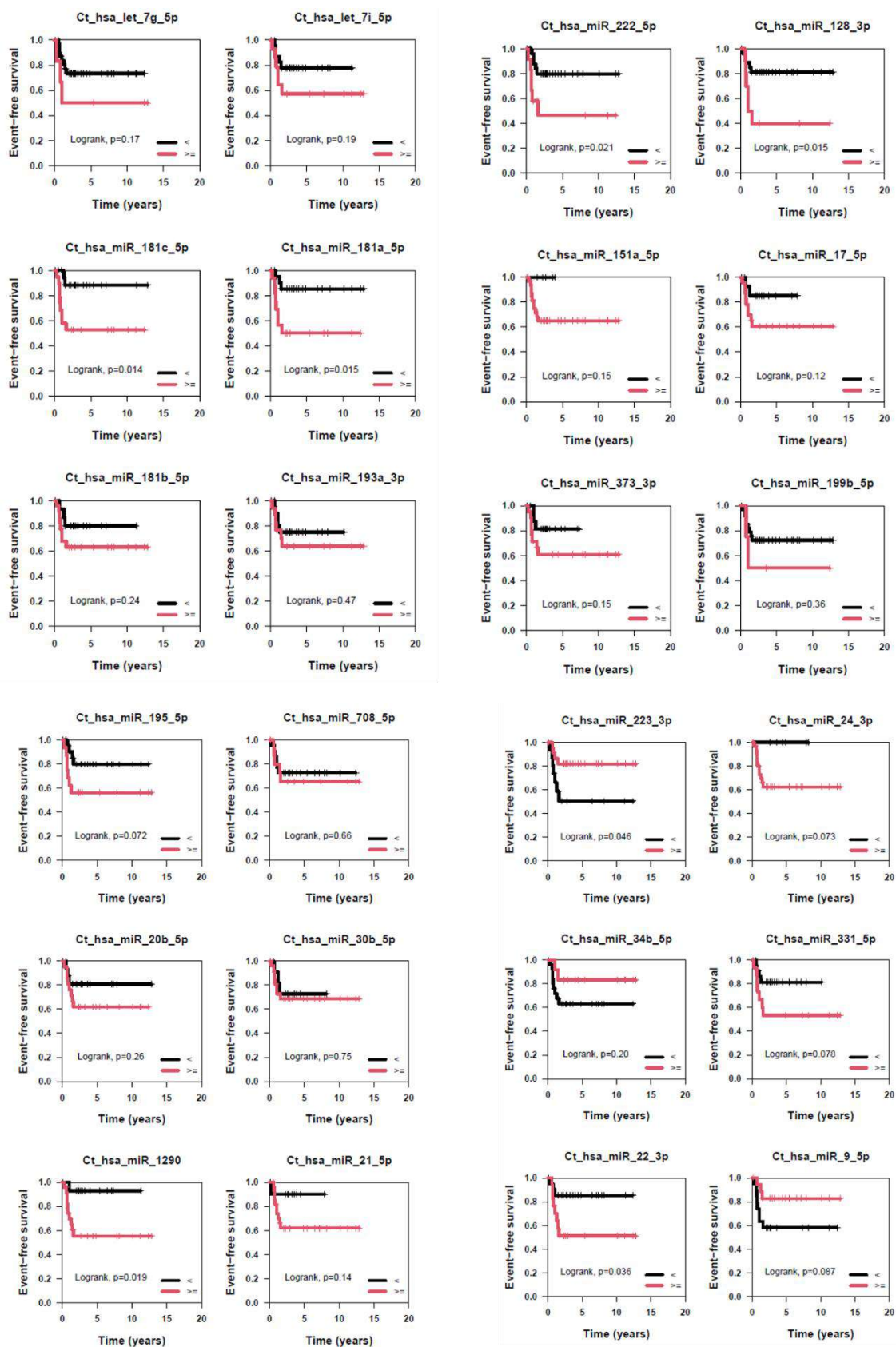


Figura 36: Test de *log-rank* per a la supervivència lliure d'esdeveniment (*event-free survival*) dels pacients segons l'expressió de cada miRNA de forma individualitzada. *Time (years)*: temps en anys.

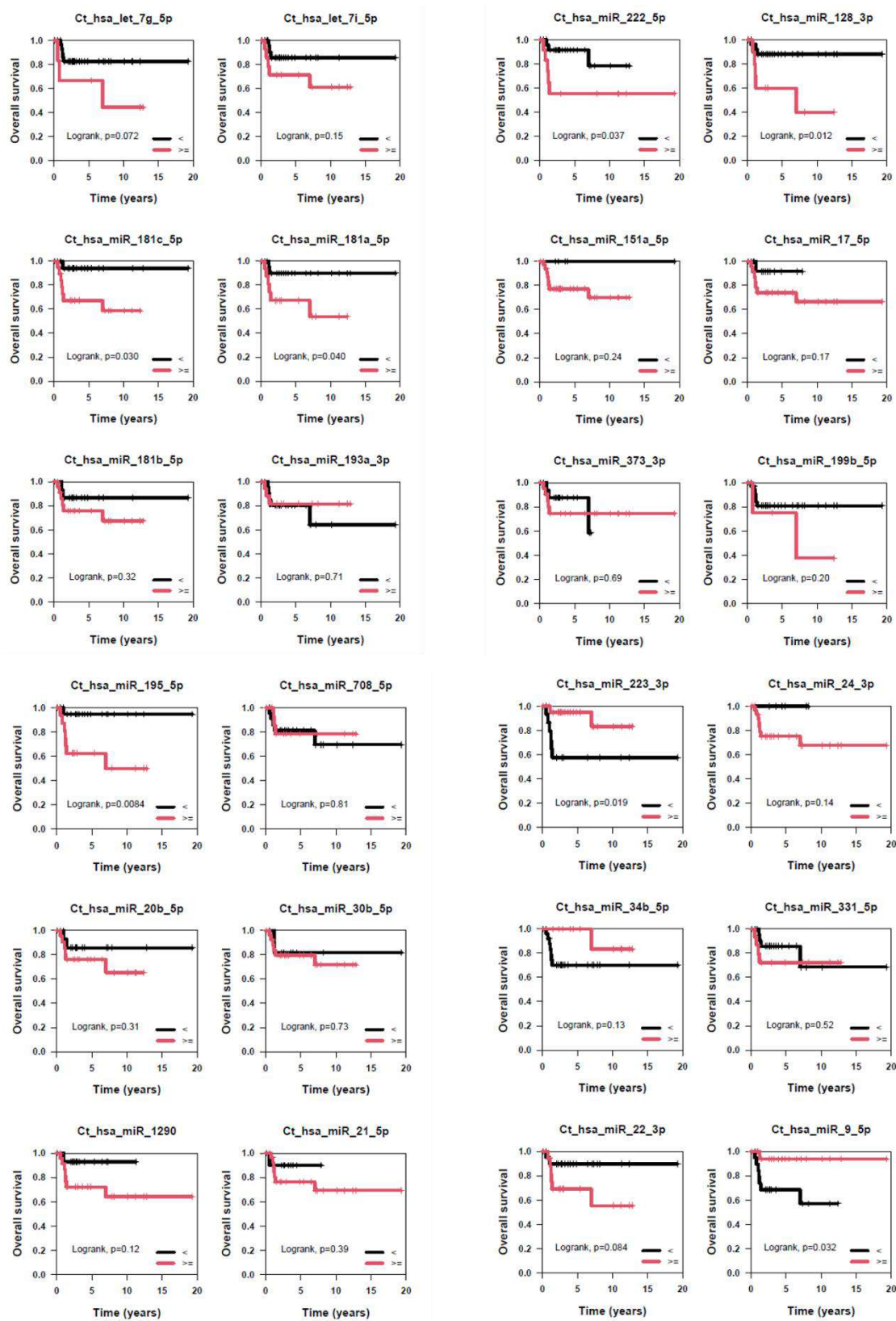


Figura 37: Test de log-rank per a la supervivència global (*overall survival*) dels pacients segons l'expressió de cada miRNA de forma individualitzada. *Time (years)*: temps en anys.

Validació de la firma de 24 miRNAs en una cohort independent

Per tal de confirmar els resultats obtinguts, vam realitzar una validació en una sèrie de 447 pacients pediàtrics amb LMA de la base de dades pública TARGET (<https://ocg.cancer.gov/programs/target>), phs000218 (Taula 28). Globalment les dues sèries van ser comparables excepte per l'edat, el número de leucòcits al diagnòstic, la infiltració del SNC, el número de pacients amb reordenaments del gen *KMT2A*, i la SLE.

Taula 28: Comparació dels pacients amb leucèmia mieloide aguda inclosos en les cohorts de l'Hospital Sant Joan de Déu i de la base de dades TARGET.

	<i>HSJD</i> <i>n=39</i>	<i>TARGET</i> <i>n=447</i>	<i>p-valor</i>
Sexe (n=486)			0,16
Femení (n=233)	14 (35,9%)	219 (49,0%)	
Masculí (n=253)	25 (64,1%)	228 (51,0%)	
Edat, anys (n=486)			
Mediana [rang]	3,4 [0,1;17,0]	9,8 [0,0;18,9]	0,0038
[0,2) anys (n=94)	12 (30,8%)	82 (18,3%)	
[2,10) anys (n=159)	15 (38,5%)	144 (32,2%)	0,11
[10,15) anys (n=130)	6 (15,4%)	124 (27,7%)	
[15,19) anys (n=103)	6 (15,4%)	97 (21,7%)	
Infiltració del SNC (n=485)			0,0034
No infiltrat (n=442)	29 (76,3%)	413 (92,4%)	
Infiltrat (n=43)	9 (23,7%)	34 (7,6%)	
t(15;17)(q22;q12) PML::RARA (n=39)	4/39 (10,3%)	-	-
t(8;21)(q22;q22.1) RUNX1::RUNX1T1 (n=472)	4/39 (10,3%)	66/433 (15,2%)	0,55
inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1;q22) CBFβ::MYH11 (n=472)	4/39 (10,3%)	57/433 (13,2%)	0,79
KMT2A-r (n=472)	16 (41,0%)	59 (13,6%)	<0,0001
t(9;11)(p22;q23) (n=468)	8/39 (20,5%)	25/429 (5,8%)	0,0033
t(10;11)(p11.2;q23) (n=472)	2/39 (5,1%)	8/433 (1,8%)	0,20
t(11;19)(q23;p13.1) (n=472)	2/39 (5,1%)	11/433 (2,5%)	0,29
t(6;11)(q27;q23) (n=472)	0/39 (0,0%)	7/433 (1,6%)	1,00
LMA amb altres cariotips (n=472)	11/39 (28,2%)	240/433 (55,4%)	0,0020
FLT3 ITD (n=484)	5/38 (13,2%)	93/446 (20,9%)	0,36
Mutacions a NPM1 (n=457)	3/15 (20,0%)	38/442 (8,6%)	0,14
Protocol terapèutic (n=486)			-
SHOP i PETHEMA AML 1996/2001/2002/2007	26 (66,7%)	-	
NOPHO AML 2012	9 (23,1%)	-	
PETHEMA LPA 2005/2012	4 (10,3%)	-	
AAML03P1	-	17 (3,8%)	
AAML0531	-	427 (95,5%)	
CCG2961	-	3 (0,7%)	
MRM≥0,1% a final de la inducció (n=391)	6/29 (20,7%)	104/362 (28,7%)	0,48
SLE (n=486)			0,028
5 anys (95% IC)	70,4% (57,1%-86,8%)	51,2% (46,7%-56,1%)	
10 anys (95% IC)	70,4% (57,1%-86,8%)	-	

SG (n=486)			0,12
5 anys (95% IC)	80,8% (69,0%-94,7%)	65,2% (60,9%-69,9%)	
10 anys (95% IC)	74,1% (58,7%-93,5%)	60,5% (52,8%-69,3%)	

SNC: Sistema nerviós central. ITD: duplicació interna en tàndem. MRM: malaltia residual mesurable. IC: interval de confiança. SLE: supervivència lliure d'esdeveniment. SG: supervivència global.

La firma de 24 miRNA separa dos grups amb diferent supervivència a la cohort de validació

Un cop aplicada la firma de 24 miRNAs a la cohort de TARGET, vam observar que els pacients en el HCA es separaven en dos clústers (Figura 38).

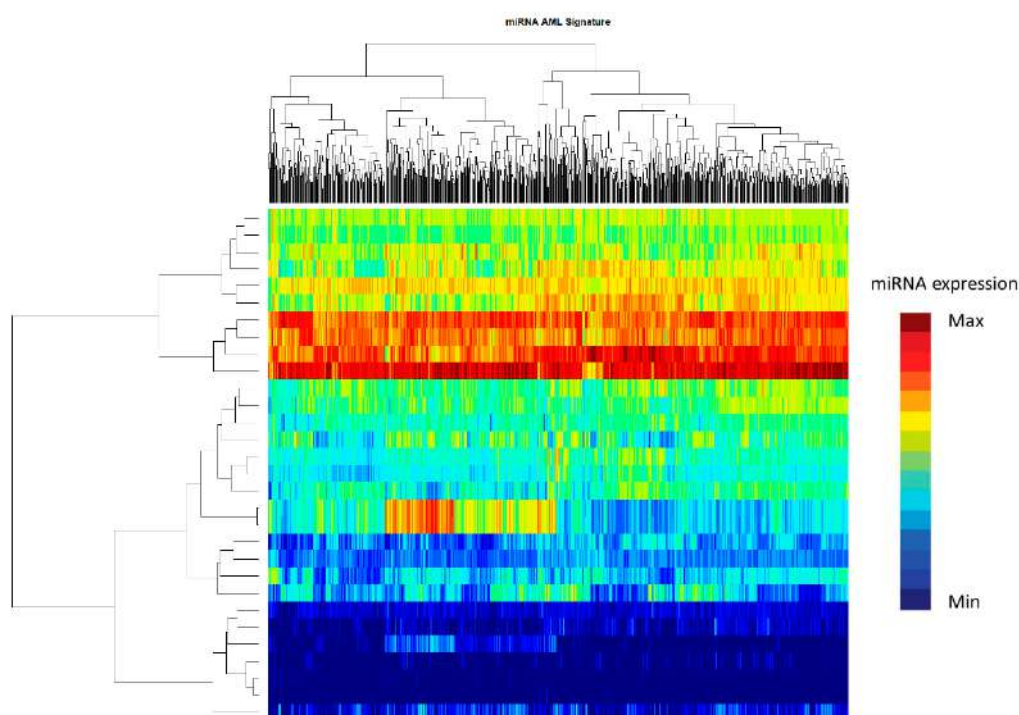


Figura 38: Hierarchical cluster analysis amb l'expressió dels 24 miRNAs a la cohort de TARGET. Max: màxim. Min: mínim. AML: leucèmia mieloide aguda.

A continuació, a l'anàlisi de supervivència vam veure una dicotomització similar de la cohort de TARGET a la que observàvem en la cohort de l'HSJD: dos grups amb diferent supervivència. El primer grup, format per 214 pacients i definit com a PT1AML, presentava de forma significativa una supervivència pitjor, amb una SG del 58,5% (52,1%-65,7%) comparat amb el segon grup format per 233 pacients, PT2AML, amb millor SG del 71,3% (65,6%-77,4%) ($p < 0,0071$). De la mateixa manera que en la nostra cohort també observàvem diferències significatives en la SLE, els pacients agrupats en PT1AML

presentaven una SLE de 41.6% (35.4%-48.9%) en comparació amb els PT2AML amb una SLE de 59.9% (53.4%-66.6%) ($p < 0.0001$). D'aquesta manera, vam confirmar l'impacte pronòstic de la nostra firma de 24 miRNAs en una cohort independent de validació (Figura 39, taula 29).

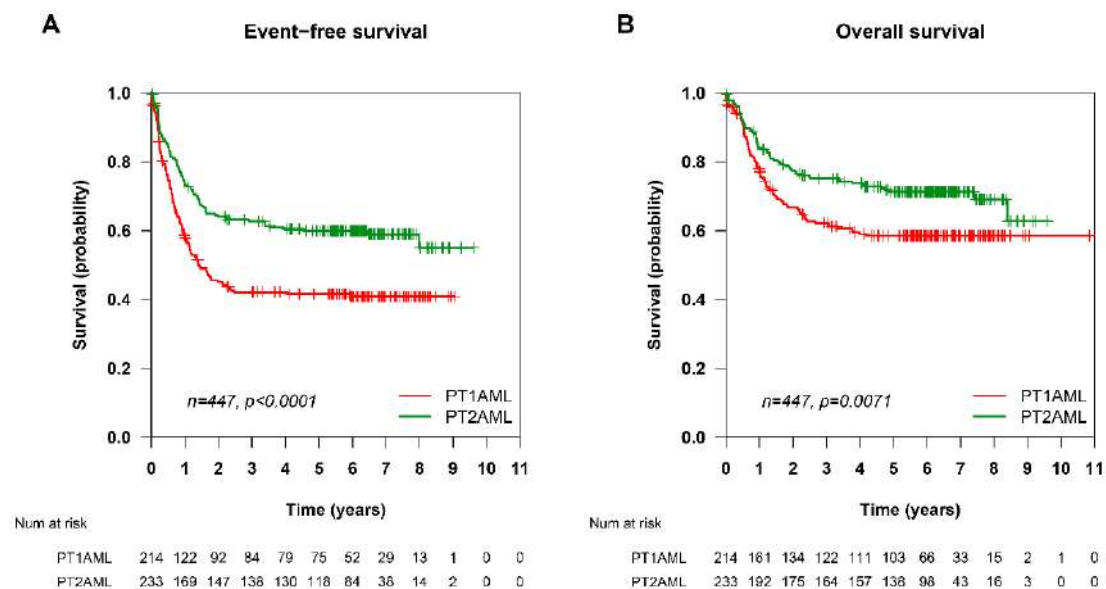


Figura 39: Diferències en la supervivència lliure d'esdeveniment (*event-free survival*) i la supervivència global (*overall survival*) entre els pacients del grup PT1AML i PT2AML definits per l'expressió dels 24 miRNAs en la cohort de validació. *Time (years)*: temps en anys.

Els pacients dels grups PT1AML i PT2AML presenten alteracions genètiques diferents

A la sèrie de validació, els subtipus genètics es distribuïen de forma desigual entre els dos grups PT1AML i PT2AML (Taula 29). El grup PT2AML estava enriquit de manera significativa en grups genètics de bon pronòstic, mentre que el grup PT1AML presentava una major proporció de pacients amb alteracions genètiques adverses.

Taula 29: Característiques clíniques i biològiques dels pacients PT1AML vs. PT2AML.

	PT1AML n=214	PT2AML n=233	p-valor
Sexe (n=447)			0,28
Femení (n=219)	111 (51,9%)	108 (46,4%)	
Masculí (n=228)	103 (48,1%)	125 (53,6%)	
Edat, anys (n=447)			
Mediana [rang]	8,9 [0,0;18,8]	10,5 [0,1;18,9]	0,040
[0,2) anys (n=82)	45 (21,0%)	37 (15,9%)	
[2,10) anys (n=144)	71 (33,2%)	73 (31,3%)	
[10,15) anys (n=124)	57 (26,6%)	67 (28,8%)	0,37
[15,19) anys (n=97)	41 (19,2%)	56 (24,0%)	
Nombre de leucòcits, x10⁹/L mediana [rang] (n=447)	40,5 [0,2;526,0]	30,0 [1,1;473,0]	0,12
Infiltració del SNC (n=447)			0,78
No infiltrat	199 (93,0%)	214 (91,8%)	
Infiltrat	15 (7,0%)	19 (8,2%)	
t(8;21) RUNX1::RUNX1T1 (n=433)	3/209 (1,4%)	63/224 (28,1%)	<0,00001
inv(16) CBFβ::MYH11 (n=433)	4/209 (1,9%)	53/224 (23,7%)	<0,00001
KMT2A-r (n=433)	49/209 (23,4%)	10/224 (4,5%)	<0,00001
t(9;11)(p22;q23) (n=429)	22/207 (10,6%)	3/222 (1,4%)	<0,0001
t(10;11)(p11.2;q23) (n=433)	7/209 (3,3%)	1/224 (0,4%)	0,032
t(11;19)(q23;p13.1) (n=433)	8/209 (3,8%)	3/224 (1,3%)	0,18
LMA amb altres cariotips (n=433)	143/209 (68,4%)	97/224 (43,3%)	<0,00001
FLT3 ITD (n=446)	75/214 (35,0%)	18/232 (7,8%)	<0,00001
Mutacions a NPM1 (n=442)	33/212 (15,6%)	5/230 (2,2%)	<0,0001
Protocol terapèutic (n=447)			
AAML03P1 (n=17)	8 (3,7%)	9 (3,9%)	
AAML0531 (n=427)	203 (94,9%)	224 (96,1%)	0,24
CCG2961 (n=3)	3 (1,4%)	0 (0,0%)	
MRM≥0,1% a final de la inducció (n=362)	49/170 (28,8%)	55/192 (28,6%)	1,00
SLE (n=447)			<0,0001
5 anys (95% IC)	41,6% (35,4%-48,9%)	59,9% (53,4%-66,6%)	
10 anys (95% IC)	-	-	
SG (n=447)			0,0071
5 anys (95% IC)	58,5% (52,1%-65,7%)	71,3% (65,6%-77,4%)	
10 anys (95% IC)	58,5% (52,1%-65,7%)	-	

SNC: sistema nerviós central. MRM: malaltia residual mesurable. SLE: supervivència lliure d'esdeveniment. SG: supervivència global.

IC: interval de confiança.

Anàlisi de la relació entre la firma de 24-miRNAs i l'score pLSC6 en un subgrup de 64 pacients

Per tal d'estudiar la relació entre la firma trobada i l'score pediàtric (pLSC6), vam calcular l'score en un subgrup de 64 pacients (taula 30) d'entre els 447 pacients de TARGET amb dades disponibles de l'expressió gènica dels gens implicats en l'score. El 37% dels pacients presentaven un score pLSC6 elevat ($\geq 4,08$). En l'anàlisi de la relació entre ambdues variables, vam observar que dins del grup PT1AML hi havia una proporció

significativament major de pacients amb un pLSC6 elevat, en comparació amb el grup PT2AML, els quals majoritàriament presentaven un pLSC6 baix (Taula 31). També vam analitzar la correlació entre l'expressió dels 24 miRNAs i l'expressió dels gens del pLSC6. La majoria dels miRNAs de la nostra firma presentaven correlacions (positives i negatives) estadísticament significatives amb els gens de *l'score* (Figura 40). Posteriorment, vam repetir el mateix anàlisi amb el LSC17, i també vam trobar una correlació entre els 24 miRNAs i els gens del LSC17 dins del mateix subconjunt de 64 pacients.

Taula 30: Principals característiques clíniques i biològiques dels 64 pacients de la base de TARGET amb dades disponibles d'expressió dels gens implicats en el *pediatric leukemic stem cell score* 6 (pLSC6) i el *leukemic stem cell score* 17 (LSC17).

Pacients	Total no. (%) 64 (100%)
Sexe (n=64)	
Femení	27 (42,2%)
Masculí	37 (57,8%)
Firma de 24-miRNAs (n=64)	
P1TAML	33 (51,6%)
P2TAML	31 (48,4%)
Edat, anys (n=64)	
Mediana [rang]	11,4 [1,6-18,2]
[0,2) anys	3 (4,7%)
[2,10) anys	22 (34,4%)
[10,15) anys	19 (29,7%)
[15,19) anys	20 (31,2%)
Nombre de leucòcits, x10⁹ /L, mediana [rang] (n=64)	46,1 [3,1-473,0]
Malaltia a SNC (n=64)	
No infiltrat	55 (85,9%)
Infiltrat	9 (14,1%)
t(8;21) RUNX1::RUNX1T1 (n=62)	14 (22,6%)
inv(16) CBFβ::MYH11 (n=62)	7 (11,3%)
KMT2A-r (n=62)	8 (12,9%)
t(9;11)(p22;q23) (n=61)	3 (4,9%)
t(10;11)(p11.2;q23) (n=62)	0 (0,0%)
t(11;19)(q23;p13.1) (n=62)	1 (1,6%)
LMA amb altres cariotips (n=62)	32 (51,6%)
FLT3 ITD (n=64)	20 (31,3%)
Mutacions a NPM1 (n=64)	9 (14,1%)
Protocol terapèutic (n=64)	
AAML03P1	2 (3,1%)
AAML0531	60 (93,8%)
CCG2961	2 (3,1%)
pLSC6 (n=64)	
Baix pLSC6 (<4,08)	40 (62,5%)
Elevat pLSC6 (≥4,08)	24 (37,5%)
MRM≥0,1% a final de la inducció (n=56)	14 (25,0%)

SNC: sistema nerviós central. ITD: duplicació interna en tàndem. pLSC6: *pediatric leukemic stem cell score*. MRM: malaltia residual mesurable.

Taula 31: Correlació entre els grups definits per la firma de 24 miRNAs (PT1AML i PT2AML) i els grups definits en funció dels valors del *pediatric leukemic stem cell score 6* (baix pLSC6 i elevat pLSC6).

		<i>P1TAML</i>	<i>P2TAML</i>	<i>p-valor</i>
		<i>n=33</i>	<i>n=31</i>	
				0,00023
Baix pLSC6 (<i>n=40</i>)	<4.08	13 (39,4%)	27 (87,1%)	
Elevat pLSC6 (<i>n=24</i>)	≥4.08	20 (60,6%)	4 (12,9%)	

pLSC6: *pediatric leukemic stem cell score*.

L'anàlisi multivariat confirma la genètica i la MRM com a factors pronòstics

La MRM positiva ($\geq 0,1\%$, avaluada mitjançant citometria de flux) al final de la inducció va ser un factor predictiu d'una pitjor SLE i SG ($p < 0,0001$ per ambdues). Pel que fa a les alteracions genètiques, els pacients que presentaven els gens de fusió *RUNX1::RUNX1T1* i *CBFB::MYH11*, agrupats com LMA CBF, mutacions a *NPM1+* sense *FLT3 ITD*, i aquells *NPM1+/FLT3 ITD+*, presentaren millor SLE ($p < 0,0001$, $p = 0,027$ i $p = 0,032$, respectivament). En canvi, els pacients amb un perfil de mutacions *NPM1-/FLT3 ITD+* presentaren una pitjor SLE ($p = 0,0059$). Les translocacions al gen *KMT2A* amb un *partner* diferent a *MLLT3 t(9;11)* van tenir un impacte dolent en la SG ($p = 0,028$). Pel que fa als protocols de tractament, els més recents van tenir un impacte significatiu millorant la SG ($p = 0,032$). De nou, en la cohort de TARGET, la firma dels 24 miRNAs va predir una pitjor SLE i una SG ($p < 0,0001$ i $p = 0,0075$, respectivament). Finalment, un pLSC6 elevat va ser un factor pronòstic advers tant per la SLE com per la SG ($p < 0,0001$ i $0,0022$, respectivament) (Taula 32).

En el model de Cox per l'anàlisi multivariat, la presència de MRM positiva al final de la inducció ($p < 0,0001$), presentar LMA CBF ($p = 0,00012$) o presentar els perfils mutacionals *NPM1+/FLT3 ITD-* ($p = 0,046$) i *NPM1+/FLT3 ITD+* ($p = 0,039$), continuaven sent factors predictius per a una millor SLE, mentre que només la MRM positiva al final de la inducció ($p = 0,00036$) i les LMA CBF ($p = 0,00062$) van ser factors pronòstics per a la SG (Taula 33). En la subcohort de 64 pacients, només el pLSC6 va predir la supervivència ($p = 0,0012$ i $p = 0,0085$ per a la SLE i la SG, respectivament) (Taula 34).

Taula 32: Model de Cox per a l'anàlisi univariat en la cohort de TARGET.

	SLE			SG		
	HR	p-valor	p-valor global	HR	p-valor	p-valor global
Protocol						
AAML03P1	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
AAML0531	0,77 [0,39;1,49]	0,43	0,12	0,48 [0,24;0,94]	0,032	0,042
CCG2961	2,26 [0,61;8,35]	0,22		1,18 [0,25;5,49]	0,83	
Edat, anys						
[0,2) anys	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
[2,10) anys	0,66 [0,44;0,97]	0,035	0,11	0,66 [0,41;1,05]	0,082	0,15

	SLE			SG		
	HR	p-valor	p-valor global	HR	p-valor	p-valor global
[10,15) anys	0,91 [0,62;1,34]	0,62		0,92 [0,58;1,46]	0,71	
[15,19) anys	0,95 [0,64;1,42]	0,81		1,06 [0,66;1,71]	0,80	
MRM a final de la inducció						
<0,1%	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	-
≥0,1%	2,59 [1,91;3,51]	<0,0001	-	2,47 [1,71;3,55]	<0,0001	
Genètica						
LMA amb altres cariotips	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
Inv(16) + t(8;21)	0,33 [0,22;0,50]	<0,0001		0,34 [0,20;0,56]	<0,0001	
<i>KMT2A-r</i> no t(9;11)	1,39 [0,87;2,22]	0,17	<0,0001	1,78 [1,06;2,98]	0,028	<0,0001
<i>KMT2A-r</i> t(9;11)	0,70 [0,37;1,31]	0,26	1	0,77 [0,37;1,60]	0,48	
<i>NPM1-/FLT3 ITD+</i>	1,65 [1,16;2,37]	0,0059		1,48 [0,96;2,28]	0,076	
<i>NPM1+/FLT3 ITD-</i>	0,39 [0,17;0,90]	0,027		0,42 [0,15;1,15]	0,091	
<i>NPM1+/FLT3 ITD+</i>	0,37 [0,15;0,92]	0,032		0,23 [0,06;0,95]	0,042	
t(6;9)(p23;q34)	0,88 [0,39;2,02]	0,77		0,55 [0,17;1,75]	0,31	
Firma de 24-miRNAs						
P2AML	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
P1AML	1,72 [1,31;2,25]	<0,0001	-	1,55 [1,12;2,13]	0,0075	-
pLSC6 score						
<4,08	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
≥4,08	6,14 [2,64;14,27]	<0,0001	-	4,54 [1,72;11,97]	0,0022	-

MRM: malaltia residual mesurable. HR: *Hazard ratio*. ITD: duplicació interna en tàndem. pLSC6 score: *pediatric leukemic stem cell score*. SLE: supervivència lliure d'esdeveniment. SG: supervivència global.

Taula 33: Model de Cox per a l'anàlisi multivariat en la cohort de TARGET.

	SLE					SG				
	HR	95%	IC	p-valor	p-valor global	HR	95%	IC	p-valor	p-valor global
MRM a final de la inducció:										
<0,1%	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	-	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	-
≥0,1%	2,20	1,59	3,04	<0,0001		2,04	1,38	3,01	0,00036	
Genètica:										
LMA-amb altres cariotips	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	
Inv(16) + t(8;21)	0,38	0,23	0,62	0,00012		0,33	0,17	0,63	0,00062	
KMT2A-r no t(9;11)	1,07	0,61	1,86	0,82	<0,0001	1,52	0,82	2,82	0,18	0,00041
KMT2A-r t(9;11)	0,46	0,18	1,17	0,10		0,60	0,21	1,70	0,34	
NPM1-/FLT3 ITD+	1,22	0,78	1,90	0,38		1,07	0,61	1,81	0,81	
NPM1+/FLT3 ITD-	0,42	0,18	0,98	0,046		0,46	0,16	1,29	0,14	
NPM1+/FLT3 ITD+	0,37	0,15	0,95	0,039		0,26	0,06	1,11	0,070	
t(6;9)(p23;q34)	1,11	0,44	2,82	0,83		0,39	0,09	1,67	0,20	
Firma de 24-miRNAs:										
P2AML	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	-	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	-
P1AML	1,41	0,96	2,08	0,081		1,22	0,77	1,93	0,39	
Protocol terapèutic:										
AAML03P1	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	
AAML0531	-	-	-	-		0,47	0,21	1,03	0,059	

MRM: malaltia residual mesurable. HR: *Hazard Ratio*. IC: interval de confiança. SLE: supervivència lliure d'esdeveniment. SG: supervivència global. ITD: duplicació interna en tàndem.

Taula 34: Anàlisi multivariat en la subcohort de 55 pacients de la base de dades de TARGET amb dades disponibles del *pediatric leukemic stem cell score* 6 (pLSC6), d'expressió dels 24 miRNAs, clíniques i genètiques.

	SLE				SG			
	HR	95%	IC	p-valor	HR	95%	IC	p-valor
MRM a final de la inducció								
<0,1%	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
≥0,1%	1,25	0,50	3,09	0,63	1,09	0,37	3,19	0,88
Firma 24-miRNAs:								
P2AML	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
P1AML	1,28	0,43	3,78	0,66	1,10	0,32	3,75	0,88
pLSC6 score:								
score <4,08	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
score ≥4,08	6,19	2,05	18,68	0,0012	5,84	1,57	21,71	0,0085
Protocol terapèutic:								
AAML03P1	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
AAML0531	-	-	-	-	0,25	0,02	2,71	0,25

MRM: malaltia residual mesurable. HR: *hazard ratio*. IC: interval de confiança. SLE: supervivència lliure d'esdeveniment. SG: supervivència global. pLSC6: *pediatric leukemic stem cell score*.

La combinació de la informació de la MRM, la genètica, el pLSC6 i la firma de 24 miRNAs és la millor per predir la supervivència

Per tal d'avaluar la capacitat predictiva en la supervivència de totes les variables (MRM, genètica, pLSC6 i la firma de 24 miRNAs) de manera individual i combinada vam calcular el valor del C-índex (Taula 35). De manera individual, el pLSC6 va ser la variable amb major capacitat predictiva, tant per a la SLE com per a la SG (C-índex: 0,730 i C-índex: 0,701 respectivament). Pel que fa a la combinació de variables, quan s'utilitzava la informació de les 4 variables: MRM, genètica, pLSC6 i la firma de 24 miRNAs, s'obtenia la millor capacitat predictiva, C-índex: 0,793 per a la SLE i C-índex: 0,769 per a la SG (Taula 35). Afegint la nostra firma de miRNAs a la combinació de MRM, genètica i el pLSC6 incrementava el C-índex per a la SG, però no per a la SLE. La combinació proposada amb

les quatre variables, permetria una millor identificació dels pacients d'alt risc que el pLSC6 de forma individual (Figura 41).

Taula 35: Aplicació del C-índex per avaluar la capacitat predictiva de les diferents variables de forma individual i combinada.

<i>Estimació del C-índex individualment per a cada variable</i>				
	SLE		SG	
	<i>C-índex</i>	<i>E.E.</i>	<i>C-índex</i>	<i>E.E.</i>
MRM+ ($\geq 0,1\%$)	0,560	0,052	0,541	0,058
Genètica	0,717	0,055	0,703	0,063
pLSC6 score ($\geq 4,08$)	0,730	0,049	0,701	0,060
Firma de 24-miRNAs	0,646	0,053	0,653	0,056
<i>Estimació del C-índex combinant dues variables</i>				
	SLE		SG	
	<i>C-índex</i>	<i>E.E.</i>	<i>C-índex</i>	<i>E.E.</i>
MRM+ ($\geq 0,1\%$) + genètica	0,727	0,060	0,709	0,067
MRM+ ($\geq 0,1\%$) + pLSC6 score ($\geq 4,08$)	0,732	0,057	0,698	0,068
MRM+ ($\geq 0,1\%$) + firma de 24-miRNAs	0,677	0,056	0,673	0,055
Genètica + pLSC6 score ($\geq 4,08$)	0,790	0,049	0,752	0,061
Genètica + firma de 24-miRNAs	0,732	0,051	0,731	0,057
pLSC6 score ($\geq 4,08$) + firma de 24-miRNAs	0,733	0,056	0,711	0,057
<i>Estimació del C-índex combinant tres variables</i>				
	SLE		SG	
	<i>C-índex</i>	<i>E.E.</i>	<i>C-índex</i>	<i>E.E.</i>
MRM+ ($\geq 0,1\%$) + genètica + pLSC6 score ($\geq 4,08$)	0,792	0,050	0,755	0,063
MRM+ ($\geq 0,1\%$) + genètica + firma de 24-miRNAs	0,740	0,051	0,734	0,057
MRM+ ($\geq 0,1\%$) + pLSC6 score ($\geq 4,08$) + firma de 24-miRNAs	0,767	0,053	0,733	0,057
Genètica + pLSC6 score ($\geq 4,08$) + firma de 24-miRNAs	0,795	0,047	0,769	0,054
<i>Estimació del C-índex combinant quatre variables</i>				
	SLE		SG	
	<i>C-índex</i>	<i>E.E.</i>	<i>C-índex</i>	<i>E.E.</i>
MRM+ ($\geq 0,1\%$) + genètica + pLSC6 score ($\geq 4,08$) + firma de 24-miRNAs	0,793	0,048	0,769	0,055

MRM: malaltia residual mesurable. SLE: supervivència lliure d'esdeveniment. SG: supervivència global. pLSC6: *pediatric leukemic stem cell score*. E.E: error estàndard.

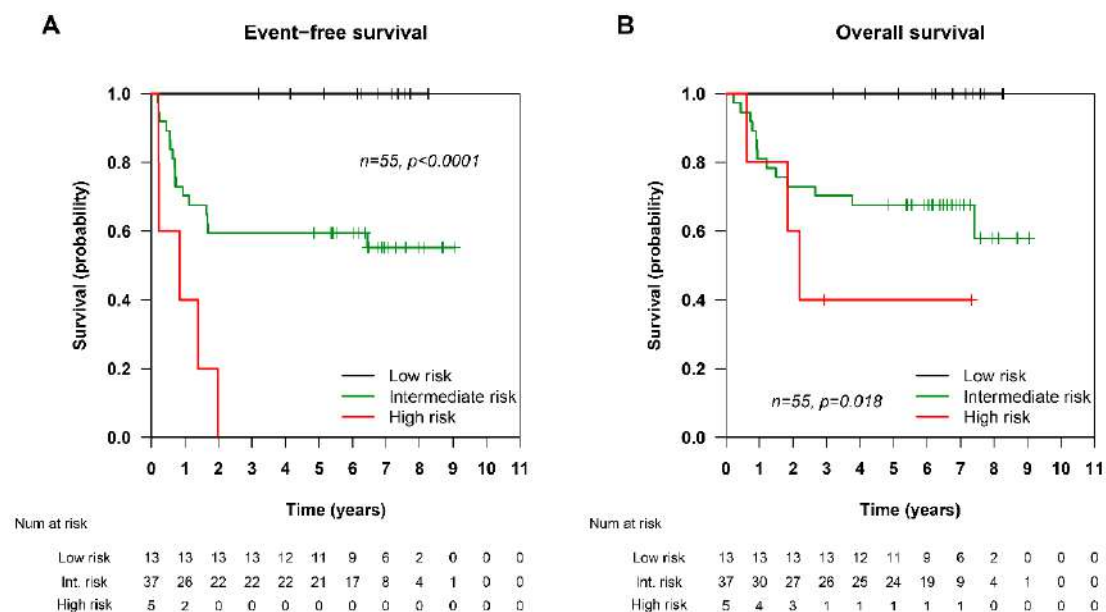


Figura 41: A) Diferències en la supervivència lliure d'esdeveniment (*event-free survival*) i B) la supervivència global (*overall survival*) entre diferents grups de risc formats amb el model d'estratificació proposat combinant la genètica, la MRM, l'*score* pLSC6 i la firma de 24 miRNAs. *Low risk*: baix risc. *Intermediate risk*: risc intermedi. *High risk*: risc advers. *Time (years)*: temps en anys.

En resum, la literatura prèvia ha demostrat que les alteracions genètiques i la *leukemia stemness* tenen un impacte important en la supervivència dels pacients amb LMA, però pocs estudis han analitzat el paper de l'epigenètica. En aquest estudi, hem identificat una firma de 24 miRNAs relacionats amb *stemness* capaç de predir el pronòstic dels pacients pediàtrics amb LMA. A més, hem observat que combinant la informació de la MRM, la genètica, el pLSC6 i la firma de 24 miRNAs obtenim una major capacitat predictiva de la supervivència que analitzant cada una de les variables per separat.

2 Resultats treball adicional:

Determinar el perfil d'expressió dels gens PPPIR-27, CCL23, SCUBE1, PHACTR3 i NRG4 en pacients pediàtrics amb leucèmia aguda

Expressió global dels gens PPPIR-27, CCL23, SCUBE1, PHACTR3 i NRG4 en controls no neoplàsics i pacients amb leucèmia aguda

Per tal de tenir una referència en població no leucèmica dels nivells d'expressió dels gens PPPIR-27, CCL23, SCUBE1, PHACTR3 i NRG4, vam analitzar el seu perfil d'expressió en 10 mostres de moll d'os de controls pediàtrics no neoplàsics i els vam comparar amb una cohort de 57 pacients pediàtrics amb leucèmia aguda (Taula 23, Figura 42).

En general, vam observar en pràcticament tots els controls no neoplàsics una absència d'expressió d'aquests gens i les poques mostres que els expressaven ho feien a nivells baixos; en canvi, els pacients amb leucèmia sí que presentaven expressió dels gens analitzats. Analitzant aquestes dades de manera qualitativa (expressió vs. no expressió), vam observar que l'expressió de CCL23, NRG4, SCUBE1 i PHACTR3 era significativament superior ($p=0,00074$, $p=0,01$, $p=0,05$ i $p=0,024$, respectivament) en pacients amb leucèmia respecte els controls no neoplàsics (Taula 36).

Pel que fa al gen PPPIR-27, vam observar també una tendència a la diferent expressió del gen entre ambdós grups, tot i que no de manera significativa ($p=0,069$).

Taula 36: Associació entre expressió sí/no en el grup de pacients amb leucèmia i els controls no neoplàsics.

		<i>Leucèmia n=57</i>	<i>Controls no neoplàsics n=10</i>	<i>p-valor</i>
PPPPIR-27	Expressió	41 (71,9%)	4 (40,0%)	0,069
	No expressió	16 (28,1%)	6 (60,0%)	
CCL23	Expressió	43 (78,2%)	2 (20,0%)	0,00074
	No expressió	12 (21,8%)	8 (80,0%)	
NRG4	Expressió	37 (64,9%)	2 (20,0%)	0,013
	No expressió	20 (35,1%)	8 (80,0%)	
SCUBE1	Expressió	17 (30,4%)	0 (0,0%)	0,053
	No expressió	39 (69,6%)	10 (100,0%)	
PHACTR3	Expressió	22 (39,3%)	0 (0,0%)	0,024
	No expressió	34 (60,7%)	10 (100,0%)	

D'altra banda, tot i que els pacients amb leucèmia expressaven més aquests gens respecte els controls no neoplàsics, hi havia alguns pacients que no els expressaven (en especial el gen *SCUBE1*). A més, fins i tot en aquells pacients on hi havia expressió, alguns expressaven més que altres, de manera que els pacients amb leucèmia es podien distribuir en tres grups segons l'expressió dels gens analitzats: 1) pacients sense expressió per un gen determinat; 2) pacients amb expressió baixa (per sota del calibrador); 3) pacients amb expressió elevada (igual o per sobre del calibrador) (Figura 42).

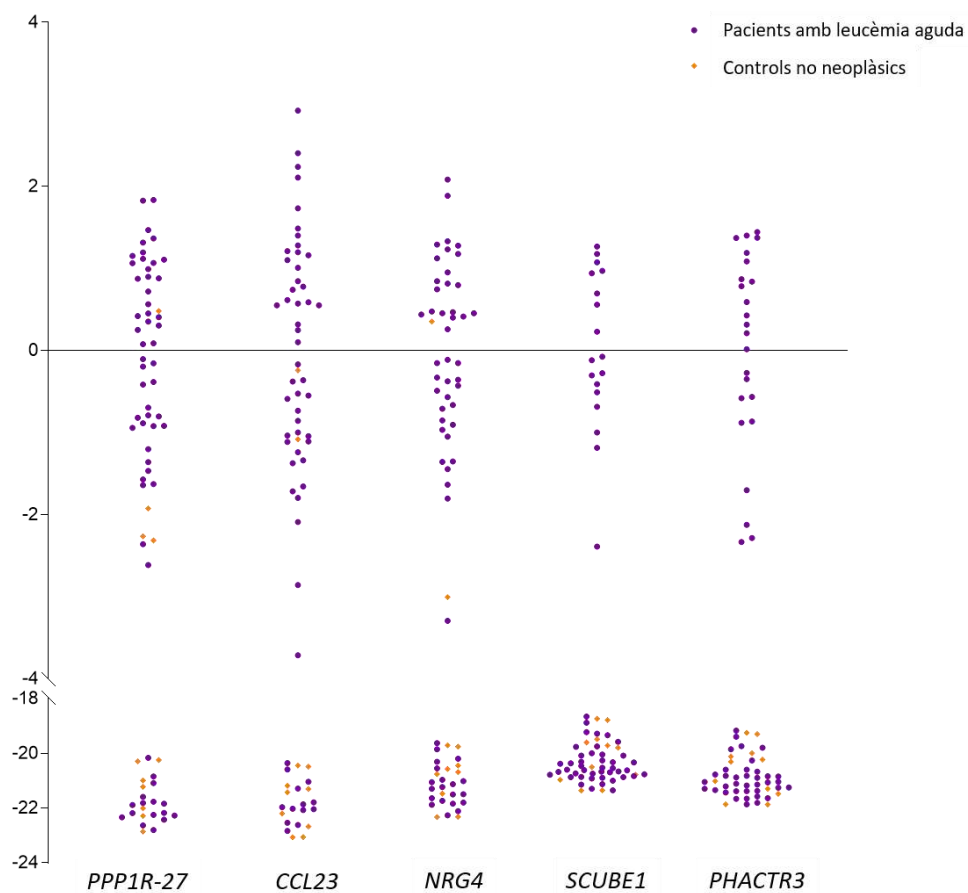


Figura 42: Perfil d'expressió dels gens *PPP1R-27*, *CCL23*, *NRG4*, *SCUBE1* i *PHACTR3* en mostres de pacients pediàtrics amb leucèmia aguda i mostres de controls pediàtrics no neoplàsics.

Els pacients amb leucèmia aguda presenten diferències en l'expressió dels gens *PPPIR-27*, *CCL23*, *SCUBE1*, *PHACTR3* i *NRG4* en funció del llinatge

Donat que entre els pacients amb leucèmia observàvem 3 patrons diferents en l'expressió dels gens estudiats, vam avaluar les diferències d'expressió en funció del llinatge. Pel que fa a l'anàlisi qualitatiu (expressió vs. no expressió), vam observar que, en general, els pacients amb LMA presentaven una major expressió d'aquests gens respecte els pacients amb LLA (incloent LLA-B i LLA-T) (Figura 43). Aquesta major expressió era significativa per als gens *PPPIR-27*, *CCL23*, *NRG4* i *PHACTR3* ($p=0,032$, $p=0,012$, $p=0,0094$ i $p=0,025$, respectivament) (Taula 37). D'altra banda, també vam analitzar l'expressió de manera quantitativa només en els pacients que presentaven expressió. En aquest sentit, també vam observar que els pacients amb LMA presentaven una expressió significativament més elevada dels gens *PPPIR-27*, *CCL23*, *NRG4* i *SCUBE1* respecte els pacients amb LLA (Taula 38). A destacar, el gen *SCUBE1* no presentava diferències significatives d'expressió entre pacients amb LMA i LLA quan vam analitzar les dades de manera qualitativa, però sí en l'anàlisi quantitativa. En general, en l'anàlisi global de les dades, vàrem observar que els pacients amb LMA sobreexpressaven aquests gens respecte els pacients amb LLA.

Taula 37: Associació entre expressió sí/no dels gens *PPPIR-27*, *CCL23*, *NRG4*, *SCUBE1* i *PHACTR3* i el llinatge, comparant la leucèmia limfoblàstica aguda i la leucèmia mieloide aguda.

		LLA=28	LMA n=29	<i>p</i> -valor
<i>PPPIR-27</i>	Expressió	16 (57,1%)	25 (86,2%)	0,032
	No expressió	12 (42,9%)	4 (13,8%)	
<i>CCL23</i>	Expressió	16 (61,5%)	27 (93,1%)	0,012
	No expressió	10 (38,5%)	2 (6,9%)	
<i>NRG4</i>	Expressió	13 (46,4%)	24 (82,8%)	0,0094
	No expressió	15 (53,6%)	5 (17,2%)	
<i>SCUBE1</i>	Expressió	5 (18,5%)	12 (41,4%)	0,12
	No expressió	22 (81,5%)	17 (58,6%)	
<i>PHACTR3</i>	Expressió	6 (22,2%)	16 (55,2%)	0,025
	No expressió	21 (77,8%)	13 (44,8%)	

Taula 38: Anàlisi quantitativa de l'expressió entre leucèmia limfoblàstica aguda vs. leucèmia mieloide aguda en els pacients que expressaven els gens *PPP1R-27* (n=41), *CCL23* (n=43), *NRG4* (n=37), *SCUBE1* (n=17) i *PHACTR3* (n=22).

	LLA n=16	LMA n=25	<i>p</i> -valor
<i>PPP1R-27</i>	-0,93 [-2,61;0,88]	0,72 [-1,57;1,84]	<0,0001
	LLA n=16	LMA n=27	<i>p</i> -valor
<i>CCL23</i>	-1,04 [-3,71;0,25]	0,78 [-2,09;2,92]	<0,0001
	LLA n=13	LMA n=24	<i>p</i> -valor
<i>NRG4</i>	-0,90 [-3,29;0,46]	0,47 [-1,44;2,09]	0,00037
	LLA n=5	LMA n=12	<i>p</i> -valor
<i>SCUBE1</i>	-1,00 [-2,39;-0,07]	0,63 [-0,51;1,27]	0,019
	LLA n=6	LMA n=16	<i>p</i> -valor
<i>PHACTR3</i>	-0,42 [-2,33;1,44]	0,69 [-2,28;1,40]	0,29

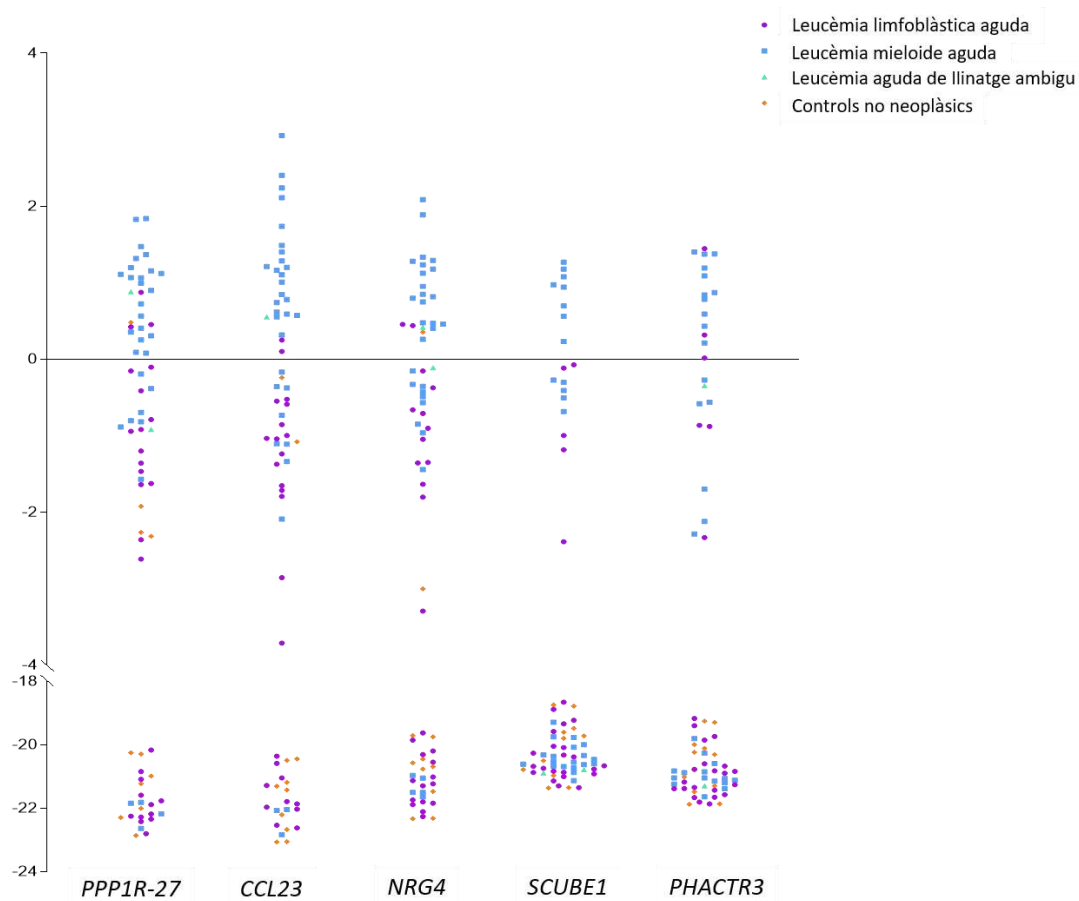


Figura 43: Perfil d'expressió dels gens *PPP1R-27*, *CCL23*, *NRG4*, *PHACTR3* i *SCUBE1* en mostres de pacients amb leucèmia limfoblàstica aguda (lila), leucèmia mieloide aguda (blau), leucèmia aguda de llinatge ambigu (verd) i controls no neoplàsics (taronja).

En la cohort global de pacients amb leucèmia aguda, no hi ha diferències en l'expressió dels gens *CCL23*, *NRG4*, *PHACTR3* i *SCUBE1* entre els pacients que presenten reordenament del gen *KMT2A* i els pacients sense la fusió

Lagace *et al.*, van observar una relació entre la sobreexpressió d'aquests gens i el reordenament de *KMT2A* en pacients amb LMA. Seguint aquesta idea, vam estudiar en la nostra cohort global de pacients les diferències d'expressió entre els pacients amb leucèmia i *KMT2A*-r vs. pacients amb leucèmia sense reordenament de *KMT2A*. De la cohort total de pacients, 40 pacients presentaven *KMT2A*-r (21 pacients amb LLA i 19 pacients amb LMA) i 10 *KMT2A* no reordenat (7 pacients amb LLA i 10 pacients amb LMA). Vam observar, tant de manera qualitativa (expressió vs. no expressió) com de manera quantitativa, que en aquells pacients que presentaven expressió, no hi ha havia diferències estadísticament significatives en quant a l'expressió dels gens *CCL23*, *NRG4*, *SCUBE1* i *PHACTR3*. Pel que fa al gen *PPPIR-27*, els pacients amb *KMT2A*-r sobreexpressaven aquest gen de manera significativa (pacients sense reordenament de *KMT2A* (-0.80 [-1.57;1.07]) vs. pacients amb *KMT2A*-r (0.44 [-2.61;1.84]); $p=0.034$) respecte els pacients sense el reordenament. Posteriorment, vam realitzar els mateixos anàlisis separant els pacients segons el llinatge de la leucèmia.

No existeixen diferències significatives en l'expressió dels gens *PPPIR-27*, *CCL23*, *NRG4*, *PHACTR3* i *SCUBE1* entre els pacients amb leucèmia limfoblàstica aguda i reordenaments del gen *KMT2A* i els pacients sense la fusió

Dels 27 pacients amb LLA estudiats (25 LLA-B i 3 LLA-T), 21 pacients presentaven *KMT2A*-r. En l'anàlisi qualitatiu, no vam trobar diferències d'expressió entre els pacients amb LLA *KMT2A*-r respecte els pacients amb *KMT2A* no reordenat. Pel que fa l'anàlisi quantitatiu, només es van estudiar els gens *PPPIR-27*, *CCL23* i *NRG4* degut a que només hi havia un pacient sense reordenaments de *KMT2A* que expressés els altres dos gens. En aquest cas, tampoc vam observar diferències. Tot i així, cal esmentar que aquesta cohort de pacients és molt reduïda i presenta un biaix amb poca representació de pacients sense reordenaments de *KMT2A*, de manera que caldrien més estudis amb sèries de pacients més nombroses i representatives per a confirmar aquests resultats.

Els pacients amb leucèmia mieloide aguda i reordenaments de *KMT2A* presenten, en general, una expressió significativament superior dels gens estudiats respecte els pacients sense la fusió

Vam analitzar l'expressió dels gens *PPPIR-27*, *CCL23*, *SCUBE1*, *PHACTR3* i *NRG4* en 29 pacients amb LMA, dels quals, 19 presentaven *KMT2A-r*. En l'estudi qualitatiu (expressió vs. no expressió), vam observar que els pacients amb *KMT2A-r* expressaven els gens *NRG4*, *SCUBE1* i *PHACTR3* en proporció significativament superior als pacients sense el reordenament, que no els expressaven ($p=0.036$, $p=0.019$ i $p=0.016$, respectivament). No vam observar diferències significatives per a *PPPIR-27* i *CCL23* (taula 39). En canvi, en l'estudi quantitatiu, *PPPIR-27* i *CCL23* eren sobreexpressats de manera significativa (*PPPIR-27* $p=0.00035$, i *CCL23* $p=0.00027$) en els pacients *KMT2A-r* respecte la resta de pacients (taula 40, Figura 44). En aquest últim estudi quantitatiu, el gen *SCUBE1* no es va poder analitzar degut al baix nombre de pacients sense el reordenament de *KMT2A* que expressaven aquest gen.

Taula 39: Associació entre expressió sí/no i la leucèmia mieloide aguda amb reordenament de *KMT2A*.

		<i>KMT2A no reordenat, n=10</i>	<i>KMT2A-r, n=19</i>	<i>p-valor</i>
<i>PPPIR-27</i>	Expressió	8 (80,0%)	17 (89,5%)	0,59
	No expressió	2 (20,0%)	2 (10,5%)	
<i>CCL23</i>	Expressió	9 (90,0%)	18 (94,7%)	1,00
	No expressió	1 (10,0%)	1 (5,3%)	
<i>NRG4</i>	Expressió	6 (60,0%)	18 (94,7%)	0,036
	No expressió	4 (40,0%)	1 (5,3%)	
<i>SCUBE1</i>	Expressió	1 (10,0%)	11 (57,9%)	0,019
	No expressió	9 (90,0%)	8 (42,1%)	
<i>PHACTR3</i>	Expressió	2 (20,0%)	14 (73,7%)	0,016
	No expressió	8 (80,0%)	5 (26,3%)	

Taula 40: Comparació de l'expressió dels gens *PPPIR-27*, *CCL23*, *NRG4* i *PHACTR3* en pacients amb leucèmia mieloide aguda amb reordenaments del gen *KMT2A* vs. pacients amb leucèmia aguda mieloide sense reordenaments del gen *KMT2A*.

	<i>KMT2A no reordenat, n=8</i>	<i>KMT2A-r, n=17</i>	<i>p-valor</i>
<i>PPPIR-27</i>	-0,50 [-1,57;1,07]	1,07 [-0,38;1,84]	0,00035
	<i>KMT2A no reordenat, n=9</i>	<i>KMT2A-r, n=18</i>	<i>p-valor</i>
<i>CCL23</i>	-0,73 [-2,09;1,20]	1,19 [-0,38;2,92]	0,00027
	<i>KMT2A no reordenat, n=6</i>	<i>KMT2A-r, n=18</i>	<i>p-valor</i>
<i>NRG4</i>	-0,24 [-1,44;1,89]	0,61 [-0,96;2,09]	0,49
	<i>KMT2A no reordenat, n=2</i>	<i>KMT2A-r, n=14</i>	<i>p-valor</i>
<i>PHACTR3</i>	-0,63 [-2,12;0,87]	0,69 [-2,28;1,40]	0,60

Analitzant la Figura 43, vam observar que, tot i que els pacients amb LMA i *KMT2A-r* presentaven una mitjana d'expressió dels gens *SCUBE1* i *PHACTR3* superior respecte els pacients sense el reordenament, també hi havia un grup de pacients *KMT2A-r* que no presentaven expressió d'aquests gens. Els pacients *KMT2A-r* expressaven pràcticament tots els gens *PPPIR-27*, *CCL23* i *NRG4*, amb excepció d'un (*CCL23*, *NRG4*) o dos casos (*PPPIR-27*). Pel contrari, el nombre de pacients *KMT2A-r* que no expressaven *SCUBE1* i *PHACTR3* era superior (marcats amb un cercle vermell a la Figura 44). Per aquest motiu, vam decidir explorar quines diferències podia haver-hi dins del grup de pacients amb LMA i *KMT2A-r* que poguessin estar associades a diferències en l'expressió de *SCUBE1* i *PHACTR3*.

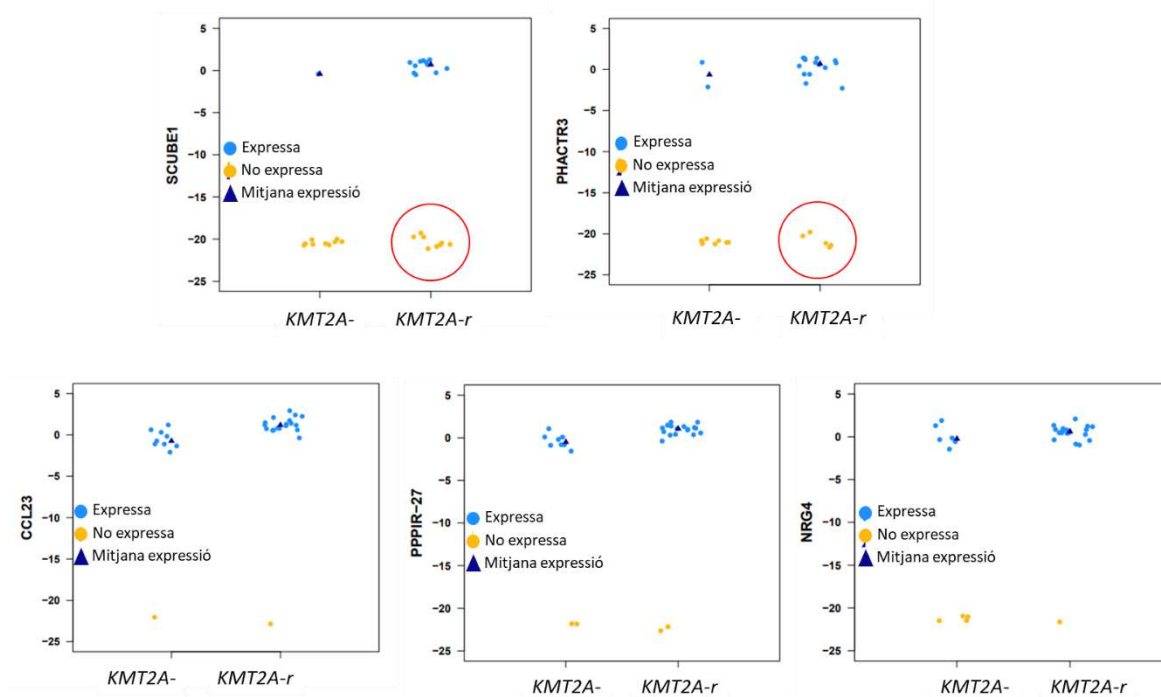


Figura 44: Perfil d'expressió dels gens *PPP1R-27*, *CCL23*, *NRG4*, *PHACTR3* i *SCUBE1* en mostres de pacients pediàtrics amb leucèmia mieloide aguda. Els punts blaus representen els pacients que expressen aquests gens, els punts grocs els pacients que no expressen aquests gens i el triangle la mitjana d'expressió de cada gen. Alguns pacients amb *KMT2A-r* (marcats amb un cercle vermell) no expressaven els gens *SCUBE1* i *PHACTR3*.

Els pacients amb leucèmia mieloide aguda i reordenaments del gen *KMT2A* no presenten diferències significatives en l'expressió dels gens analitzats segons l'edat, el *partner* de *KMT2A* o el número de leucòcits

Vam estudiar si hi havia diferències d'expressió dins del grup de pacients amb LMA i *KMT2A-r* en funció de variables clíniques i biològiques (número de leucòcits, edat, i *partner* de *KMT2A*). Com en els anteriors apartats, vam estudiar les variables tant de manera quantitativa com qualitativa. No vam trobar diferències d'expressió en funció del *partner* de *KMT2A* (*MLLT3*, *MLLT10*, *ABI1*, *ELL1*), ni en l'edat (categoritzada com <2 anys i ≥2 anys i [0,2) anys, [2,10) anys, [10,15) anys i [15,19) anys) ni en funció del número de leucòcits al diagnòstic.

L'expressió del gen *PHACTR3* en pacients amb leucèmia mieloide aguda i reordenaments del gen *KMT2A* mostra diferències no significatives en la supervivència

D'altra banda, també vam analitzar l'associació entre l'expressió d'ambdós gens (*SCUBE1* i *PHACTR3*) i la supervivència (SLE i SG) dels pacients. No vam trobar diferències significatives, però en el cas de *PHACTR3* vam observar dos grups amb diferent supervivència (Figura 45). El grup de 14 pacients que expressaven el gen *PHACTR3* presentava una supervivència pitjor als 5 anys (SG 64,3% (43,5%-95%), i SLE 57,1% (36,3%-89,9%)) respecte a un segon grup de 5 pacients que no expressaven *PHACTR3* i que van mostrar una supervivència excel·lent amb SG i SLE del 100% als 5 anys. Nogensmenys, el nombre de pacients en cada grup és molt baix i les diferències entre els dos grups no són significatives, pel que aquesta troballa s'hauria de confirmar en una sèrie ampliada de pacients.

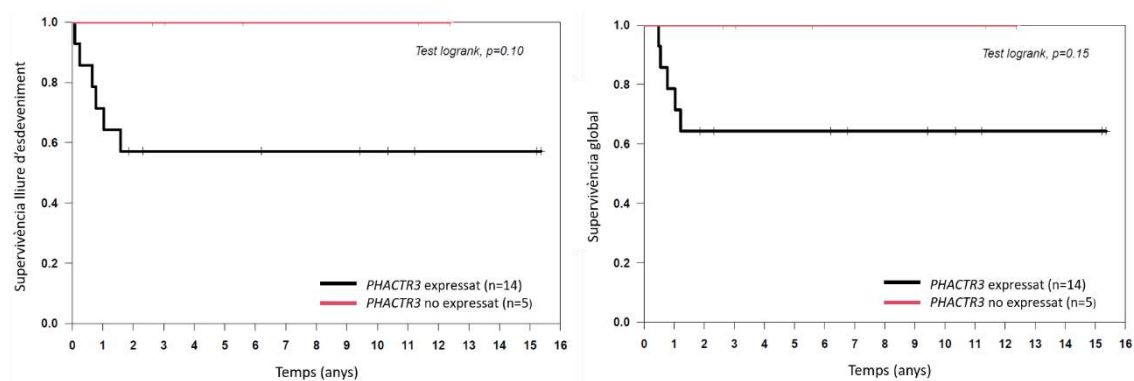


Figura 45: Diferències en la supervivència lliure d'esdeveniment (*event-free survival*) i la supervivència global (*overall survival*) entre dos grups de pacients amb LMA i *KMT2A-r* segons l'expressió de *PHACTR3*.

En conclusió, el número de pacients en la sèrie estudiada al treball addicional és baix i presenta un biaix amb enriquiment en pacients *KMT2A-r*, fet que impedeix establir conclusions significatives. Tot i així, l'anàlisi preliminar posa de manifest la sobreexpressió dels gens *PPPIR-27*, *CCL23*, *NRG4*, *SCUBE1* i *PHACTR3* en pacients pediàtrics amb LMA. D'altra banda, els 5 pacients amb *KMT2A-r* i absència d'expressió del gen *PHACTR3* van mostrar una supervivència excel·lent sense esdeveniments als 5 anys. En global, aquest anàlisi ens ha permès observar una possible associació entre els gens proposats com a biomarcadors del gen *KMT2A* en pacients amb LMA i la supervivència. Malgrat això, són

encara necessaris estudis en sèries més nombroses i representatives per a intentar correlacionar la sobreexpressió dels gens *PPP1R-27*, *CCL23*, *NRG4*, *PHACTR3* i *SCUBE1* amb la presència del reordenament de *KMT2A* i per a confirmar el seu potencial ús com a factors pronòstics.

DISCUSSION

DISCUSSIÓ

Leucèmia aguda pediàtrica: curar més i curar millor, una assignatura pendent

Tot i que la taxa de supervivència dels pacients amb leucèmia aguda ha augmentat en els darrers anys, segueix sent la principal causa de mortalitat relacionada amb càncer en l'edat pediàtrica. A més, els efectes secundaris al tractament, tant a curt com a llarg termini, impacten en gran manera en la qualitat de vida no només dels pacients, sinó també dels familiars. Això posa de manifest la necessitat de la cerca de nous biomarcadors que permetin millorar el diagnòstic i aplicar una medicina personalitzada, ajustant el tractament segons el risc de cada pacient. Per això, cal trobar nous marcadors genètics i epigenètics, diagnòstics i pronòstics, que permetin refinar l'estratificació dels pacients en els diferents grups de risc. Actualment, diferents variables clíniques i biològiques, entre les quals les aberracions genètiques al diagnòstic, conjuntament amb els nivells de MRM, s'utilitzen de forma habitual com a biomarcadors pronòstics. Les vies de *stemness* regulades per NOTCH, WNT/ β -catenina, HOX i FLT3, entre altres, solen trobar-se alterades en pacients amb leucèmia. Diversos estudis han demostrat que l'expressió gènica, les aberracions genètiques i, en el cas de les LMA, el grau de *stemness* de la leucèmia, tenen impacte en el pronòstic dels pacients (71,160–162,280,388–392). Així, Fornerod et al. han proposat un model de classificació dels pacients pediàtrics amb LMA que integra la genètica, la identitat transcripcional i el grau de *stemness* mesurat pel pLSC6 score. Aquest model permet identificar els pacients d'alt risc millor que amb l'ús individual dels factors clàssics. Està descrit l'ús de miRNAs com a biomarcadors per predir la recaiguda i millorar l'estratificació en grups de risc (393). Tanmateix, a dia d'avui hi ha pocs estudis que hagin explorat el rol de l'epigenètica en aquest context. En aquesta tesi, hem estudiat el paper dels marcadors genètics i epigenètics (en particular els miRNAs) implicats en l'auto-renovació de les HSC i les vies de *stemness* en pacients pediàtrics amb leucèmia aguda d'alt risc. Hem analitzat l'expressió d'una selecció de 89 miRNAs i hem identificat una firma de 24 miRNAs relacionada amb el grau de *stemness* capaç de predir la supervivència en els pacients pediàtrics amb LMA. Així mateix, hem observat que la combinació de la MRM, la genètica, el pLSC6 (com a marcador de *stemness*) i la firma de 24 miRNAs, té una major capacitat predictiva de la supervivència que cada una de les variables de manera individual.

D'altra banda, hem analitzat (tant en pacients amb LLA com LMA) l'expressió dels gens *PPP1R27*, *CCL23*, *SCUBE1*, *PHACTR3* i *NRG4*, prèviament descrits com a possibles biomarcadors distintius de la fusió del gen *KMT2A* en pacients pediàtrics amb LMA (220). Hem observat que aquests gens es troben significativament sobreexpressats en pacients amb LMA respecte els pacients amb LLA. A més, les anàlisis preliminars suggereixen que els pacients amb LMA i *KMT2A-r* presenten major expressió d'aquests gens respecte els pacients sense el reordenament, el que recolza la idea de que poguessin considerar-se com a biomarcadors de les fusions de *KMT2A*. Finalment, també hem observat en els pacients amb LMA i *KMT2A-r* una associació entre l'absència d'expressió del gen *PHACTR3* i una millor supervivència.

L'expressió dels miRNAs en els pacients amb leucèmia aguda permet diferenciar la seva evolució

En el primer dels treballs, vàrem analitzar el paper d'una sèrie de miRNAs relacionats amb el grau de *stemness* en el pronòstic dels pacients pediàtrics amb leucèmia aguda. Globalment, a l'estudi no supervisat, l'expressió dels miRNAs segregava els nostres pacients per llinatges (Figura 29), fet que ha estat prèviament descrit (391,392,394). De forma interessant, els diferents clústers que es van formar es correlacionaven amb diferents supervivències en ambdós llinatges. En el cas de les LLA, aquestes diferències no van ser significatives, probablement degut a que els pacients amb LLA ja presenten molt bona supervivència i per tant el número d'esdeveniments en aquest grup era baix i la sèrie limitada. Tanmateix, resultaria de gran interès analitzar un major número de casos de LLA per tal de confirmar el paper dels miRNAs relacionats amb *stemness* en el pronòstic en aquests pacients. En canvi, en els pacients amb LMA, el perfil d'expressió de miRNAs va permetre identificar un grup de pacients amb una SG i SLE significativament pitjor. Aquest grup el vam definir com a P1AML. La resta de pacients van quedar agrupats en el grup P2AML (Figura 32).

Els grups P1AML i P2AML inclouen la majoria de categories moleculars

Vam identificar una firma de 24 miRNAs diferencialment expressats entre ambdós grups: els pacients del grup P1AML infraexpressaven 23 miRNAs i sobreexpressaven 1 miRNA, comparat amb el grup P2AML. El llistat dels 24 miRNAs es troba a la Taula 25. Globalment,

les nostres anàlisis suggereixen una major activació en les vies de *stemness* en els pacients P1AML. Excepte pel que fa a la supervivència, P1AML i P2AML no presentaven diferències significatives en la resta de variables clíniques o biològiques, i ambdós grups presentaven la majoria de categories moleculars (Taula 24). Tot i així, tots els pacients amb la fusió *PML::RARA* es trobaven en el grup P2AML, mentre que tots els casos amb mutació a *NPM1* s'agrupaven al grup P1AML. Donat que els casos amb *PML::RARA* són leucèmies més diferenciades, podríem esperar que presentessin nivells baixos d'activació de vies de *stemness* i per això s'agruparien amb els pacients del grup P2AML. Alternativament, la firma de 24 miRNAs podria ser un indicador o *surrogate* de la seva genètica subjacent de bon pronòstic. D'altra banda, tot i associar-se amb bon pronòstic, els casos de *NPM1* mutats es trobaven en el grup P1AML; en aquest cas, l'explicació podria estar en l'augment de la regulació i sobreexpressió dels gens *HOX*, característic dels pacients amb leucèmia i mutació de *NPM1* (395,396).

Els 24 miRNAs que formen la firma tenen funcions rellevants en la carcinogènesi

En general, els miRNAs tenen funcions i interaccions diverses i complexes, i participen en la majoria de vies de senyalització descrites. Dependent del context cel·lular, el grau de maduresa, o el teixit, poden presentar diferents funcions i actuar com a miRNAs supressors de tumors o com a oncomiRs (250,289,397–402). Globalment, vam observar que els 24 miRNAs de la nostra firma es troben implicats en la regulació de *stemness*, en la diferenciació i proliferació cel·lular i, a més, la firma també està enriquida en miRNAs involucrats en carcinogènesi, desenvolupament i progressió del càncer (Figura 34). A la firma trobem 23 miRNAs infraexpressats, el que faria pensar teòricament en una sobreexpressió resultant dels seus gens diana, ja que la majoria de miRNAs infraexpressats en aquest context presenten funcions de supressors de tumors (403). S'ha descrit que el hsa-miR-223-3p inhibeix la proliferació cel·lular i augmenta l'apoptosi en les cèl·lules de LMA (404). En la mateixa línia, el seu augment de regulació i expressió s'ha associat a un millor pronòstic en pacients amb LLA (282). El hsa-miR-193a-3p juga un paper important en la progressió de la LMA (365,405): la seva regulació correcta estimula l'apoptosi i la diferenciació blàstica mitjançant la inhibició de *RUNX1::RUNX1T1* i altres reguladors epigenètics. Una menor expressió de hsa-miR-181a-5p s'associa amb un pitjor pronòstic en la LMA (406,407). Hsa-miR-181a-5p regula *KRAS*, *NRAS* i *MAPK1*, disminuint

el creixement de cèl·lules leucèmiques, pel que un augment de la regulació d'aquest miRNA disminueix la proliferació, actuant com a supressor de tumors. En les LMA amb reordenaments de *KMT2A*, s'ha observat una regulació a la baixa del hsa-miR-34b-5p dirigida a *CDK4*, *BCL2*, *RAS* i *HOX* (405). A més, hsa-miR-34b-5p suprimeix la proliferació i supervivència de les cèl·lules de LMA en dirigir-se al factor de transcripció de xoc tèrmic (*HSF1*), el que condueix a una inactivació de Wnt/ β -catenina (37,408). Pel contrari, l'únic miRNA sobreexpressat en la nostra firma, hsa-miR-9-5p, promou la proliferació i inhibeix l'apoptosi, actuant com a oncomiR en els casos amb LMA i reordenaments de *KMT2A* (325).

El perfil de 24 miRNAs està relacionat amb les vies d'immaduresa

Tal i com esperàvem, diversos miRNAs de la nostra firma es troben relacionats amb les vies de *stemness*. Gens relacionats amb les vies de *stemness* com *SOCS2* o *SP1* són dianes potencials de 7 i 8 miRNAs de la nostra firma, respectivament. Altres potencials gens dianes de diversos miRNAs de la nostra firma són *CD34*, *MBNL3* o *ADGRG1*, tots ells implicats en la senyalització, regulació de la transcripció, regulació dels miRNAs o vies de *stemness* (409–412). També vam voler analitzar la relació entre la firma de 24 miRNAs i els *scores* LSC17 i pLSC6 (160,161), analitzant els llocs d'unió complementaris entre els miRNAs i els gens que formen part dels *scores*. Aquesta anàlisi ens va permetre observar que els miRNAs de la nostra firma regulen i tenen com a diana diversos gens implicats en ambdós *scores* (Figures 34 i 39). Tot i així, cal remarcar que no disposem de proves directes de l'expressió dels miRNAs a nivells funcionals en les cèl·lules mare hematopoètiques normals; per tant, no podem assumir que la infraexpressió dels miRNAs de la nostra firma causi una expressió aberrant d'aquestes dianes. Tot i observar relació entre els 24 miRNAs i les vies de *stemness*, només 10 dels 24 miRNAs presenten llocs d'unió als gens relacionats amb LSC17 i pLSC6.

El perfil de 24 miRNAs prediu la supervivència de forma global i no pot simplificar-se

Veient que no tots els miRNAs de la nostra firma tenien llocs d'unió als gens dels *scores*, i amb la idea de facilitar la seva aplicabilitat clínica, ens vam plantejar la reducció de la firma des de tres escenaris i anàlisis diferents. El primer va ser la correlació de la firma amb els *scores* de *stemness*; el segon va ser l'efecte de cada miRNA individualment en la

SLE i la SG, dicotomitant l'expressió del miRNA; el tercer, reduir el punt de tall de significança de manera més estricta. Aplicant aquests criteris de simplificació vam veure que d'una manera o altra es perdia informació valuosa i que globalment els 24 miRNAs de la firma podien contribuir a l'efecte predictiu sobre els resultats.

Validació de la firma de 24 miRNAs en una cohort independent

El número limitat de pacients i el biaix en la selecció de casos amb reordenament de *KMT2A* en la nostra sèrie ens va portar a confirmar la validesa dels resultats en una cohort de validació més gran i no esbiaixada de 447 pacients amb LMA de la base de dades pública TARGET. Vam confirmar el valor predictiu de la firma de 24 miRNAs en la cohort de validació no esbiaixada de pacients pediàtrics amb LMA. En aquesta sèrie, la genètica es distribueix de manera desigual entre els dos grups definits per l'expressió de miRNAs, i tots els pacients amb les anomalies genètiques de bon pronòstic es troben en el grup P2TAML, associant-se a uns millors resultats. També vam trobar una correlació entre la nostra firma de 24 miRNAs i el pLSC6 score. Cal remarcar que tant el pLSC6 com el LSC17 també s'associen de manera significativa amb les alteracions genètiques subjacents, tal com ha estat publicat prèviament (160,162). En general, la nostra firma de 24 miRNAs podria considerar-se la contrapartida epigenètica de les variables genètiques i d'expressió de *stemness* que prediuen la supervivència.

L'anàlisi multivariat va confirmar la genètica i la MRM com a factors pronòstics de la SG i la SLE. El pLSC6 score va predir la supervivència en la subcohort de pacients amb dades disponibles a la base TARGET. S'ha descrit que la genètica, els nivells de MRM, l'expressió gènica i la *leukemia stemness* influeixen en el pronòstic (128,160–162). Recentment, Loïc Vasseur *et al.* han reportat que la combinació de LSC17, la genètica i la MRM permet identificar pacients amb LMA i mutacions a *NPM1* amb excel·lent pronòstic (413), però les dades referents a l'efecte de l'epigenètica són escasses. Alguns estudis han descrit l'impacte d'un grup de miRNAs en pacients amb LMA; altres han combinat el valor de un miRNA individual amb el LSC17 (365,406). Pel contrari, en aquesta tesis, hem analitzat un ampli número de miRNAs implicats en *stemness* i hem identificat 24 miRNAs que prediuen el pronòstic en pacients amb LMA. Tot i que la nostra firma de miRNAs no és independent de la genètica subjacent ni de l'expressió gènica, pensem que proporcionem

informació nova i significativa sobre el paper dels factors epigenètics en la desregulació de les vies de *stemness* en pacients pediàtrics amb LMA. A més, la capacitat predictiva de la combinació de la MRM, la genètica, el pLSC6 *score* i la firma de 24 miRNAs, és superior a la de cada una de les variables per separat i l'addició de la informació de miRNAs fa augmentar la capacitat predictiva de la SG.

Paper de l'expressió de marcadors genètics en pacients pediàtrics amb leucèmia aguda: estudi dels gens PPP1R27, CCL23, SCUBE1, PHACTR3 i NRG4

En la nostra sèrie de pacients, d'acord amb el prèviament descrit (414), només els pacients amb leucèmia i no els controls no neoplàsics expressaven els gens *PPP1R27*, *CCL23*, *SCUBE1*, *PHACTR3* i *NRG4* (Taula 36). A més, vam observar perfils d'expressió diferenciats associats al llinatge de la leucèmia. Així, els pacients amb LMA expressaven en major proporció els gens *PPP1R27*, *CCL23*, *NRG4* i *PHACTR3* respecte les LLA (Taula 37). Dins els pacients amb expressió, *PPP1R27*, *CCL23*, *NRG4* i *SCUBE1* presentaven significativament major expressió en pacients amb LMA respecte els pacients amb LLA (Taula 38). Pel que fa al subestudi en pacients amb reordenaments de *KMT2A*, tant en la cohort global com en la subcohort de pacients amb LLA, no vam observar diferències en la seva expressió; en canvi, els pacients amb LMA i *KMT2A-r* expressaven en major proporció els gens *NRG4*, *SCUBE1* i *PHACTR3*. A més, aquests pacients sobreexpressaven els gens *PPP1R27* i *CCL23* respecte la resta de pacients amb LMA sense reordenaments de *KMT2A* (Taules 39 i 40). Finalment, tot i que els pacients amb LMA i *KMT2A-r* presentaven sobreexpressió dels gens *SCUBE1* i *PHACTR3*, també vam veure que hi havia un grup de pacients que no els expressaven (Figura 44). Vam estudiar diferents variables clíniques i biològiques per entendre aquestes diferències i vam observar que els pacients amb LMA i *KMT2A-r* i expressió de *PHACTR3* presentaven pitjor supervivència.

Així, tal i com van descriure Lagacé *et al.*, vam confirmar que el perfil d'expressió d'aquests gens es trobava alterat en pacients pediàtrics amb LMA. *PPP1R27*, *CCL23*, *SCUBE1*, *PHACTR3* i *NRG4* codifiquen per proteïnes quimiocines, neuroregulines, glicoproteïnes de superfície o proteïnes reguladores de fosfatasa i actina; per tant, tenen una funció important en la senyalització i funció cel·lular i en l'adhesió de molècules que podrien trobar-se desregulades en processos neoplàsics (415).

El gen *CCL23* codifica per a una quimocina implicada en processos immunorreguladors i inflamatoris. Steinbach et al., (416) van identificar un conjunt de gens, entre ells *CCL23*, sobreexpressats en pacients amb LMA respecte mostres de moll d'os sanes. L'expressió d'aquests gens disminuïa amb la remissió complerta dels pacients i tornava a augmentar en les mostres prèvies a la recaiguda (416). Estudis més recents suggereixen que les alteracions genètiques i fenotípiques del microambient del moll de l'os poden afavorir el procés de leucemogènesi i permetre a les cèl·lules leucèmiques sobreviure en ambients hostils i evitar la mort induïda per la quimioteràpia. En aquest sentit, alguns estudis han analitzat el perfil proteòmic del microambient del moll d'os en pacients amb LMA i controls sans (417). Aquest estudi va mostrar 168 proteïnes diferencialment expressades entre pacients amb LMA i controls sans; entre elles, destacaven un ampli grup de citoquines i en concret *CCL23*, que presentava nivells significativament elevats. Els estudis funcionals van recolzar aquestes observacions, demostrant que l'elevada expressió de *CCL23* podria estar suprimint l'hematopoesi normal (417). Recentment, en un estudi amb pacients adults i pediàtrics s'ha proposat el gen *CCL23* com a biomarcador pronòstic en pacients amb LMA, integrat en un firma de 18 gens (418). Els autors proposen un model basat en l'anàlisi d'expressió d'aquests gens (relacionats amb ferroapoptosi), mitjançant el qual són capaços de classificar els pacients en diferents grups de risc (418). En els nostres estudis, vam observar que els pacients amb LMA expressaven *CCL23* en més proporció i a nivells més elevats que els pacients amb LLA. Així, el perfil d'expressió alterat de *CCL23* podria ser el reflex del llinatge i la seva implicació en la leucemogènesi en la LMA.

SCUBE1 codifica per a una glicoproteïna secretada a la superfície cel·lular que s'expressa durant l'embriogènesi primerenca i es troba en cèl·lules endotelials i plaquetes, però la seva funció biològica no està del tot clara (419). Tot i així, els seus nivells d'expressió s'han vist desregulats en diversos càncers, com el càncer de cèl·lules renals, càncer de mama o càncer d'estómac, en els quals s'ha proposat com a biomarcador de pronòstic o recaiguda (420–422). Més recentment, Sahoo *et al.* han estudiat el paper de *SCUBE1* en el manteniment de les cèl·lules leucèmiques *KMT2A-r* mitjançant un augment de senyals proliferatives i de supervivència cel·lular. En aquest context, i en models animals *knock-out*, han observat que *HOXA9/MEIS1* estarien regulant a *SCUBE1*, que s'uneix al lligand

de *FLT3* provocant una activació de la seva via de senyalització i augmentant la seva activitat (Binay K. Sahoo 2022). Així, de validar-se aquests resultats, *SCUBE1* podria ser una diana terapèutica potencial pel tractament de les leucèmies *KMT2A-r* (423). Atès que la sobreexpressió de *HOXA9* promou l'expansió de les HSC i dona peu a un augment de la proliferació que acaba de desencadenar una LMA (424), seria interessant, com a línia d'investigació futura, estudiar la correlació entre l'expressió de *HOXA9*, *SCUBE1* i *FLT3*, per veure si existeix una relació directa entre aquests gens que ajudaria a entendre millor els mecanismes de leucemogènesi i a la investigació de tractaments més específics i dirigits.

NRG4 o *neuregulin-4* codifica per a una proteïna de senyalització cel·lular en diversos teixits. La seva unió a receptors de tirosina quinasa (ErbB3 o ErbB4) activa vies de senyalització intracel·lular, activant respostes d'estimulació o inhibició de la proliferació, diferenciació o apoptosi. S'ha observat sobreexpressió de *NRG4* en diversos càncers, entre ells, el limfoma fol·licular (425,426). Recentment, s'ha publicat un estudi en el que es proposa *NRG4* com a biomarcador per a avaluar el pronòstic i la resposta al tractament del carcinoma hepatocel·lular (427). De forma interessant, s'ha descrit la sobreexpressió de *NRG4* en pacients pediàtrics amb LMA amb presència de la fusió *NUP98::NSD1* (428). Aquests pacients es caracteritzen per presentar un mal pronòstic i un perfil de sobreexpressió de gens *HOXA* i del miR-196-b (de forma similar als pacients amb reordenament de *KMT2A*) i dels gens *HOXB* i el miR-10-a. *NRG4* pot unir-se i activar receptors de la família *epidermal growth factor receptor (EGFR)* i la seva activació podria contribuir a la resistència a la citarabina en determinades línies cel·lulars (B117H), potser per l'activació de la via Ras/MAPK relacionada amb la modulació de la resposta a la citarabina (429). Els nostres resultats són concordants amb el que van observar Lagacé *K et al.* al seu estudi, ja que *NRG4* es troba expressat preferentment en pacients amb LMA i a nivells elevats en pacients amb reordenaments de *KMT2A* (414).

PPP1R27 codifica per a proteïnes que activen l'activitat d'unió a fosfatasa, però la seva funció biològica no està del tot clara. Jiang *et al.* van validar un model pronòstic en pacients amb carcinoma de cèl·lules escamoses de pulmó, basat en 8 gens relacionats amb *cancer stem cells (CSC)*, que incloïa *PPP1R27* (430). Els autors proposen aquests 8

gens com a biomarcadors pronòstics i possibles dianes terapèutiques per als pacients amb càncer escamós de pulmó.

PHACTR3 codifica per a una proteïna reguladora de fosfatasa i actina. Hi ha pocs estudis que abordin el paper de *PHACTR3* en el context oncològic, però la hipermetilació d'aquest gen en el context neoplàsic és comú (431–433). En LLA, la seva sobreexpressió ha estat descrita en pacients amb LLA i reordenament *TCF3::PBX1* (429,434), i *PHACTR3* s'ha descrit en casos amb perfil d'expressió *Ph-like* participant en la fusió *LDLRAD4::PHACTR3* (435). En la nostra sèrie, *PHACTR3* es trobava sobreexpressat en pacients amb LMA (en general i en particular en casos amb *KMT2A-r* respecte els pacients amb LLA o sense la fusió de *KMT2A*. Tot i així, destacava, dins del grup de les LMA *KMT2A-r*, un grup de pacients que expressava aquest gen, a diferència d'altres casos amb absència d'expressió. Els cinc pacients que no expressaven *PHACTR3* estaven vius i sense esdeveniments als cinc anys, en contrast amb els 14 pacients amb expressió del gen, que presentaren pitjor supervivència. El baix número de casos fa que aquesta troballa s'hagi d'interpretar amb extremada cautela, però seria interessant confirmar aquests resultats en sèries més nombroses de pacients. Zhang C *et al.* van analitzar les interaccions miRNAs-RNAm associats a supervivència en pacients amb LMA (436). Els autors van observar dos miRNAs associats amb la supervivència dels pacients amb LMA, hsa-mir-200c i hsa-mir-425, els quals tenen com a diana *PHACTR3* i tot i que en el seu estudi no van trobar relació directa d'aquest gen amb la supervivència dels pacients, podria tractar-se d'una relació indirecta (436). Abordar de manera similar la possible interacció de *PHACTR3* amb altres factors epigenètics i el seu rol en la agressivitat i pronòstic de les leucèmies seria una interessant línia futura de investigació.

Limitacions, fortaleces dels nostres estudis, aplicabilitat clínica i perspectives de futur

Els treballs que componen aquesta tesi tenen algunes limitacions, entre elles, el baix número de pacients i la seva heterogeneïtat, els diversos protocols del tractament, el biaix de selecció en la disponibilitat de mostres i les dades, així com l'enriquiment de casos amb reordenaments de *KMT2A*. Com s'ha esmentat, als dos treballs vam enriquir les nostres sèries de pacients en casos amb reordenament de *KMT2A*, ja que aquest

subtipus continua essent un repte mèdic i científic per la mala evolució dels pacients i la complexitat de la seva biologia.

- 1) Pel que fa al treball sobre els miRNAs, a la cohort d'HSJD inicial vam incloure tots els tipus de leucèmia amb una representació de pacients de tots els llinatges (LLA-B, LLA-T, LMA i un pacient amb LALA) i les principals alteracions genètiques. En primer lloc, ens vam proposar analitzar el paper dels miRNAs implicats en la regulació de les HSC i *stemness* de forma global, per a observar patrons i perfils d'expressió compartits o de diferents llinatges i per això vam estudiar diferents tipus de leucèmia. En quant a l'únic pacient amb LALA, vam incloure'l en la cohort de HSJD, ja que presentava reordenament de *KMT2A* i volíem observar si el perfil d'expressió d'aquest cas s'agrupava a l'anàlisi inicial no supervisat amb algun dels llinatges (mieloide, limfoide) o, pel contrari, s'agrupava segons la genètica subjacent o el perfil d'expressió de *stemness*. Així, aquest cas concret només es va incloure en l'anàlisi inicial no supervisat i posteriorment va ser exclòs de la resta d'anàlisis.

Degut també a la heterogeneïtat del tractament i els protocols i les diferències en la supervivència, tots els anàlisis de supervivència dels dos treballs de la tesi van ser realitzats per separat segons el llinatge. A més, per minimitzar l'efecte de l'heterogeneïtat del tractament, vam agrupar els protocols terapèutics en funció de la seva similitud en el tractament i el llinatge. Cal destacar que en els protocols utilitzats en la cohort de HSJD no es van introduir canvis significatius com la immunoteràpia o fàrmacs experimentals durant el període d'estudi i d'altra banda també vam analitzar les possibles diferències en la supervivència dels pacients. La variable "protocol terapèutic", va ser inclosa en tots els estudis estadístics, inclosos els univariats i multivariats.

D'altra banda, vam validar els resultats sobre la firma de 24 miRNAs en una sèrie de validació gran i independent de pacients pediàtrics amb LMA. La sèrie de validació era comparable a la nostra cohort excepte per l'edat, el recompte de leucòcits, la infiltració a SNC, la representació de casos amb reordenaments del gen *KMT2A* i la SLE. Aquestes diferències es poden explicar degut al biaix de casos amb reordenaments de *KMT2A* en la sèrie d'HSJD, amb una major proporció de lactants i infiltració del SNC. Tanmateix, vam analitzar l'impacte de la firma de 24 miRNAs dins

de cada categoria molecular i no vam observar diferències en funció del reordenament de *KMT2A*. Globalment, vam confirmar el valor predictiu de la firma de 24 miRNAs en la sèrie de validació, el que posa de manifest la robustesa dels nostres resultats en una sèrie no esbiaixada més representativa de la vida real.

- 2) En quant a l'anàlisi d'expressió dels gens *PPP1R27*, *CCL23*, *SCUBE1*, *PHACTR3* i *NRG4* en pacients pediàtrics amb leucèmia aguda, el nostre estudi té algunes limitacions: de nou, principalment el baix número de mostres, tant de pacients com de controls, la seva heterogeneïtat i el biaix en pacients amb LMA i amb reordenaments de *KMT2A*.

Pel que fa a l'heterogeneïtat dels pacients, la nostre sèrie només presentava tres pacients amb LLA-T, motiu pel qual es van analitzar les LLA en conjunt. D'altra banda, la cohort està enriquida en pacients amb *KMT2A-r*, la majoria dels quals de llinatge mieloides, ja que d'una banda volíem identificar factors pronòstics en aquest subtipus de leucèmia d'alt risc i d'altra banda volíem avaluar la potencial utilitat dels gens prèviament descrits com a potencials biomarcadors de la fusió de *KMT2A* en pacients amb LMA. En aquest sentit, la segona limitació més important és la mida de la cohort, ja que vam estudiar un número petit de pacients i caldria validar els resultats en cohorts més grans i representatives.

Tot i les limitacions que presenten els nostres estudis, creïem que tenen també les seves fortaleses i que aporten informació rellevant de cara al maneig del pacient pediàtric amb leucèmia d'alt risc. Vam obtenir una firma de 24 miRNAs capaç de diferenciar pacients amb LMA amb diferent pronòstic. La firma de miRNAs es va correlacionar amb el pLSC6 *score* i la genètica subjacent, però afegeix valor predictiu a aquests variables en un model global combinant la MRM, la genètica, el pLSC6 *score* i l'expressió de miRNAs. Per tant, el nostre treball ha permès proposar un model integrador que combina la genètica, la MRM i l'expressió de RNAs i miRNAs per a refinar l'estratificació del risc dels pacients pediàtrics amb LMA.

D'altra banda, en el treball addicional sobre l'expressió dels gens *PPP1R27*, *CCL23*, *SCUBE1*, *PHACTR3* i *NRG4*, els resultats observats confirmen les dades descrites a la literatura i obren noves perspectives d'investigació futures. Segons els nostres resultats, aquests gens es troben desregulats amb pacients pediàtrics amb leucèmia amb perfils

diferenciats segons el llinatge, i podrien tenir un paper rellevant en els processos de leucemogènesi i en el diagnòstic, pronòstic i tractament dels pacients pediàtrics amb LMA.

En quant a la pràctica clínica i la utilitat diagnòstica dels nostres resultats, la possibilitat de combinar les variables MRM, genètica, pLSC6 *score* i la firma de 24 miRNAs podria contribuir a augmentar la capacitat predictiva de cada una de les variables de forma independent. Si bé l'estudi de la firma completa de 24 miRNAs pot ser complex, la detecció de *surrogates* de la nostre firma (com *CD34* i *ADGRG1*) mitjançant citometria de flux podria ser una forma més directa i simplificada d'aplicar aquesta informació. Cal tenir present, però, que els miRNAs intervenen en xarxes d'interacció complexes i poden desenvolupar un paper important en múltiples processos i vies de senyalització. Donat que el nostre estudi es basa en l'expressió relativa de miRNAs, i degut a la complexitat de la regulació dels miRNAs, és necessari confirmar els nostres resultats en sèries més àmplies abans de planificar qualsevol aplicació clínica o incorporar-la com a variable pronòstica per a l'estratificació dels pacients. El treball addicional ha aportat dades interessants, però donat el baix número de casos, creiem prudent considerar-lo més un estudi exploratori i plantejar la seva aplicació clínica només un cop confirmats els resultats en sèries més grans, per tal d'avaluar el seu potencial valor diagnòstic, pronòstic i com a dianes terapèutiques específiques en pacients pediàtrics amb LMA.

Els nostres estudis obren múltiples línies d'investigació futures. D'una banda, es podria confirmar experimentalment la correlació entre els nivells d'expressió de cada miRNA implicat en la nostra firma i l'expressió de gens relacionats amb *stemness*. Una de les opcions per estudiar la interacció miRNA i RNAm seria mitjançant un assaig amb luciferasa. *In vitro*, és possible avaluar l'activitat de la firma de miRNAs amb un assaig de luciferasa combinant molècules que mimetitzen l'activitat dels miRNAs (*miRNA mimics*) en cèl·lules de LMA P1AML. En aquest context, també podríem utilitzar *miRNA mimics* o inhibidors de miRNAs per a augmentar o disminuir l'activitat dels miRNA i avaluar l'expressió dels seus gens diana. Finalment, també es podrien plantejar altres estudis experimentals per a estudiar la pèrdua de funció de miRNAs mitjançant l'expressió continuada d'inhibidors de la firma de miRNAs en cultius cel·lulars i assajos *in vivo*, com *xenografts* en càncer.

D'altra banda, seria interessant estudiar la relació entre la correlació de l'expressió de *SCUBE1*, *HOXA9* i *FLT3* en la nostra sèrie de pacients. Com a línia d'investigació futura seria també interessant estudiar la relació entre els pacients que expressen *PHACTR3* i la resta de gens analitzats, amb els miRNAs de la nostra firma i altres gens relacionats amb *stemness* com els presents als *scores*.

En definitiva, més estudis que abordessin la interacció entre factors genètics i epigenètics i el seu paper diagnòstic, pronòstic i terapèutic en leucèmies d'alt risc, ajudarien a clarificar la complexa biologia de la leucèmia pediàtrica i a personalitzar al màxim el tractament dels pacients.

Estudi de factors genètics i epigenètics en leucèmies pediàtriques d'alt risc: aportacions i beneficis dels treballs

Globalment, els treballs que componen la tesis han contribuït a la cerca de marcadors genètics i epigenètics diagnòstics i pronòstics. Els nostres resultats han permès:

- Descriure l'expressió de 89 miRNAs relacionats amb regulació de les HSC en mostres de pacients amb leucèmia aguda pediàtrica.
- Obtenir, confirmar i validar una firma de miRNAs capaç de diferenciar els pacients pediàtrics amb LMA amb diferent pronòstic.
- Confirmar l'associació entre la firma de miRNAs, la *leukemia stemness* i la genètica subjacent.
- Confirmar i avaluar la capacitat predictiva de manera individual i conjunta de la MRM, la genètica, la *leukemia stemness* i la firma de miRNAs.
- Proposar un model integrador que combina la MRM, la genètica i l'expressió de RNAs i miRNAs per a refinar l'estratificació del risc dels pacients pediàtrics amb LMA.
- Confirmar un perfil d'expressió diferencial dels gens *PPP1R27*, *CCL23*, *SCUBE1*, *PHACTR3* i *NRG4* en pacients pediàtrics amb leucèmia aguda i, en particular, en pacients amb LMA i *KMT2A-r*.
- Suggestir noves línies d'investigació futura per a intentar millorar el coneixement de la relació entre els diferents factors genètics i epigenètics

relacionats amb *stemness* i el seu potencial paper diagnòstic, pronòstic i/o terapèutic en pacients pediàtrics amb leucèmia d'alt risc.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. Els pacients amb leucèmia aguda pediàtrica analitzats presenten diferents perfils d'expressió de microRNAs en funció del llinatge de la leucèmia i de la seva supervivència.
2. Hem identificat i validat una firma d'expressió de 24 miRNAs amb capacitat predictiva del pronòstic en pacients pediàtrics amb leucèmia mieloide aguda.
3. La firma de 24 microRNAs es correlaciona amb el grau de *stemness*, estimat mitjançant el *pediatric leukemic stem cell score* (pLSC6), i la genètica subjacent; tanmateix, la firma de microRNAs afegeix valor predictiu a aquestes variables en un model global que combina la malaltia residual mesurable, la genètica, el *pediatric leukemic stem cell score* i la firma de 24 microRNAs.
4. La firma de 24 microRNAs aporta dades epigenètiques per a ajudar a l'estratificació en grups de risc dels pacients pediàtrics amb leucèmia mieloide aguda.
5. Els gens *PPP1R27*, *CCL23*, *SCUBE1*, *PHACTR3* i *NRG4* mostren una expressió diferenciada en pacients pediàtrics amb diferent subtipus de leucèmia aguda respecte als controls no neoplàsics.
6. En la nostra sèrie de pacients amb leucèmia mieloide aguda, els casos amb *KMT2A* reordenat presenten una sobreexpressió dels gens *PPP1R27*, *CCL23*, *SCUBE1*, *PHACTR3* i *NRG4* respecte la resta de pacients.
7. Els estudis preliminars suggereixen que l'expressió de *PHACTR3* podria estar associada a diferències en la supervivència dels pacients pediàtrics amb leucèmia mieloide aguda i reordenaments de *KMT2A*.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell*. 2008;132(4):631–44.
2. Passegue E, Jamieson CHM, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2003;100(Supplement 1):11842–9. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.2034201100>
3. Notta F, Zandi S, Takayama N, Dobson S, Gan OI, Wilson G, et al. Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science (80-)*. 2016;351(6269):1–22.
4. Mezey É. On the origin of blood cells - Hematopoiesis revisited. *Physiol Behav*. 2016;22(4):247–8.
5. Michael A. Rieger and Timm Schroeder. Hematopoiesis Michael. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4:1–17.
6. Akala OO, Clarke MF. Hematopoietic stem cell self-renewal. *Curr Opin Genet Dev*. 2006;16(5):496–501.
7. Blank U, Karlsson G, Karlsson S. Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood*. 2008;111(2):492–503.
8. Luis TC, Killmann NMB, Staal FJT. Signal transduction pathways regulating hematopoietic stem cell biology: Introduction to a series of Spotlight Reviews. *Leukemia*. 2012;26(1):86–90.
9. Zon LI. Intrinsic and extrinsic control of haematopoietic stem-cell self-renewal. *Nature*. 2008;453(7193):306–13.
10. Pfister SM, Reyes-Múgica M, Chan JKC, Hasle H, Lazar AJ, Rossi S, et al. A Summary of the Inaugural WHO Classification of Pediatric Tumors: Transitioning from the Optical into the Molecular Era. *Cancer Discov*. 2022;12(2):331–55.
11. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*. 2022;140(11):1200–28.
12. Duffield AS, Mullighan CG, Borowitz MJ. International Consensus Classification of acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Virchows Arch [Internet]*. Springer Berlin Heidelberg; 2023;482(1):11–26. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00428-022-03448-8>
13. Weinberg OK, Porwit A, Orazi A, Hasserjian RP, Foucar K, Duncavage EJ, et al. The International Consensus Classification of acute myeloid leukemia. *Virchows Arch [Internet]*. Springer Berlin Heidelberg; 2023;482(1):27–37. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00428-022-03430-4>
14. Khoury Joseph, Eric S, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours : Myeloid and Histiocytic / Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022;(May):1–17.
15. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(1):7–30.

16. Ssenyonga N, Stiller C, Nakata K, Shalkow J, Redmond S, Bulliard JL, et al. Worldwide trends in population-based survival for children, adolescents, and young adults diagnosed with leukaemia, by subtype, during 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual data from 258 cancer registries in 61 countries. *Lancet Child Adolesc Heal.* 2022;6(6):409–31.
17. Hunger, Stephen P MCG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N Engl J Med.* 2015;373(16):1541–52.
18. McReynolds LJ, Savage SA. Pediatric leukemia susceptibility disorders: Manifestations and management. *Hematology.* 2017;2017(1):242–50.
19. Papaemmanuil E, Hosking FJ, Vijayakrishnan J, Price A, Olver B, Sheridan E, et al. Loci on 7p12.2, 10q21.2 and 14q11.2 are associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. 2009;41(9):1006–10.
20. Xu H, Cheng C, Devidas M, Pei D, Fan Y, Yang W, et al. ARID5B genetic polymorphisms contribute to racial disparities in the incidence and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 2012;30(7):751–7.
21. Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(3):193–203.
22. Doll R, Wakeford R. Risk of childhood cancer from fetal irradiation. *Br J Radiol.* 1997;70(FEB.):130–9.
23. Hawkins MM, Kinnier Wilson LM, Stovall MA, Marsden HB, Potok MHN, Kingston JE, et al. Epipodophyllotoxins, alkylating agents, and radiation and risk of secondary leukaemia after childhood cancer. *Br Med J.* 1992;304(6832):951–8.
24. Hunger SP, Lu X, Devidas M, Camitta BM, Gaynon PS, Winick NJ, et al. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: A report from the children’s oncology group. *J Clin Oncol.* 2012;30(14):1663–9.
25. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukemia. *Lancet.* 2013;381(9881):319–31.
26. Kinlen L. Infections and immune factors in cancer: The role of epidemiology. *Oncogene.* 2004;23(38):6341–8.
27. Kinlen L. Evidence for an infective cause of childhood leukaemia: comparison of a scottish new town with nuclear reprocessing sites in britain. *Lancet.* 1988;10:1323–7.
28. Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* [Internet]. Springer US; 2018;18(8):471–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41568-018-0015-6>
29. Pui C-H, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Methods Mol Biol.* 2008;730:99–117.
30. Huntly BJP, Gilliland DG. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(4):311–21.
31. Greaves MF, Wiemels J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(9):639–49.
32. Moorman A V. Counting chromosomes in 2018: Is aneuploidy relevant in the genòmic era? *New Mol Insights Innov Manag Approaches Acute Lymphoblastic Leu EHA-SWG Sxi*

- Meet. 2018;21–3.
33. Mullighan CG. Genomic characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol.* 2013;50(4):314–24.
 34. Alpar D, Wren D, Ermini L, Mansur MB, Van Delft FW, Bateman CM, et al. Clonal origins of ETV6-RUNX1 + acute lymphoblastic leukemia: Studies in monozygotic twins. *Leukemia.* Nature Publishing Group; 2015;29(4):839–46.
 35. Greaves MF, Maia AT, Wiemels JL, Ford AM. Leukemia in twins: Lessons in natural history. *Blood.* 2003;102(7):2321–33.
 36. Mel Greaves and CCM. Clonal evolution in cancer. *Nature.* 2012;481(7381):306–13.
 37. Balgobind B V., Hollink IHIM, Arentsen-Peters STCJM, Zimmermann M, Harbott J, Berna Beverloo H, et al. Integrative analysis of type-I and type-II aberrations underscores the genetic heterogeneity of pediatric acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2011;96(10):1478–87.
 38. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJP. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood.* 2016;127(1):29–41.
 39. Pourrajab F, Zare-Khormizi MR, Hashemi AS, Hekmatimoghaddam S. Genetic characterization and risk stratification of acute myeloid leukemia. *Cancer Manag Res.* 2020;12:2231–53.
 40. Bertuccio SN, Anselmi L, Masetti R, Lonetti A, Cerasi S, Polidori S, et al. Exploiting clonal evolution to improve the diagnosis and treatment efficacy prediction in pediatric aml. *Cancers (Basel).* 2021;13(9):1–10.
 41. Timothy J. Ley, M.D. et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2013;368(22):2059–74.
 42. Greaves M. Cancer stem cells: Back to Darwin? *Semin Cancer Biol.* 2010;20(2):65–70.
 43. Mullighan CG, Phillips LA, Su X, Ma J, Miller CB, Shurtleff SA, et al. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science (80-).* 2008;322(5906):1377–80.
 44. Ferrando AA, López-Otín C. Clonal evolution in leukemia. *Nat Med [Internet].* Nature Publishing Group; 2017;23(10):1135–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4410>
 45. Greaves M. Darwin and evolutionary tales in leukemia. *Hematology.* 2009;2009(1):3–12.
 46. Genescà E, Ribera J, Ribera J-M. Acute lymphoblastic leukemia of T progenitors: From biology to clinics. *Med Clínica (English Ed [Internet].* Elsevier España; 2015;144(5):223–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.medcle.2015.05.033>
 47. Lassaletta Atienza A. Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda. *Pediatría Integr [Internet].* 2016;XX(6):380–9. Available from: https://www.pediatriaintegral.es/wp-content/uploads/2016/xx06/03/n6-380-389_Lassaletta.pdf
 48. Lühmann JL, Stelter M, Wolter M, Kater J, Lentjes J, Bergmann AK, et al. The clinical utility of optical genome mapping for the assessment of genomic aberrations in acute lymphoblastic leukemia. *Cancers (Basel).* 2021;13(17).
 49. Rack K, De Bie J, Ameye G, Gielen O, Demeyer S, Cools J, et al. Optimizing the diagnostic workflow for acute lymphoblastic leukemia by optical genome mapping. *Am J Hematol.*

- 2022;97(5):548–61.
50. Gabert J, Beillard E, van der Velden VHJ, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of “real time” quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - A Europe Against Cancer Program. *Leukemia*. 2003;17(12):2318–57.
 51. Pongers-Willems MJ, Seriu T, F S, E D, Gameiro P, P P, et al. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute. *NatureCom* [Internet]. 1999;110–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/2401245>
 52. Frank C. Kuo, Brenton G. Mar, R. Coleman Lindsley and NIL. The relative utilities of genome-wide, gene panel, and individual gene sequencing in clinical practice. 2017. 433–9.
 53. Sheikine Y, Kuo FC, Lindeman NI. Clinical and technical aspects of genomic diagnostics for precision oncology. *J Clin Oncol*. 2017;35(9):929–33.
 54. Vega-Garcia N, Benito R, Esperanza-Cebollada E, Llop M, Robledo C, Vicente-Garcés C, et al. Helpful criteria when implementing ngs panels in childhood lymphoblastic leukemia. *J Pers Med*. 2020;10(4):1–15.
 55. Bolouri H, Farrar JE, Jr TT, Ries RE, Lim EL, Alonzo TA, et al. resource The molecular landscape of pediatric acute myeloid leukemia reveals recurrent structural alterations and age-specific mutational interactions. *Nat Publ Gr* [Internet]. Nature Publishing Group; 2018;24(1):103–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4439>
 56. Inaba H, Mullighan CG. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2020;105(11):2524–39.
 57. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M -T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *Br J Haematol*. 1976;33(4):451–8.
 58. Bene MC, Castoldi G, Knapp W et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. 1995;9(10):1783–6.
 59. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IB de O, Berti E, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*. Springer US; 2022;36(7):1720–48.
 60. Moorman A V. The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Rev* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;26(3):123–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2012.01.001>
 61. Shago M. Recurrent cytogenetic abnormalities in acute lymphoblastic leukemia. *Methods Mol Biol*. 2017;1541:257–78.
 62. Paulsson K, Lilljebjörn H, Biloglav A, Olsson L, Rissler M, Castor A, et al. The genomic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2015;47(6):672–6.
 63. Paulsson K, Forestier E, Andersen MK, Autio K, Barbany G, Borgström G, et al. High modal number and triple trisomies are highly correlated favorable factors in childhood B-cell precursor high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia treated according to the

- NOPHO ALL 1992/2000 protocols. *Haematologica*. 2013;98(9):1424–32.
64. Schwab C, Harrison CJ. Advances in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia genomics. *HemaSphere*. 2018;2(4).
 65. Harrison CJ, Moorman A V., Broadfield ZJ, Cheung KL, Harris RL, Jalali GR, et al. Three distinct subgroups of hypodiploidy in lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2004;125(5):552–9.
 66. Moorman A V. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2016;101(4):407–16.
 67. Harrison CJ, Hills RK, Moorman A V., Grimwade DJ, Hann I, Webb DKH, et al. Cytogenetics of childhood acute myeloid leukemia: United Kingdom Medical Research Council Treatment Trials AML 10 and 12. *J Clin Oncol*. 2010;28(16):2674–81.
 68. Roberts KG, Mullighan CG. Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: Insights and treatment implications. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(6):344–57.
 69. Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, Wu G, Heatley SL, Payne-Turner D, et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. Nature Publishing Group; 2012;481(7380):157–63.
 70. Safavi S, Paulsson K. Near-haploid and low-hypodiploid acute lymphoblastic leukemia: Two distinct subtypes with consistently poor prognosis. *Blood*. 2017;129(4):420–3.
 71. Kimura S, Mullighan CG. Molecular markers in ALL: Clinical implications. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2020;33(3):1–24.
 72. Hunger SP. Chromosomal Translocations Involving the E2A Gene in Acute Lymphoblastic Leukemia: Clinical Features and Molecular Pathogenesis. *Blood*. 1996;87(4):1211–24.
 73. Felice MS, Gallego MS, Alonso CN, Alfaro EM, Gutter MR, Bernasconi AR, et al. Prognostic impact of t(1;19)/TCF3-PBX1 in childhood acute lymphoblastic leukemia in the context of Berlin-Frankfurt-Münster-based protocols. *Leuk Lymphoma*. 2011;52(7):1215–21.
 74. Barber KE, Harrison CJ, Broadfield ZJ, Stewart ARM, Wright SL, Martineau M, et al. Molecular Cytogenetic Characterization of TCF3 (E2A)/19p13.3 Rearrangements in B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007;46(January):476–86.
 75. Lejman M, Chałupnik A, Chilimoniuk Z, Dobosz M. Genetic Biomarkers and Their Clinical Implications in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *Int J Mol Sci*. 2022;23(5).
 76. Andersson AK, Ma J, Wang J, Chen X, Gedman AL, Dang J, et al. The landscape of somatic mutations in Infant MLL rearranged acute lymphoblastic leukemias. *Nat Genet*. 2015;47(4):330–7.
 77. Chaer F El, Keng M, Ballen KK. MLL-Rearranged Acute Lymphoblastic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2020;1–7.
 78. Osman AEG, Deininger MW. Chronic Myeloid Leukemia: Modern therapies, current challenges and future directions. *Blood Rev*. 2021;49:1–36.
 79. Motlló C, Ribera JM, Morgades M, Granada I, Montesinos P, Brunet S, et al. Frequency and prognostic significance of t(v;11q23)/KMT2A rearrangements in adult patients with acute lymphoblastic leukemia treated with risk-adapted protocols. *Leuk Lymphoma*. 2017;58(1):145–52.

80. Rives S, Estella J, Gómez P, López-Duarte M, de Miguel PG, Verdeguer A, et al. Intermediate dose of imatinib in combination with chemotherapy followed by allogeneic stem cell transplantation improves early outcome in paediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia (ALL): Results of the Spanish Cooperative G. *Br J Haematol*. 2011;154(5):600–11.
81. Rives S, Camós M, Estella J, Gómez P, Moreno MjSOSCJ, Vivanco JL, et al. Longer follow-up confirms major improvement in outcome in children and adolescents with Philadelphia chromosome acute lymphoblastic leukaemia treated with continuous imatinib and haematopoietic stem cell transplantation. Results from the Spanish Cooperati. *Br J Haematol*. 2013;162(3):419–21.
82. Ribera JM. Optimal approach to treatment of patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: How to best use all the available tools. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(1):21–7.
83. Hovorkova L, Zaliova M, Venn NC, Bleckmann K, Trkova M, Potuckova E, et al. Monitoring of childhood ALL using BCR-ABL1 genomic breakpoints identifies a subgroup with CML-like biology. *Blood*. 2017;129(20):2771–81.
84. Zuna J, Hovorkova L, Krotka J, Koehrmann A, Bardini M, Winkowska L, et al. Minimal residual disease in BCR::ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia: different significance in typical ALL and in CML-like disease. *Leukemia*. Springer US; 2022;36(12):2793–801.
85. Harrison C, Moorman A, Schwab C, Carroll A, Raetz E, Devidas M, et al. An international study of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): cytogenetic characterization and outcome CJ. *Leuke [Internet]*. 2014;28(5):1015–21. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
86. Rand V, Parker H, Russell LJ, Schwab C, Ensor H, Irving J, et al. Genomic characterization implicates iAMP21 as a likely primary genetic event in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011;117(25):6848–55.
87. Heerema NA, Carroll AJ, Devidas M, Loh ML, Borowitz MJ, Gastier-Foster JM, et al. Intrachromosomal amplification of chromosome 21 is associated with inferior outcomes in children with acute lymphoblastic leukemia treated in contemporary standard-risk children's oncology group studies: A report from the children's oncology group. *J Clin Oncol*. 2013;31(27):3397–402.
88. Gu Z, Michelle L. Churchman Kathryn G. Roberts, Moore I, Zhou X, Nakitandwe J, Hagiwara K, et al. PAX5-driven Subtypes of B-progenitor Acute Lymphoblastic Leukemia A. *Nat Genet*. 2019;51(2):296–307.
89. Moorman A V, Enshaei A, Schwab C, Wade R, Chilton L, Elliott A, et al. A novel integrated cytogenetic and genomic classification refines risk stratification in pediatric acute lymphoblastic leukemia. 2015;124(9):1434–45.
90. Iacobucci I, Mullighan CG. Genetic basis of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2017;35(9):975–83.
91. Lilljebjörn H, Fioretos T. New oncogenic subtypes in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2017;130(12):1395–401.
92. Moorman A V., Schwab C, Ensor HM, Russell LJ, Morrison H, Jones L, et al. IGH@ translocations, CRLF2 deregulation, and microdeletions in adolescents and adults with

- acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2012;30(25):3100–8.
93. Charles G. Mullighan, M.D., Xiaoping Su, Jinghui Zhang, Ina Radtke, Letha A.A. Phillips, B.S., Christopher B. Miller, B.S., Jing Ma, Wei Liu, Cheng Cheng, Brenda A. Schulman, Richard C. Harvey I-M. Deletion of IKZF1 and Prognosis in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* [Internet]. 2009;360(5):470–80. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
 94. Den Boer ML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, Cheok MH, Buijs-Gladdines JG, Peters ST, et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol*. 2009;10(2):125–34.
 95. Tasian SK, Loh ML, Hunger SP. Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2017;130(19):2064–72.
 96. Roberts KG, Y. Li, D. Payne-Turner, R.C. Harvey, Y.-L. Yang, D. Pei K, McCastlain, L. Ding, C. Lu, G. Song, J. Ma, J. Becksfort, M. Rusch, S.-C. Chen J, Easton, J. Cheng, K. Boggs, N. Santiago-Morales, I. Iacobucci, R.S. Fulton JW, M. Valentine, C. Cheng, S.W. Paugh, M. Devidas, I-M. Chen, S. Reshmi AS, E. Hedlund, P. Gupta, P. Nagahawatte, G. Wu, X. Chen, D. Yergeau BV, et al. Targetable Kinase-Activating Lesions in Ph-like Acute Lymphoblastic Leukemia A. *N Engl J Med* [Internet]. 2014;11(37):1005–15. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
 97. Moorman A V., Schwab C, Winterman E, Hancock J, Castleton A, Cummins M, et al. Adjuvant tyrosine kinase inhibitor therapy improves outcome for children and adolescents with acute lymphoblastic leukaemia who have an ABL-class fusion. *Br J Haematol*. 2020;191(5):844–51.
 98. Iacobucci I, Roberts KG. Genetic alterations and therapeutic targeting of Philadelphia-like acute lymphoblastic leukemia. *Genes (Basel)*. 2021;12(5).
 99. Badar T, Alkhateeb H, Aljurf M, Kharfan-Dabaja MA. Management of Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia in the current era. *Curr Res Transl Med* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2023;71(2):103392. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.retram.2023.103392>
 100. Inaba H, Pui CH. Advances in the diagnosis and treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Med*. 2021;10(9).
 101. Lilljebjörn H, Henningsson R, Hyrenius-Wittsten A, Olsson L, Orsmark-Pietras C, Von Palffy S, et al. Identification of ETV6-RUNX1-like and DUX4-rearranged subtypes in paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun*. 2016;7.
 102. Zaliova M, Stuchly J, Winkowska L, Musilova A, Fiser K, Slamova M, et al. Genomic landscape of pediatric B-other acute lymphoblastic leukemia in a consecutive European cohort. *Haematologica*. 2019;104(7):1396–406.
 103. Zaliova M, Winkowska L, Stuchly J, Fiser K, Triska P, Zwyrtkova M, et al. A novel class of ZNF384 aberrations in acute leukemia. *Blood Adv*. 2021;5(21):4393–7.
 104. Hirabayashi S, Ohki K, Nakabayashi K, Ichikawa H, Momozawa Y, Okamura K, et al. ZNF384-related fusion genes define a subgroup of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with a characteristic immunotype. *Haematologica*. 2017;102(1):118–29.
 105. Jing Y, Li YF, Wan H, Liu DH. Detection of EP300-ZNF384 fusion in patients with acute lymphoblastic leukemia using RNA fusion gene panel sequencing. *Ann Hematol*.

- 2020;99(11):2611–7.
106. Moorman A V., Barretta E, Butler ER, Ward EJ, Twentyman K, Kirkwood AA, et al. Prognostic impact of chromosomal abnormalities and copy number alterations in adult B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: a UKALL14 study. *Leukemia*. 2021;36(3):625–36.
 107. Boer JM, Valsecchi MG, Hormann FM, Antić Ž, Zaliova M, Schwab C, et al. Favorable outcome of NUTM1-rearranged infant and pediatric B cell precursor acute lymphoblastic leukemia in a collaborative international study. *Leukemia*. 2021;35(10):2978–82.
 108. Mullighan CG, Downing JR. Genome-wide profiling of genetic alterations in acute lymphoblastic leukemia: Recent insights and future directions. *Leukemia*. Nature Publishing Group; 2009;23(7):1209–18.
 109. Noronha EP, Codeço Marques LV, Andrade FG, Santos Thuler LC, Terra-Granado E, Pombo-De-Oliveira MS. The profile of immunophenotype and genotype aberrations in subsets of pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Front Oncol*. 2019;9(4):1–10.
 110. Johansson KK and B. Pediatric T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Kristina. *Genes Chromosomes Cancer*. 2016;44:1–81.
 111. Stanulla M, Dagdan E, Zaliova M, Möricke A, Palmi C, Cazzaniga G, et al. IKZF1 plus defines a new minimal residual disease-dependent very-poor prognostic profile in pediatric b-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2018;36(12):1240–9.
 112. Hamadeh L, Enshaei A, Schwab C, Alonso CN, Attarbaschi A, Barbany G, et al. Validation of the United Kingdom copy-number alteration classifier in 3239 children with B-cell precursor ALL. *Blood Adv*. 2019;3(2):148–57.
 113. Chiaretti S, Zini G, Bassan R. Diagnosis and Subclassification of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2014;6(1).
 114. Iacobucci I, Kimura S, Mullighan CG. Biologic and therapeutic implications of genomic alterations in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Med*. 2021;10(17).
 115. Bardelli V, Arniani S, Pierini V, Giacomo D Di, Pierini T, Gorello P, et al. T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Biomarkers and Their Clinical Usefulness. 2021;12:1–20.
 116. Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, Behm FG, Raimondi SC, Pei D, et al. Early T-Cell Precursor Leukemia: A Subtype of Very High-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia Identified in Two Independent Cohorts. *Lancet The [Internet]*. 2010;10(2):147–56. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19147408
 117. Girardi T, Vicente C, Cools J, De Keersmaecker K. The genetics and molecular biology of T-ALL. *Blood*. 2017;129(9):1113–23.
 118. Liu R Bin, Guo JG, Liu TZ, Guo CC, Fan XX, Zhang X, et al. Meta-analysis of the clinical characteristics and prognostic relevance of NOTCH1 and FBXW7 mutation in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*. 2017;8(39):66360–70.
 119. Trinquand A, Tanguy-Schmidt A, Abdelali R Ben, Lambert J, Beldjord K, Lengliné E, et al. Toward a NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN-based oncogenetic risk classification of adult T-Cell acute lymphoblastic leukemia: A group for research in adult acute lymphoblastic leukemia study. *J Clin Oncol*. 2013;31(34):4333–42.

120. Petit A, Trinquand A, Chevret S, Ballerini P, Cayuela JM, Grardel N, et al. Oncogenetic mutations combined with MRD improve outcome prediction in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2018;131(3):289–300.
121. Vega-García N, Perez-Jaume S, Esperanza-Cebollada E, Vicente-Garcés C, Torrebadell M, Jiménez-Velasco A, et al. Measurable Residual Disease Assessed by Flow-Cytometry Is a Stable Prognostic Factor for Pediatric T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Consecutive SEHOP Protocols Whereas the Impact of Oncogenetics Depends on Treatment. *Front Pediatr*. 2021;8(February):1–12.
122. Raetz EA, Teachey DT. T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Malig*. 2016;580–8.
123. Cordo V, van der Zwet JCG, Canté-Barrett K, Pieters R, Meijerink JPP. T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Roadmap to Targeted Therapies. *Blood Cancer Discov*. 2021;2(1):19–31.
124. McMahan CM, Luger SM. Relapsed T Cell ALL: Current Approaches and New Directions. *Curr Hematol Malig Rep*. 2019;
125. Fattizzo B, Rosa J, Giannotta JA, Baldini L, Fracchiolla NS. The Physiopathology of T- Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Focus on Molecular Aspects. *Front Oncol*. 2020;10(February):1–11.
126. Van Vlierberghe P, Ferrando A. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3398–406.
127. Creutzig U, Van Den Heuvel-Eibrink MM, Gibson B, Dworzak MN, Adachi S, De Bont E, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: Recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2012;120(16):3167–205.
128. Bolouri H, Farrar JE, Jr TT, Ries RE, Lim EL, Alonzo TA, et al. resource The molecular landscape of pediatric acute myeloid leukemia reveals recurrent structural alterations and age-specific mutational interactions. *Nat Publ Gr. Nature Publishing Group*; 2018;24(1):103–12.
129. Quessada J, Cucchini W, Saultier P, Loosveld M, Harrison CJ, Lafage-Pochitaloff M. Cytogenetics of pediatric acute myeloid leukemia: A review of the current knowledge. Vol. 12, *Genes*. 2021.
130. Umeda M, Westover T, Rusch M, Foy S. Proposal of a new genomic framework for categorization of pediatric acute myeloid leukemia associated with prognosis. *Nature*. 2023.
131. Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E, Grauman P V., Shareef S, Allen SL, et al. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood*. 2015;125(9):1367–76.
132. Jones L, McCarthy P, Bond J. Epigenetics of paediatric acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2020;188(1):63–76.
133. Gilliland NAS and DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukemia. *Nat Rev*. 2002;2:502–13.
134. Goyama S, Mulloy JC. Molecular pathogenesis of core binding factor leukemia: Current knowledge and future prospects. *Int J Hematol*. 2011;94(2):126–33.
135. Steffen B, Müller-Tidow C, Schwäble J, Berdel WE, Serve H. The molecular pathogenesis

- of acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005;56(2):195–221.
136. Duployez N, Marceau-Renaut A, Boissel N, Petit A, Bucci M, Geffroy S, et al. Comprehensive mutational profiling of core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2451–9.
 137. Pandolfi PP. Oncogenes and tumor suppressors in the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Hum Mol Genet*. 2001;10(7):769–75.
 138. Kelly LM, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Amaral SM, Curley DP, et al. PML/RAR alfa and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(12):8283–8.
 139. Welch JS, Ley TJ, Link DC, Miller CA, Larson DE, Koboldt DC, et al. The origin and evolution of mutations in Acute Myeloid Leukemia. 2012;150(2):264–78.
 140. Jessica L. Pollock, PhD, Peter Westervelt, MD, PhD, Matthew J. Walter, MD, Andrew A. Lane, BE, and Timothy J. Ley M. Mouse models of acute promyelocytic leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2001;8:206–11.
 141. Conneely SE, Rau RE. The genomics of acute myeloid leukemia in children. *Cancer Metastasis Rev. Cancer and Metastasis Reviews*; 2020;39(1):189–209.
 142. Franks TM, McCloskey A, Shokirev M, Benner C, Rathore A, Hetzer MW. Nup98 recruits the Wdr82-Set1A/COMPASS complex to promoters to regulate H3K4 trimethylation in hematopoietic progenitor cells. *Genes Dev*. 2017;31(22):2222–34.
 143. Bertrums EJM, Smith JL, Harmon L, Ries RE, Wang Y-CJ, Alonzo TA, et al. Comprehensive molecular and clinical characterization of NUP98 fusions in pediatric acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2023.
 144. Espersen ADL, Noren-Nyström U, Abrahamsson J, Ha SY, Pronk CJ, Jahnukainen K, et al. Acute myeloid leukemia (AML) with t(7;12)(q36;p13) is associated with infancy and trisomy 19: Data from Nordic Society for Pediatric Hematology and Oncology (NOPHO-AML) and review of the literature. *Genes Chromosom Cancer*. 2018;57(7):359–65.
 145. Thirant C, Ignacimouttou C, Lopez CK, Diop M, Le Mouël L, Thiollier C, et al. ETO2-GLIS2 Hijacks Transcriptional Complexes to Drive Cellular Identity and Self-Renewal in Pediatric Acute Megakaryoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. 2017;31(3):452–65.
 146. Masetti R, Bertuccio SN, Pession A, Locatelli F. CBFA2T3-GLIS2-positive acute myeloid leukaemia. A peculiar paediatric entity. *Br J Haematol*. 2018;184(3):337–47.
 147. De Rooij JDE, Branstetter C, Ma J, Li Y, Walsh MP, Cheng J, et al. Pediatric non-Down syndrome acute megakaryoblastic leukemia is characterized by distinct genomic subsets with varying outcomes. *Nat Genet*. 2017;49(3):451–6.
 148. Sandahl JD, Coenen EA, Forestier E, Harbott J, Johansson B, Kerndrup G, et al. T(6;9)(p22;q34)/DEK-NUP214-rearranged pediatric myeloid leukemia: An international study of 62 patients. *Haematologica*. 2014;99(5):865–72.
 149. Montefiori LE, Bendig S, Gu Z, Chen X, Pölönen P, Ma X, et al. Enhancer hijacking drives oncogenic bcl11b expression in lineage-ambiguous stem cell leukemia. *Cancer Discov*. 2021;11(11):2846–67.
 150. Di Giacomo D, La Starza R, Gorello P, Pellanera F, Kalender Atak Z, De Keersmaecker K, et al. 14q32 rearrangements deregulating BCL11B mark a distinct subgroup of T-lymphoid and myeloid immature acute leukemia. *Blood*. 2021;138(9):773–84.

151. Bullinger L, Döhner K, Döhner H. Genomics of acute myeloid leukemia diagnosis and pathways. *J Clin Oncol*. 2017;35(9):934–46.
152. Levis M. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr*. 2013;2013:2020–6.
153. Mead AJ, Linch DC, Hills RK, Wheatley K, Burnett AK, Gale RE. FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016;110(4):1262–70.
154. Pratcorona M, Brunet S, Nomdedéu J, Ribera JM, Tormo M, Duarte R, et al. Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: Relevance to post-remission therapy. *Blood*. 2013;121(14):2734–8.
155. Qiu K yin, Liao X yu, Liu Y, Huang K, Li Y, Fang J pei, et al. Poor outcome of pediatric patients with acute myeloid leukemia harboring high FLT3/ITD allelic ratios. *Nat Commun*. Springer US; 2022;13(1):1–12.
156. Umeda M, Ma J, Huang BJ, Hagiwara K, Westover T, Abdelhamed S, et al. Integrated Genomic Analysis Identifies UBTF Tandem Duplications as a Recurrent Lesion in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. *Blood Cancer Discov*. 2022;3(3):194–207.
157. Bonaventure A, Harewood R, Stiller CA, Gatta G, Clavel J, Stefan DC, et al. Articles Worldwide comparison of survival from childhood leukaemia for 1995 – 2009 , by subtype , age , and sex (CONCORD-2): a population-based study of individual data for 89 828 children from 198 registries in 53 countries. 2017;202–17.
158. Smith M, Arthur D, Camitta B, Carroll AJ, Crist W, Gaynon P, et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 1996;14(1):18–24.
159. Ma X, Edmonson M, Yergeau D, Muzny DM, Hampton OA, Rusch M, et al. Rise and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric B-acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun*. 2015;6.
160. Ng SWK, Mitchell A, Kennedy JA, Chen WC, McLeod J, Ibrahimova N, et al. A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature*. 2016;540(7633):433–7.
161. Elsayed AH, Rafiee R, Cao X, Downing JR, Ribeiro R, Fan Y, et al. A 6-gene leukemic stem cell score identifies high risk pediatric acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2020;34(3):735–45.
162. Fornerod M, Ma J, Noort S, Liu Y, Walsh MP, Shi L, et al. Integrative Genomic Analysis of Pediatric Myeloid-Related Acute Leukemias Identifies Novel Subtypes and Prognostic Indicators. *Blood Cancer Discov*. 2021;2(6):586–99.
163. Dördelmann M, Reiter A, Borkhardt A, Ludwig WD, Götz N, Viehmann S, et al. Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1999;94(4):1209–17.
164. Creutzig U, Zimmermann M, Dworzak MN, Gibson B, Tamminga R, Abrahamsson J, et al. The prognostic significance of early treatment response in pediatric relapsed acute myeloid leukemia: Results of the international study relapsed AML 2001/01. *Haematologica*. 2014;99(9):1472–8.

165. Van Dongen JJM, Van Der Velden VHJ, Brüggemann M, Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: Need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood*. 2015;125(26):3996–4009.
166. Tierens A, Bjørklund E, Siitonen S, Marquart HV, Wulff-Juergensen G, Pelliniemi TT, et al. Residual disease detected by flow cytometry is an independent predictor of survival in childhood acute myeloid leukaemia; results of the NOPHO-AML 2004 study. *Br J Haematol*. 2016;174(4):600–9.
167. Campana D, Pui CH. Minimal residual disease–guided therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2017;129(14):1913–8.
168. Ossenkoppele G, Schuurhuis GJ. MRD in AML: Does it already guide therapy decision-making? *Hematology*. 2016;2016(1):356–65.
169. Denys B, Van Der Sluijs-Gelling AJ, Homburg C, Van Der Schoot CE, De Haas V, Philippé J, et al. Improved flow cytometric detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2013;27(3):635–41.
170. Van Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 1999;13(12):1901–28.
171. Burmeister T, Marschalek R, Schneider B, Meyer C, Gökbuget N, Schwartz S, et al. Monitoring minimal residual disease by quantification of genomic chromosomal breakpoint sequences in acute leukemias with MLL aberrations. *Leukemia*. 2006;20(3):451–7.
172. Maxwell RR, Cole PD. Pharmacogenetic Predictors of Treatment-Related Toxicity Among Children With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2017;12(3):176–86.
173. Pui CH, Yang JJ, Hunger SP, Pieters R, Schrappe M, Biondi A, et al. Childhood acute lymphoblastic leukemia: Progress through collaboration. *J Clin Oncol*. 2015;33(27):2938–48.
174. Kaspers GJL, Zimmermann M, Reinhardt D, Gibson BES, Tamminga RYJ, Aleinikova O, et al. Improved outcome in pediatric relapsed acute myeloid leukemia: Results of a randomized trial on liposomal daunorubicin by the international BFM study group. *J Clin Oncol*. 2013;31(5):599–607.
175. Zwaan CM, Kolb EA, Reinhardt D, Abrahamsson J, Adachi S, Aplenc R, et al. Collaborative efforts driving progress in pediatric acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2015;33(27):2949–62.
176. Martin Schrappe, M.D., Stephen P. Hunger, M.D., Ching-Hon Pui, M.D., Vaskar Saha, F.R.C.P.C.H., Paul S. Gaynon, M.D., André Baruchel, M.D., Valentino Conter, M.D., Jacques Otten, M.D., Akira Ohara, M.D., Ph.D., Anne Birgitta Versluys, M.D., Gabriele Esche PD, Abstract. Outcomes after Induction Failure in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* [Internet]. 2012;366(15):1371–81. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
177. Esteve J, Escoda L, Martín G, Rubio V, Díaz-Mediavilla J, González M, et al. Outcome of patients with acute promyelocytic leukemia failing to front-line treatment with all-trans

- retinoic acid and anthracycline-based chemotherapy (PETHEMA protocols LPA96 and LPA99): Benefit of an early intervention. *Leukemia*. 2007;21(3):446–52.
178. Wells RJ, Woods WG, Lampkin BC, Nesbit ME, Lee JW, Buckley JD, et al. Impact of high-dose cytarabine and asparaginase intensification on childhood acute myeloid leukemia: A report from the childrens cancer group. *J Clin Oncol*. 1993;11(3):538–45.
 179. Rasche M, Zimmermann M, Borschel L, Bourquin JP, Dworzak M, Klingebiel T, et al. Successes and challenges in the treatment of pediatric acute myeloid leukemia: a retrospective analysis of the AML-BFM trials from 1987 to 2012. *Leukemia*. 2018;32(10):2167–77.
 180. Fulbright JM, Raman S, McClellan WS, August KJ. Late effects of childhood leukemia therapy. *Curr Hematol Malig Rep*. 2011;6(3):195–205.
 181. Klonoff-Cohen H, Navarro A, Klonoff EA. Late effects awareness website for pediatric survivors of acute lymphocytic leukemia. *PLoS One*. 2018;13(2):1–14.
 182. Bochtler T, Stožel F, Heilig CE, Kunz C, Mohr B, Jauch A, et al. Clonal heterogeneity as detected by metaphase karyotyping is an indicator of poor prognosis in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2013;31(31):3898–905.
 183. Niewerth D, Creutzig U, Bierings MB, Kaspers GJL. A review on allogeneic stem cell transplantation for newly diagnosed pediatric acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010;116(13):2205–14.
 184. Hunger SP, Loh KM, Baker KS, Schultz KR. Controversies of and Unique Issues in Hematopoietic Cell Transplantation for Infant Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. American Society for Blood and Marrow Transplantation; 2009;15(1 SUPPL.):79–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2008.10.015>
 185. Reinhardt UCD. Current controversies: Which patients with acute myeloid leukaemia should receive a bone marrow transplantation? - An American view. *Br J Haematol*. 2002;118(2):378–84.
 186. Annesley CE, Brown P. Novel agents for the treatment of childhood acute leukemia. *Ther Adv Hematol*. 2015;6(2):61–79.
 187. Loke J, Khan JN, Wilson JS, Craddock C, Wheatley K. Mylotarg has potent anti-leukaemic effect: a systematic review and meta-analysis of anti-CD33 antibody treatment in acute myeloid leukaemia. *Ann Hematol*. 2015;94(3):361–73.
 188. Maus MV., Grupp SA, Porter DL, June CH. Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood*. 2014;123(17):2625–35.
 189. June MVM and CH. Making Better Chimeric Antigen Receptors for Adoptive T-cell Therapy Marcela. *Clin Cancer Res*. 2016;22(8):1875–84.
 190. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(5):439–48.
 191. Moorman AV., Harrison CJ, Buck GAN, Richards SM, Secker-Walker LM, Martineau M, et al. Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): Analysis of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. *Blood*. 2007;109(8):3189–97.

192. Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, Den Boer ML, Minden MD, et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet.* 2002;30(1):41–7.
193. Górecki M, Koziol I, Kopystecka A, Budzyńska J, Zawitkowska J, Lejman M. Updates in KMT2A Gene Rearrangement in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Biomedicines.* 2023;11(3).
194. Tkachuk DC, Kohler S, Cleary ML. Involvement of a homolog of *Drosophila trithorax* by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell.* 1992;71(4):691–700.
195. Gu Y, Nakamura T, Alder H, Prasad R, Canaani O, Cimino G, et al. The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to *Drosophila trithorax*, to the AF-4 gene. *Cell.* 1992;71(4):701–8.
196. Castiglioni S, Di Fede E, Bernardelli C, Lettieri A, Parodi C, Grazioli P, et al. KMT2A: Umbrella Gene for Multiple Diseases. *Genes (Basel).* 2022;13(3).
197. Winters AC, Bernt KM. MLL-rearranged leukemias- An update on science and clinical approaches. *Front Pediatr.* 2017;5(2):11–3.
198. Steinhilber D, Marschalek R. How to effectively treat acute leukemia patients bearing MLL-rearrangements ? *Biochem Pharmacol* [Internet]. The Author(s); 2018;147:183–90. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.09.007>
199. Ono R, Kumagai H, Nakajima H, Hishiya A, Taki T, Horikawa K, et al. Mixed-lineage-leukemia (MLL) fusion protein collaborates with Ras to induce acute leukemia through aberrant Hox expression and Raf activation. *Leukemia* [Internet]. Nature Publishing Group; 2009;23(12):2197–209. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2009.177>
200. Marschalek R. MLL Leukemia and Future Treatment Strategies. *Arch Pharm (Weinheim).* 2015;348(4):221–8.
201. Meyer C, Burmeister T, Gröger D, Tsaour G, Fechina L, Renneville A, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia.* 2018;32(2):273–84.
202. Meyer C, Larghero P, Almeida Lopes B, Burmeister T, Gröger D, Sutton R, et al. The KMT2A recombinome of acute leukemias in 2023. *Leukemia.* 2023;37(5):988–1005.
203. Sanjuan-pla A, Bueno C, Prieto C, Acha P, Stam RW, Marschalek R. Revisiting the biology of infant t(4;11)/MLL-AF41 B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2015;126(25):2676–86.
204. Fedders H, Alsadeq A, Schmah J, Vogiatzi F, Zimmermann, Martin, et al. The role of constitutive activation of FMS-related tyrosine kinase-3 and NRas/KRas mutational status in infants with KMT2A-rearranged acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2017;438–42.
205. Emerenciano M, Barbosa T da C, de Almeida Lopes B, Meyer C, Marschalek R, Pombo-de-Oliveira MS. Subclonality and prenatal origin of RAS mutations in KMT2A (MLL)-rearranged infant acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2015;170(2):268–71.
206. Driessen EMC, van Roon EHJ, Spijkers-Hagelstein JAP, Schneider P, de Lorenzo P, Valsecchi MG, et al. Frequencies and prognostic impact of RAS mutations in MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia in infants. *Haematologica.* 2013;98(6):937–44.
207. Lanza C, Gaidano G, Cimino G, Pastore C, Nomdedeu J, Volpe G, et al. Distribution of TP53 mutations among acute leukemias with MLL rearrangements. *Genes Chromosom Cancer.*

- 1996;15(1):48–53.
208. Stengel A, Schnittger S, Weissmann S, Kuznia S, Kern W, Kohlmann A, et al. TP53 mutations occur in 15.7% of ALL and are associated with MYC-rearrangement, low hypodiploidy, and a poor prognosis. *Blood*. 2014;124(2):251–8.
 209. Brown P, Pieters R, Biondi A. How I treat infant leukemia. *Blood*. 2019;133(3):205–14.
 210. Pieters R, De Lorenzo P, Ancliffe P, Aversa LA, Brethon B, Biondi A, et al. 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. *J Clin Oncol*. 2019;37(25):2246–56.
 211. Stutterheim J, Van Der Sluis IM, De Lorenzo P, Alten J, Ancliffe P, Attarbaschi A, et al. Clinical Implications of Minimal Residual Disease Detection in Infants with KMT2A - Rearranged Acute Lymphoblastic Leukemia Treated on the Interfant-06 Protocol. *J Clin Oncol*. 2021;39(6):652–62.
 212. Khalidi HS, Chang KL, Medeiros LJ, Brynes RK, Slovak ML, Murata-Collins JL, et al. Acute lymphoblastic leukemia: Survey of immunophenotype, French- American-British classification, frequency of myeloid antigen expression, and karyotypic abnormalities in 210 pediatric and adult cases. *Am J Clin Pathol*. 1999;111(4):467–76.
 213. Pui CH, Rubnitz JE, Hancock ML, Downing JR, Raimondi SC, Rivera GK, et al. Reappraisal of the clinical and biologic significance of myeloid- associated antigen expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 1998;16(12):3768–73.
 214. Bueno C, Montes R, Martín L, Prat I, Hernandez MC, Orfao A, et al. NG2 antigen is expressed in CD34+ HPCs and plasmacytoid dendritic cell precursors: Is NG2 expression in leukemia dependent on the target cell where leukemogenesis is triggered? *Leukemia*. 2008;22(8):1475–8.
 215. Li Q, Xing S, Zhang H, Mao X, Xiao M, Wang Y. FISH improves risk stratification in acute leukemia by identifying KMT2A abnormal copy number and rearrangements. *Sci Rep*. 2022;12(1):1–10.
 216. Meyer C, Lopes BA, Hélène AC, Chloé C, Wendy A, Sutton R, et al. Human MLL / KMT2A gene exhibits a second breakpoint cluster region for recurrent MLL – USP2 fusions To the Editor : Vol. 3. 2019. 2306-2340 p.
 217. Burmeister T, Meyer C, Gröger D, Hofmann J, Marschalek R. Evidence-based RT-PCR methods for the detection of the 8 most common MLL aberrations in acute leukemias. *Leuk Res* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;39(2):242–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2014.11.017>
 218. Meyer C, Schneider B, Reichel M, Angermueller S, Strehl S, Schnittger S, et al. Diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(2):449–54.
 219. Brown LM, Lonsdale A, Zhu A, Davidson NM, Schmidt B, Hawkins A, et al. The application of RNA sequencing for the diagnosis and genomic classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood Adv*. 2020;4(5):930–42.
 220. Lagacé K, Barabé F, Hébert J, Cellot S, Wilhelm BT. Identification of novel biomarkers for MLL-translocated acute myeloid leukemia. *Exp Hematol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2017;56:58–63. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2017.08.006>

221. Tomizawa D, Koh K, Sato T, Kinukawa N, Morimoto A, Isoyama K, et al. Outcome of risk-based therapy for infant acute lymphoblastic leukemia with or without an MLL gene rearrangement, with emphasis on late effects: A final report of two consecutive studies, MLL96 and MLL98, of the Japan Infant Leukemia Study Group. *Leukemia*. 2007;21(11):2258–63.
222. Pieters R, Schrappe M, De Lorenzo P, Hann I, De Rossi G, Felice M, et al. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. *Lancet*. 2007;370(9583):240–50.
223. Dreyer ZE, Hilden JM, Jones TL, Devidas M, Winick NJ, Willman CL, et al. Intensified Chemotherapy Without Sct in Infant ALL: Results From COG P9407 (Cohort 3) ZoAnn. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62(February):419–26.
224. Hilden JM, Dinndorf PA, Meerbaum SO, Sather H, Villaluna D, Heerema NA, et al. Analysis of prognostic factors of acute lymphoblastic leukemia in infants: Report on CCG 1953 from the Children’s Oncology Group. *Blood*. 2006;108(2):441–51.
225. Pigazzi M, Masetti R, Bresolin S, Beghin A, Di Meglio A, Gelain S, et al. MLL partner genes drive distinct gene expression profiles and genomic alterations in pediatric acute myeloid leukemia: An AIEOP study. *Leukemia*. 2011;25(3):560–3.
226. Balgobind B V., Raimondi SC, Harbott J, Zimmermann M, Alonzo TA, Auvrignon A, et al. Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: Results of an international retrospective study. *Blood*. 2009;114(12):2489–96.
227. Van Weelderen RE, Klein K, Harrison CJ, Jiang Y, Abrahamsson J, Arad-Cohen N, et al. Measurable Residual Disease and Fusion Partner Independently Predict Survival and Relapse Risk in Childhood KMT2A -Rearranged Acute Myeloid Leukemia: A Study by the International Berlin-Frankfurt-Münster Study Group. *J Clin Oncol*. 2023;41(16):2963–74.
228. Rubnitz JE, Raimondi SC, Tong X, Srivastava DK, Razzouk BI, Shurtleff SA, et al. Favorable Impact of the t(9;11) in Childhood Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2002;20(9):2302–9.
229. Yao J, Li G, Cui Z, Chen P, Wang J, Hu Z, et al. The Histone Deacetylase Inhibitor I1 Induces Differentiation of Acute Leukemia Cells With MLL Gene Rearrangements via Epigenetic Modification. *Front Pharmacol*. 2022;13(April):1–13.
230. Nebbioso A, Tambaro FP, Dell’Aversana C, Altucci L. Cancer epigenetics: Moving forward. *PLoS Genet*. 2018;14(6):1–25.
231. Gröbner SN, Worst BC, Weischenfeldt J, Buchhalter I, Kleinheinz K, Rudneva VA, et al. The landscape of genomic alterations across childhood cancers. *Nature*. 2018;555(7696):321–7.
232. Lander ES. Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;470(7333):187–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature09792>
233. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Erratum: Initial sequencing and analysis of the human genome: International Human Genome Sequencing Consortium (Nature (2001) 409 (860-921)). *Nature*. 2001;412(6846):565–6.
234. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. Celera_genoma. *Science* (80-) [Internet]. 2001;291(February):1–49. Available from:

- sftp://cerca@192.168.2.5/home/cerca/Desktop/data/laptop_files/info/biologia/homo_sapiens/human_genome/Celera_genoma.pdf%5Cnpapers2://publication/uuid/21C9A6AC-3A9B-4931-BB7D-CE922633B16B
235. Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi AM, et al. Landscape of transcription in human cells. *Physiol Behav.* 2013;176(3):139–48.
 236. Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigó R, Gingeras TR, Margulies EH, et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature.* 2007;447(7146):799–816.
 237. Costa FF. Non-coding RNAs: Meet thy masters. *BioEssays.* 2010;32(7):599–608.
 238. Ecker J et al. ENCODE explained. *Nature.* 2012;489(ENCODE explained):6–7.
 239. Gibb EA, Brown CJ, Lam WL. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Mol Cancer.* 2011;10:1–17.
 240. Carrington JC, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. Vol. 301, *Science.* 2003. p. 336–8.
 241. Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways. *Nat Publ Gr [Internet]. Nature Publishing Group;* 2015;15(6):321–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3932>
 242. David P. Bartel. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell.* 2004;116:281–97.
 243. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* 2004;5(7):522–31.
 244. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquienell AE, Bettlenger JC, Rougvle AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000 Feb 24;403(6772):901–6.
 245. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature.* 2000 Nov 2;408(6808):86–9.
 246. Bartel DP. MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions. 2009;1326(2):215–33.
 247. Vishnoi A, Rani S. MiRNA biogenesis and regulation of diseases: An overview. In: *Methods in Molecular Biology.* Humana Press Inc.; 2017.p.1–10.
 248. Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2014;9:287–314.
 249. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(2):126–39.
 250. Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways. *Nat Publ Gr. Nature Publishing Group;* 2015;15(6):321–33.
 251. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore1 PD. Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex Dianne. *Cell.* 2003;115(5):199–208.
 252. Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer HHS Public Access. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(6):321–33.

253. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9(8):1–12.
254. Yang S, Maurin T, Robine N, Rasmussen KD, Jeffrey KL, Chandwani R, et al. Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(34):15163–8.
255. Babiarz JE, Ruby JG, Wang Y, Bartel DP, Blelloch R. Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other microprocessor-independent, dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev*. 2008;22(20):2773–85.
256. Ruby JG, Calvin H. Jan, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Bone [Internet]*. 2011;23(1):1–7.
257. Beermann J, Piccoli MT, Viereck J, Thum T. Non-coding rnas in development and disease: Background, mechanisms, and therapeutic approaches. *Physiol Rev*. 2016;96(4):1297–325.
258. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: MicroRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*. 2009;11(3):228–34.
259. Ramiro Garzon, Guido Marcucci and CMC. Targeting MicroRNAs in Cancer: Rationale, Strategies and Challenges. *Nat Rev Drug Discov [Internet]*. 2010;9(10):775–89. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
260. Khraiwesh B, Arif MA, Seumel GI, Ossowski S, Weigel D, Reski R, et al. Transcriptional Control of Gene Expression by MicroRNAs. *Cell*. 2010;140(1):111–22.
261. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, et al. A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing. 2007;129(7):1401–14.
262. Davis BN, Hata A. Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell Commun Signal*. 2009;7:1–22.
263. Michael J. Turner and Frank J. Slack. Transcriptional control of microRNA expression in *C. elegans*: Promoting better understanding. *RNA Biol*. 2009;6(1):49–53.
264. Ryan BM, Robles AI, Harris CC. Genetic variation in microRNA networks: The implications for cancer research. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(6):389–402.
265. Coulthard S, Chase A, Orchard K, Watmore A, Vora A, Goldman JM, et al. Two cases of inv(8)(p11q13) in AML with erythrophagocytosis: A new cytogenetic variant. *Br J Haematol*. 1998;100(3):561–3.
266. Elihu Estey HD, Lancet. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*. 2006;368:1894–907.
267. Dick DB and John E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med [Internet]*. 1997;3:303–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9585240>
268. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet [Internet]*. Nature Publishing Group; 2010;11(9):597–610. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2843>
269. Almeida MI, Reis RM, Calin GA. Decoy activity through microRNAs: The therapeutic implications. *Expert Opin Biol Ther*. 2012;12(9):1153–9.
270. Giles FJ, Borthakur G, Ravandi F, Faderl S, Verstovsek S, Thomas D, et al. The

- haematopoietic cell transplantation comorbidity index score is predictive of early death and survival in patients over 60 years of age receiving induction therapy for acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2007;136(4):624–7.
271. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs Modulate Hematopoietic Lineage Differentiation. *Science.* 2004 Jan 2;303(5654):83–6.
 272. Gerrits A, Walasek MA, Olthof S, Weersing E, Ritsema M, Zwart E, et al. Genetic screen identifies microRNA cluster 99b/let-7e/125a as a regulator of primitive hematopoietic cells. *Blood* [Internet]. 2012;119(2):377–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>,
 273. O’Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Boldin MP, Taganov KD, Nicoll J, et al. Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J Exp Med.* 2008 Mar 17;205(3):585–94.
 274. Zhou B, Wang S, Mayr C, Bartel DP, Lodish HF. miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely [Internet]. 2007. Available from: www.pnas.org/cgi/content/full/
 275. Velu CS, Baktula AM, Grimes HL. Gfi1 regulates miR-21 and miR-196b to control myelopoiesis. 2009; Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/113/19/4720/1484461/zh801909004720.pdf>
 276. Guo S, Lu J, Schlanger R, Zhang H, Wang JY, Fox MC, et al. MicroRNA miR-125a controls hematopoietic stem cell number. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Aug 10;107(32):14229–34.
 277. Lazare SS, Wojtowicz EE, Bystrykh L V., de Haan G. MicroRNAs in hematopoiesis. Vol. 329, *Experimental Cell Research.* Academic Press Inc.; 2014. p. 234–8.
 278. Cobb BS, Nesterova TB, Thompson E, Hertweck A, O’Connor E, Godwin J, et al. T cell lineage choice and differentiation in the absence of the RNase III enzyme Dicer. *J Exp Med.* 2005 May 2;201(9):1367–73.
 279. Adrian Calin G, Dan Dumitru C, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia [Internet]. 2002. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.242606799
 280. Szczepanek J. Role of microRNA dysregulation in childhood acute leukemias: diagnostics, monitoring and therapeutics: A comprehensive review. *World J Clin Oncol.* Baishideng Publishing Group Inc.; 2020 Jun 24;11(6):348–69.
 281. Almeida RS, Costa e Silva M, Coutinho LL, Garcia Gomes R, Pedrosa F, Massaro JD, et al. MicroRNA expression profiles discriminate childhood T- from B-acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol.* 2019;37(1):103–12.
 282. Grobbelaar C, Ford AM. The Role of MicroRNA in Paediatric Acute Lymphoblastic Leukaemia: Challenges for Diagnosis and Therapy. *J Oncol.* Hindawi; 2019;2019:1–14.
 283. Mi S, Lu J, Sun M, Li Z, Zhang H, Neilly MB, et al. MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(50):19971–6.
 284. Zhang H, Luo X, Zhang P, Huang L, Zheng Y, Wu J, et al. MicroRNA Patterns Associated with Clinical Prognostic Parameters and CNS Relapse Prediction in Pediatric Acute

- Leukemia. *PLoS One*. 2009;4(11).
285. Schotte D, Menezes RX De, Moqadam FA, Khankahdani LM, Lange-turenhout E, Chen C, et al. Original Articles MicroRNA characterize genetic diversity and drug resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia. 2011;96(5):703–11.
 286. Nabhan M, Louka ML, Khairy E, Tash F, Ali-Labib R, El-Habashy S. MicroRNA-181a and its target Smad 7 as potential biomarkers for tracking child acute lymphoblastic leukemia. *Gene*. 2017;628(February):253–8.
 287. Yang YL, Yen CT, Pai CH, Chen HY, Yu SL, Lin CY, et al. A double negative loop comprising ETV6/RUNX1 and MIR181A1 contributes to differentiation block in t(12;21)-positive acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One*. 2015;10(11):1–16.
 288. Díaz-Beyá M, Brunet S, Nomdedéu J, Tejero R, Díaz T, Pratcorona M, et al. MicroRNA expression at diagnosis adds relevant prognostic information to molecular categorization in patients with intermediate-risk cytogenetic acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2014;28(4):804–12.
 289. De Oliveira JC, Scrideli CA, Brassesco MS, Morales AG, Pezuk JA, Queiroz R de P, et al. Differential MiRNA expression in childhood acute lymphoblastic leukemia and association with clinical and biological features. *Leuk Res [Internet]*. Elsevier Ltd; 2012;36(3):293–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2011.10.005>
 290. Mendler JH, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Becker H, Metzeler KH, et al. RUNX1 mutations are associated with poor outcome in younger and older patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and with distinct gene and microRNA expression signatures. *J Clin Oncol*. 2012;30(25):3109–18.
 291. Jongen-Lavrencic M, Sun SM, Dijkstra MK, Valk PJM, Löwenberg B. MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008;111(10):5078–85.
 292. Garzon R, Volinia S, Liu CG, Fernandez-Cymering C, Palumbo T, Pichiorri F, et al. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008;111(6):3183–9.
 293. Faraoni I, Laterza S, Ardiri D, Ciardi C, Fazi F, Lo-Coco F. MiR-424 and miR-155 deregulated expression in cytogenetically normal acute myeloid leukaemia: Correlation with NPM1 and FLT3 mutation status. *J Hematol Oncol* 2012;5(1):1.
 294. Daschkey S, Röttgers S, Giri A, Bradtke J, Teigler-Schlegel A, Meister G, et al. MicroRNAs Distinguish Cytogenetic Subgroups in Pediatric AML and Contribute to Complex Regulatory Networks in AML-Relevant Pathways. *PLoS One*. 2013;8(2):1–16.
 295. So AYL, Sookram R, Chaudhuri AA, Minisandram A, Cheng D, Xie C, et al. Dual mechanisms by which miR-125b represses IRF4 to induce myeloid and B-cell leukemias. *Blood*. 2014;124(9):1502–12.
 296. Bousquet M, Harris MH, Zhou B, Lodish HF. MicroRNA miR-125b causes leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(50):21558–63.
 297. Sun YM, Lin KY, Chen YQ. Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts. *J Hematol Oncol [Internet]*. Journal of Hematology & Oncology; 2013;6(1):1. Available from: Journal of Hematology & Oncology
 298. Li XJ, Luo XQ, Han BW, Duan FT, Wei PP, Chen YQ. MicroRNA-100/99a, deregulated in

- acute lymphoblastic leukaemia, suppress proliferation and promote apoptosis by regulating the FKBP51 and IGF1R/mTOR signalling pathways. *Br J Cancer*. 2013;109(8):2189–98.
299. Kaddar T, Chien WW, Bertrand Y, Pages MP, Rouault JP, Salles G, et al. Prognostic value of miR-16 expression in childhood acute lymphoblastic leukemia relationships to normal and malignant lymphocyte proliferation. *Leuk Res*. 2009;33(9):1217–23.
 300. Organista-Nava J, Gómez-Gómez Y, Illades-Aguiar B, Del Carmen Alarcón-Romero L, Saavedra-Herrera MV, Rivera-Ramírez AB, et al. High miR-24 expression is associated with risk of relapse and poor survival in acute leukemia. *Oncol Rep*. 2015;33(4):1639–49.
 301. Yan J, Jiang N, Huang G, Tay JLS, Lin B, Bi C, et al. Deregulated MIR335 that targets MAPK1 is implicated in poor outcome of paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2013;163(1):93–103.
 302. Zhu L, Liu J, Liang F, Rayner S, Xiong J. Predicting response to preoperative chemotherapy agents by identifying drug action on modeled microRNA regulation networks. *PLoS One*. 2014;9(5).
 303. Ghodousi ES, Rahgozar S. MicroRNA-326 and microRNA-200c: Two novel biomarkers for diagnosis and prognosis of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Cell Biochem*. 2018;119(7):6024–32.
 304. Piatopoulou D, Avgeris M, Marmarinos A, Xagorari M, Baka M, Doganis D, et al. MiR-125b predicts childhood acute lymphoblastic leukaemia poor response to BFM chemotherapy treatment. *Br J Cancer* [Internet]. Nature Publishing Group; 2017;117(6):801–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2017.256>
 305. Gefen N, Binder V, Zaliova M, Linka Y, Morrow M, Novosel A, et al. Hsa-mir-125b-2 is highly expressed in childhood ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) leukemias and confers survival advantage to growth inhibitory signals independent of p53. *Leukemia*. 2010;24(1):89–96.
 306. Gambari R, Brognara E, Spandidos DA, Fabbri E. Targeting oncomiRNAs and mimicking tumor suppressor miRNAs: Ew trends in the development of miRNA therapeutic strategies in oncology (Review). *Int J Oncol*. 2016;49(1):5–32.
 307. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. MiRBase: From microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res*. Oxford University Press; 2018;47:155–62.
 308. Kozomara A, Griffiths-Jones S. MiRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:68–73.
 309. Kozomara A, Griffiths-Jones S. MiRBase: Integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2011;39:152–7.
 310. Griffiths-Jones S, Saini HK, Van Dongen S, Enright AJ. miRBase: Tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*. 2008;36:154–8.
 311. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res*. 2006;34:140–4.
 312. Griffiths-Jones S. The microRNA registry. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:109–11.
 313. Meyers BC, Axtell MJ, Bartel B, Bartel DP, Baulcombe D, Bowman JL, et al. Criteria for annotation of plant microRNAs. *Plant Cell*. 2008;20(12):3186–90.
 314. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. MiRBase: From microRNA sequences to

- function. *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press; 2018;47:155–62.
315. Griffiths-Jones S, Saini HK, Van Dongen S, Enright AJ. miRBase: Tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* 2008;36:154–8.
 316. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:140–4.
 317. Griffiths-Jones S. The microRNA registry. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:109–11.
 318. McGeary SE, Lin KS, Shi CY, Pham TM, Bisaria N, Kelley GM, et al. The biochemical basis of microRNA targeting efficacy. *Science.* 2019;366:64-72.
 319. Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife.* 2015;4(8):1–38.
 320. Vlachos IS, Kostoulas N, Vergoulis T, Georgakilas G, Reczko M, Maragkakis M, et al. DIANA miRPath v.2.0: Investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:498–504.
 321. Zhou R, Mo W, Wang S, Zhou W, Chen X, Pan S. miR-141-3p and TRAF5 Network Contributes to the Progression of T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cell Transplant.* 2019;28:59–65.
 322. Agirre X, Martínez-Climent JÁ, Odero MD, Prósper F. Epigenetic regulation of miRNA genes in acute leukemia. *Leukemia.* 2012;26(3):395–403.
 323. Chuang MK, Chiu YC, Chou WC, Hou HA, Chuang EY, Tien HF. A 3-microRNA scoring system for prognostication in de novo acute myeloid leukemia patients [Internet]. Vol. 29, *Leukemia.* Nature Publishing Group; 2015. 1051-1059 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2014.333>
 324. Emmrich S, Katsman-Kuipers JE, Henke K, Khatib ME, Jammal R, Engeland F, et al. MiR-9 is a tumor suppressor in pediatric AML with t(8;21). *Leukemia* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014;28(5):1022–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2013.357>
 325. Chen P, Price C, Li Z, Li Y, Cao D, Wiley A, et al. miR-9 is an essential oncogenic microRNA specifically overexpressed in mixed lineage leukemia-rearranged leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(28):11511–6.
 326. Tian C, You MJ, Yu Y, Zhu L, Zheng G, Zhang Y. MicroRNA-9 promotes proliferation of leukemia cells in adult CD34-positive acute myeloid leukemia with normal karyotype by downregulation of Hes1. *Tumor Biol.* 2016;37(6):7461–71.
 327. Violaine Havelange, Stauffer N, Volinia CCEHS, Michael Andreeff GM, Carlo M. Croce A, Garzon R. Functional implications of microRNAs in acute myeloid leukemia by integrating microRNA and mRNA expression profiling. *Cancer.* 2011;117(20):4696–706.
 328. Chen S, Chen Y, Zhu Z, Tan H, Lu J, Qin P, et al. Identification of the key genes and micrnas in adult acute myeloid leukemia with FLT3 mutation by bioinformatics analysis. *Int J Med Sci.* 2020;17(9):1269–80.
 329. Vandewalle V, Essaghir A, Bollaert E, Lenglez S, Graux C, Schoemans H, et al. miR-15a-5p and miR-21-5p contribute to chemoresistance in cytogenetically normal acute myeloid leukaemia by targeting PDCD4, ARL2 and BTG2. *J Cell Mol Med.* 2021;25(1):575–85.
 330. Lovat F, Fassan M, Sacchi D, Ranganathan P, Palamarchuk A, Bill M, et al. Knockout of

- both miR-15/16 loci induces acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(51):13069–74.
331. Hong Z, Zhang R, Qi H. Diagnostic and prognostic relevance of serum miR-195 in pediatric acute myeloid leukemia. *Cancer Biomark*. 2018;21(2):269–75.
332. Mi S, Li Z, Chen P, He C, Cao D, Elkahlon A, et al. Aberrant overexpression and function of the miR-17-92 cluster in MLL-rearranged acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2010;107(8):3710–5. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0914900107>
333. He Z, Liao Z, Chen S, Li B, Yu Z, Luo G, et al. Downregulated miR-17, miR-29c, miR-92a and miR-214 may be related to BCL11B overexpression in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2018;14(5):e259–65.
334. Mi S, Li Z, Chen P, He C, Cao D, Elkahlon A, et al. Aberrant overexpression and function of the miR-17-92 cluster in MLL-rearranged acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107(8):3710–5.
335. Mosakhani N, Missiry M El, Vakkila E, Knuutila S, Vakkila J. Low expression of miR-18a as a characteristic of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2017;39(8):585–8.
336. Sanghvi VR, Mavrakis KJ, Van Der Meulen J, Boice M, Wolfe AL, Carty M, et al. Characterization of a set of tumor suppressor microRNAs in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Signal*. 2014;7(352):1–23.
337. Cheng Z, Dai Y, Huang W, Zhong Q, Zhu P, Zhang W, et al. Prognostic Value of MicroRNA-20b in Acute Myeloid Leukemia. *Front Oncol*. 2021;10(2):1–9.
338. Papageorgiou SG, Kontos CK, Tsiakanikas P, Stavroulaki G, Bouchla A, Vasilatou D, et al. Elevated miR-20b-5p expression in peripheral blood mononuclear cells: A novel, independent molecular biomarker of favorable prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res [Internet]*. Elsevier Ltd; 2018;70:1–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2018.04.014>
339. Zhang T, Lin J, Zhou J, Li X, Zhang W, Guo H, et al. High bone marrow miR-19b level predicts poor prognosis and disease recurrence in de novo acute myeloid leukemia. *Gene*. 2018;640(June 2017):79–85.
340. Junker F, Chabloz A, Koch U, Radtke F. Dicer1 imparts essential survival cues in Notch-driven T-ALL via miR-21-mediated tumor suppressor Pcd4 repression. *Blood*. 2015;126(8):993–1004.
341. Song SJ, Poliseno L, Song MS, Ala U, Webster K, Ng C, et al. MicroRNA-Antagonism Regulates Breast Cancer Stemness and Metastasis via. *Cell [Internet]*. 2013;2(2):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.026>
342. Yin JY, Tang Q, Qian W, Qian J, Lin J, Wen XM, et al. Increased expression of miR-24 is associated with acute myeloid leukemia with t(8;21). *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(11):8032–8.
343. Huang S, Yang H, Li Y, Feng C, Gao L, Chen GF, et al. Prognostic Significance of Mixed-Lineage Leukemia (MLL) Gene Detected by Real-Time Fluorescence Quantitative PCR Assay in Acute Myeloid Leukemia. *Med Sci Monit*. 2016;22:3009–17.
344. Xu L, Xu Y, Jing Z, Wang X, Zha X, Zeng C, et al. Altered expression pattern of miR-29a,

- miR-29b and the target genes in myeloid leukemia. *Exp Hematol Oncol*. 2014;3(1):1–7.
345. Ngankeu A, Ranganathan P, Havelange V, Nicolet D, Volinia S, Powell BL, et al. Discovery and functional implications of a miR-29b-1/miR-29a cluster polymorphism in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2018;9(4):4354–65.
 346. Tang LJ, Sun GK, Zhang TJ, Wu DH, Zhou JD, Ma BB, et al. Down-regulation of miR-29c is a prognostic biomarker in acute myeloid leukemia and can reduce the sensitivity of leukemic cells to decitabine. *Cancer Cell Int* [Internet]. BioMed Central; 2019;19(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0894-y>
 347. Ortega M, Bhatnagar H, Lin AP, Wang L, Aster JC, Sill H, et al. A microRNA-mediated regulatory loop modulates NOTCH and MYC oncogenic signals in B- and T-cell malignancies. *Leukemia* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015;29(4):968–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2014.302>
 348. Ultimo S, Martelli AM, Zauli G, Vitale M, Calin GA, Neri LM. Roles and clinical implications of microRNAs in acute lymphoblastic leukemia. *J Cell Physiol*. 2018;233(8):5642–54.
 349. Swierczynski S, Klieser E, Illig R, Alinger-Scharinger B, Kiesslich T, Neureiter D. Histone deacetylation meets miRNA: epigenetics and post-transcriptional regulation in cancer and chronic diseases. *Expert Opin Biol Ther* [Internet]. 2015;15(5):651–64. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14712598.2015.1025047>
 350. Nemes K, Csóka M, Nagy N, Márk Á, Váradi Z, Dankó T, et al. Expression of Certain Leukemia/Lymphoma Related microRNAs and its Correlation with Prognosis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pathol Oncol Res*. 2015;21(3):597–604.
 351. Zheng ZZ, Ma YP, Wu RH, Rong G, Li C, Li GX, et al. Serum miR-133 as a novel biomarker for predicting treatment response and survival in acute myeloid leukemia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(2):777–82.
 352. Yamamoto H, Lu J, Oba S, Kawamata T, Yoshimi A, Kurosaki N, et al. MiR-133 regulates Evi1 expression in AML cells as a potential therapeutic target. *Sci Rep* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016;6(December 2015):1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep19204>
 353. Qin L, Deng HY, Chen SJ, Wei W, Zhang YT. miR-139 acts as a tumor suppressor in T-cell acute lymphoblastic leukemia by targeting CX chemokine receptor 4. *Am J Transl Res*. 2017;9(9):4059–70.
 354. Emmrich S, Engeland F, El-Khatib M, Henke K, Obulkasim A, Schöning J, et al. MIR-139-5p controls translation in myeloid leukemia through EIF4G2. *Oncogene*. 2016;35(14):1822–31.
 355. Correia NC, Melão A, Póvoa V, Sarmiento L, De Cedron MG, Malumbres M, et al. microRNAs regulate TAL1 expression in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*. 2016;7(7):8268–81.
 356. Dahlhaus M, Roolf C, Ruck S, Lange S, Freund M JC. Expression and prognostic significance of hsa-miR-142-3p in acute leukemias. *Neoplasma*. 2013;60(5):607–16.
 357. Ghisi M, Corradin A, Basso K, Frasson C, Serafin V, Mukherjee S, et al. Modulation of microRNA expression in human T-cell development: Targeting of NOTCH3 by miR-150. *Blood*. 2011;117(26):7053–62.
 358. Bousquet M, Zhuang G, Meng C, Ying W, Cheruku PS, Shie AT, et al. MiR-150 blocks MLL-

- AF9-associated leukemia through oncogene repression. *Mol Cancer Res.* 2013;11(8):912–22.
359. Salemi D, Cammarata G, Agueli C, Augugliaro L, Corrado C, Bica MG, et al. MiR-155 regulative network in FLT3 mutated acute myeloid leukemia. *Leuk Res [Internet]. Elsevier Ltd;* 2015;39(8):883–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2015.04.017>
 360. Weng H, Lal K, Yang FF, Chen J. The pathological role and prognostic impact of miR-181 in acute myeloid leukemia Hengyou. *Cancer Genet.* 2016;208(5):225–9.
 361. Zheng Z, Zheng X, Zhu Y, Gu X, Gu W, Xie X, et al. miR-183-5p Inhibits occurrence and progression of acute myeloid leukemia via targeting Erbin. *Mol Ther [Internet]. Elsevier Ltd.;* 2019;27(3):542–58. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.01.016>
 362. Ramani R, Megason G, Schallheim J, Karlson C, Vijayakumar V, Vijayakumar S, et al. Integrative analysis of microRNA-mediated gene signatures and pathways modulating white blood cell count in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Biomark Insights.* 2017;12:1–12.
 363. Tian C, Zhang L, Li X, Zhang Y, Li J, Chen L. Low miR-192 expression predicts poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia. *Cancer Biomarkers.* 2018;22(2):209–15.
 364. Sayadi M, Ajdary S, Nadali F, Rostami S, Fahtabad ME. Tumor suppressive function of microRNA-192 in acute lymphoblastic leukemia. *Bosn J Basic Med Sci.* 2017;17(3):248–54.
 365. Bhayadia R, Krowiorz K, Haetscher N, Jammal R, Emmrich S, Obulkasim A, et al. Endogenous tumor suppressor microRNA-193b: Therapeutic and prognostic value in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2018;36(10):1007–16.
 366. Dell'Aversana C, Giorgio C, D'Amato L, Lania G, Matarese F, Saeed S, et al. MiR-194-5p/BCLAF1 deregulation in AML tumorigenesis. *Leukemia.* 2017;31(11):2315–25.
 367. Li Y, Zhang G, Wu B, Yang W, Liu Z. MiR-199a-5p Represses protective autophagy and overcomes chemoresistance by directly targeting DRAM1 in acute myeloid leukemia. *J Oncol. Hindawi;* 2019;2019.
 368. Favreau AJ, McGlaufflin RE, Duarte CW, Sathyanarayana P. miR-199b, a novel tumor suppressor miRNA in acute myeloid leukemia with prognostic implications. *Exp Hematol Oncol. BioMed Central;* 2016;5(1):1–11.
 369. Lee YG, Kim I, Oh S, Shin DY, Koh Y, Lee KW. Small rna sequencing profiles of mir-181 and mir-221, the most relevant micrnas in acute myeloid leukemia. *Korean J Intern Med.* 2019;34(1):178–83.
 370. Coskun E, Neumann M, Schlee C, Liebertz F, Heesch S, Goekbuget N, et al. MicroRNA profiling reveals aberrant microRNA expression in adult ETP-ALL and functional studies implicate a role for miR-222 in acute leukemia. *Leuk Res [Internet]. Elsevier Ltd;* 2013;37(6):647–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2013.02.019>
 371. Butrym A, Rybka J, Baczyńska D, Tukiendorf A, Kuliczowski K, Mazur G. Expression of microRNA-331 can be used as a predictor for response to therapy and survival in acute myeloid leukemia patients. *Biomark Med.* 2015;9(5):453–60.
 372. Elhamamsy AR, Sharkawy MS El, Zanaty AF, Mahrous MA, Mohamed AE, Abushaaban EA. Circulating miR-92a, miR-143 and miR-342 in Plasma are Novel Potential Biomarkers for

- Acute Myeloid Leukemia. *Int J Mol Cell Med*. 2017;6(2):77–86.
373. Ju X, Li D, Shi Q, Hou H, Sun N, Shen B. Differential microRNA expression in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol*. 2009;26(1):1–10.
374. Li X, Sanda T, Thomas Look A, Novina CD, von Boehmer H. Repression of tumor suppressor miR-451 is essential for NOTCH1-induced oncogenesis in T-ALL. *J Exp Med*. 2011;208(4):663–75.
375. Avigad S, Verly IR, Lebel A, Kordi O, Shichrur K, Ohali A, et al. miR expression profiling at diagnosis predicts relapse in pediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes, Chromosom Cancer* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2016 Apr 1 [cited 2022 Oct 14];55(4):328–39. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/gcc.22334>
376. Phipson B, Lee S, Majewski IJ, Alexander WS, Smyth G. Robust Hyperparameter Estimation Protects. *Ann Appl Stat*. 2016;10(2):946–63.
377. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2016.
378. Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Karagkouni D, Vergoulis T, et al. DIANA-miRPath v3.0: Deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(W1):W460–6.
379. Kaplan E, Meier P. Non parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc*. 1958;(53):457–81.
380. John D. Kalbfleisch RLP. *The Statistical Analysis of Failure Time Data, Second Edition* [Internet]. John Wiley & Sons, editor. 2002. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118032985>
381. Cox D. Regression models and life-tables. *J R Stat Soc B*. 1972;(34):187–220.
382. Heinze G, Schemper M. A solution to the problem of monotone likelihood in Cox regression. *Biometrics*. 2001;57(1):114–9.
383. Contal C, O’Quigley J. An application of changepoint methods in studying the effect of age on survival in breast cancer. *Comput Stat Data Anal*. 1999;30(3):253–70.
384. Harrell FE, Califf RM, Pryor DB, Lee KL, Rosati RA. Evaluating the Yield of Medical Tests. *JAMA J Am Med Assoc*. 1982;247(18):2543–6.
385. Holm S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Stat* [Internet]. 1979;6(2):65–70. Available from: <http://www.jstor.org/stable/4615733>
386. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. [Internet]. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2022. Available from: <https://www.r-project.org/>.
387. John D. Kalbfleisch RLP. *The Statistical Analysis of Failure Time Data, Second Edition*. John Wiley & Sons, editor. 2002. 1-27 p.
388. Krivtsov A V., Twomey D, Feng Z, Stubbs MC, Wang Y, Faber J, et al. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature*. 2006;442(7104):818–22.
389. Yeung J, Esposito MT, Gandillet A, Zeisig BB, Griessinger E, Bonnet D, et al. β -Catenin Mediates the Establishment and Drug Resistance of MLL Leukemic Stem Cells. *Cancer Cell*

- [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;18(6):606–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2010.10.032>
390. Papaemmanuil E, Ph D, Gerstung M, Ph D, Bullinger L, Gaidzik VI, et al. Europe PMC Funders Group Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. 2016;374(23):2209–21.
 391. Zhi F, Cao X, Xie X, Wang B, Dong W, Gu W, et al. Identification of Circulating MicroRNAs as Potential Biomarkers for Detecting Acute Myeloid Leukemia. PLoS One. 2013;8(2).
 392. Mi S, Lu J, Sun M, Li Z, Zhang H, Neilly MB, et al. MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. Proc Natl Acad Sci. 2007;104(50):19971–6.
 393. Avigad S, Verly IR, Lebel A, Kordi O, Shichrur K, Ohali A, et al. miR expression profiling at diagnosis predicts relapse in pediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. Genes, Chromosom Cancer. John Wiley & Sons, Ltd; 2016 Apr;55(4):328–39.
 394. Wang Y, Li Z, He C, Wang D, Yuan X, Chen J, et al. MicroRNAs expression signatures are associated with lineage and survival in acute leukemias. Blood Cells Mol Dis. 2010;15(44):191–7.
 395. Alcalay M, Tiacci E, Bergomas R, Bigerna B, Venturini E, Minardi SP, et al. Acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic nucleophosmin (NPMc+ AML) shows a distinct gene expression profile characterized by up-regulation of genes involved in stem-cell maintenance. Blood. 2005;106(3):899–902.
 396. Ikeda D, Chi S, Uchiyama S, Nakamura H, Guo YM, Yamauchi N, et al. Molecular Classification and Overcoming Therapy Resistance for Acute Myeloid Leukemia with Adverse Genetic Factors. Int J Mol Sci. 2022;23(11).
 397. Syeda ZA, Langden SSS, Munkhzul C, Lee M, Song SJ. Regulatory mechanism of microRNA expression in cancer. Int J Mol Sci. 2020;21(5).
 398. Leva G Di, Garofalo M, Croce CM. microRNAs in cancer. Annu Rev Pathol. 2014;9:287–314.
 399. Wuchty S, Arjona D, Bozdog S, Bauer PO. Involvement of microRNA families in cancer. Nucleic Acids Res. 2012;40(17):8219–26.
 400. Lee YS, Dutta A. [13]MicroRNAs in Cancer Contents : Annu Rev Pathol. 2009;4:199–227.
 401. Carvalho de Oliveira J, Molinari Roberto G, Baroni M, Bezerra Salomão K, Alejandra Pezuk J, Sol Brassesco M. MiRNA dysregulation in childhood hematological cancer. Int J Mol Sci. 2018;19(9).
 402. Galardi A, Colletti M, Di Paolo V, Vitullo P, Antonetti L, Russo I, et al. Exosomal MiRNAs in pediatric cancers. Int J Mol Sci. 2019;20(18).
 403. Yoshida K, Yamamoto Y, Ochiya T. miRNA signaling networks in cancer stem cells. Regen Ther [Internet]. Elsevier Ltd; 2021;17:1–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.reth.2021.01.004>
 404. Xiao Y, Su C, Deng T. miR-223 decreases cell proliferation and enhances cell apoptosis in acute myeloid leukemia via targeting FBXW7. Oncol Lett. 2016;12(5):3531–6.
 405. Anelli L, Zagaria A, Specchia G, Musto P, Albano F. Dysregulation of mirna in leukemia: Exploiting mirna expression profiles as biomarkers. Int J Mol Sci. 2021;22(13).

406. Huang X, Schwind S, Santhanam R, Eisfeld AK, Chiang C ling, Lanckenau M, et al. Targeting the RAS/MAPK pathway with miR-181a in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2016;7(37):59273–86.
407. Mardani R, Jafari Najaf Abadi MH, Motieian M, Taghizadeh-Boroujeni S, Bayat A, Farsinezhad A, et al. MicroRNA in leukemia: Tumor suppressors and oncogenes with prognostic potential. *J Cell Physiol*. 2019;234(6):8465–86.
408. Li G, Song Y, Zhang Y, Wang H, Xie J. MIR-34b targets HSF1 to suppress cell survival in acute Myeloid Leukemia. *Oncol Res*. 2016;24(2):109–16.
409. Grandits AM, Wieser R. Gene expression changes contribute to stemness and therapy resistance of relapsed acute myeloid leukemia: roles of SOCS2, CALCRL, MTSS1, and KDM6A. *Exp Hematol*. 2021;99:1–11.
410. Holm F, Hellqvist E, Mason CN, Ali SA, Delos-Santos N, Barrett CL, et al. Reversion to an embryonic alternative splicing program enhances leukemia stem cell self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(50):15444–9.
411. Vagapova ER, Lebedev TD, Tikhonova AD, Goikhman B V., Ivanenko KA, Spirin P V., et al. High Expression Level of SP1, CSF1R, and PAK1 Correlates with Sensitivity of Leukemia Cells to the Antibiotic Mithramycin. *Mol Biol*. 2020;54(3):458–63.
412. Liu B, Ma H, Liu Q, Xiao Y, Pan S, Zhou H, et al. MiR-29b/Sp1/FUT4 axis modulates the malignancy of leukemia stem cells by regulating fucosylation via Wnt/ β -catenin pathway in acute myeloid leukemia. *J Exp Clin Cancer Res. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*; 2019;38(1):1–14.
413. Vasseur L, Fenwarth L, Lambert J, de Botton S, Figeac M, Villenet C, et al. LSC17 score complements genetics and measurable residual disease in acute myeloid leukemia: an ALFA study. *Blood Adv*. 2023; 1-27
414. Lagacé K, Barabé F, Hebert J, Cellot S, Wilhelm BT. Identification of novel biomarkers for MLL translocated acute myeloid leukemia. *Exp Hematol*. 2017 Sep;
415. Nisar S, Hashem S, Macha MA, Yadav SK, Muralitharan S, Therachiyil L, Sageena G, Al-Naemi H, Haris M BA. Exploring Dysregulated Signaling Pathways in Cancer. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2020;26(4):429–45. Available from: doi: 10.2174/1381612826666200115095937. PMID: 31939726.
416. Steinbach D, Schramm A, Eggert A, Onda M, Dawczynski K, Rump A, et al. Identification of a set of seven genes for the monitoring of minimal residual disease in pediatric acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2006;12(8):2434–41.
417. Çelik H, Lindblad KE, Popescu B, Gui G, Goswami M, Valdez J, et al. Highly multiplexed proteomic assessment of human bone marrow in acute myeloid leukemia. *Blood Adv*. 2020;4(2):367–79.
418. Wang J, Zhuo Z, Wang Y, Yang S, Chen J, Wang Y, et al. Identification and Validation of a Prognostic Risk-Scoring Model Based on Ferroptosis-Associated Cluster in Acute Myeloid Leukemia. *Front Cell Dev Biol*. 2022;9(1):1–15.
419. Tu CF, Yan YT, Wu SY, Djoko B, Tsai MT, Cheng CJ, et al. Domain and functional analysis of a novel platelet-endothelial cell surface protein, SCUBE. *J Biol Chem* [Internet]. © 2008 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology.; 2008;283(18):12478–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M705872200>

420. Karagüzel E, Mentese A, O.Kazaz I, Demir S, Örem A, Okatan AE, et al. SCUBE1: A promising biomarker in renal cell cancer. *Int Braz J Urol.* 2017;43(4):638–43.
421. Topcu TO, Kavgaci H, Ozdemir F, Aksoy A, Erdem D, Mentese A, et al. Elevated serum levels of SCUBE1, a marker for coagulation, in patients with breast cancer. *Tohoku J Exp Med.* 2015;237(2):127–32.
422. Mentese A, Fidan E, Sumer AU, Karahan SC, Sonmez M, Altay DU, et al. Is SCUBE 1 a new biomarker for gastric cancer? *Cancer Biomarkers.* 2012;11(5):191–5.
423. Sahoo BK, Lin YC, Tu CF, Lin CC, Liao WJ, Li FA, et al. Signal peptide-CUB-EGF-like repeat-containing protein 1-promoted FLT3 signaling is critical for the initiation and maintenance of MLL-rearranged acute leukemia. *Haematologica.* 2023;108(5):1284–99.
424. Hess CTC and JL. Deregulation of the HOXA9/MEIS1 Axis in Acute Leukemia. *Curr Opin Hematol.* 2016;23(4):354–61.
425. Falls DL. Neuregulins: Functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res.* 2003;284(1):14–30.
426. Ebi M, Kataoka H, Shimura T, Hirata Y, Mizushima T, Mizoshita T, et al. The role of neuregulin4 and HER4 in gastrointestinal malignant lymphoma. *Mol Med Rep.* 2011;4(6):1151–5.
427. Rou WS, Eun HS, Choung S, Jeon HJ, Joo JS, Kang SH, et al. Prognostic Value of Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2 and Neuregulin 4 in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel).* 2023;15(9):1–13.
428. Hollink IHIM, Van Den Heuvel-Eibrink MM, Arentsen-Peters STCJM, Pratcorona M, Abbas S, Kuipers JE, et al. NUP98/NSD1 characterizes a novel poor prognostic group in acute myeloid leukemia with a distinct HOX gene expression pattern. *Blood.* 2011;118(13):3645–56.
429. Rathe SK, Largaespada DA. Deoxycytidine kinase is downregulated in Ara-C-resistant acute myeloid leukemia murine cell lines. *Leukemia.* 2010;24(8):1513–5.
430. Jiang W, Xie N, Xu C. Characterization of a prognostic model for lung squamous cell carcinoma based on eight stemness index-related genes. *BMC Pulm Med [Internet]. BioMed Central;* 2022;22(1):1–15. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12890-022-02011-0>
431. Rasmussen SL, Krarup HB, Sunesen KG, Pedersen IS, Madsen PH, Ussing OT. Hypermethylated DNA as a biomarker for colorectal cancer: A systematic review. *Color Dis.* 2016;18(6):549–61.
432. Hubers AJ, Heideman DAM, Burgers SA, Herder GJM, Sterk PJ, Rhodius RJ, et al. DNA hypermethylation analysis in sputum for the diagnosis of lung cancer: Training validation set approach. *Br J Cancer. Nature Publishing Group;* 2015;112(6):1105–13.
433. Hentschel AE, Beijert IJ, Bosschieter J, Kauer PC, Vis AN, Lissenberg-Witte BI, et al. Bladder cancer detection in urine using DNA methylation markers: a technical and prospective preclinical validation. *Clin Epigenetics [Internet]. BioMed Central;* 2022;14(1):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13148-022-01240-8>
434. Nordlund J, Bäcklin CL, Wahlberg P, Busche S, Berglund EC, Eloranta ML, et al. Genome-wide signatures of differential DNA methylation in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genome Biol.* 2013;14(9).

435. Wells J, Jain N, Konopleva M. Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia: Progress in a new cancer subtype. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2017;15(7):554–61.
436. Zhang C, Bai G, Zhu W, Bai D, Bi G. Identification of miRNA-mRNA network associated with acute myeloid leukemia survival. *Med Sci Monit.* 2017;23:4705–14.

ANNEXES

ANNEXES

PUBLICACIÓ

Esperanza-Cebollada E, Gómez-González S, Perez-Jaume S, Vega-García N, Vicente-Garcés C, Richarte-Franqués M, Rives S, Català A, Torrebadell M, Camós M. *A miRNA signature related to stemness identifies high-risk patients in paediatric acute myeloid leukaemia*. Br J Haematol. 2023 Mar 23. doi: 10.1111/bjh.18746. Epub ahead of print. PMID: 36951259.

ORIGINAL PAPER

A miRNA signature related to stemness identifies high-risk patients in paediatric acute myeloid leukaemia

Elena Esperanza-Cebollada¹  | Soledad Gómez-González²  | Sara Perez-Jaume²  |
 Nerea Vega-García^{1,3}  | Clara Vicente-Garcés¹  | Mercè Richarte-Franqués¹  |
 Susana Rives^{1,4,5}  | Albert Català^{1,4,5}  | Montserrat Torredadell^{1,3,5}  | Mireia Camós^{1,3,5} 

¹Developmental Tumors Biology Group, Leukemia, and other Pediatric Hemopathies, Pediatric Cancer Center Barcelona (PCCB), Institut de Recerca Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

²Developmental Tumors Biology Group, Pediatric Cancer Center Barcelona (PCCB), Institut de Recerca Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

³Hematology Laboratory, Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, Barcelona, Spain

⁴Pediatric Hematology and Oncology Department, Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, University of Barcelona, Barcelona, Spain

⁵Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Correspondence

Mireia Camós and Montserrat Torredadell, Hematology Laboratory, Hospital Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu 2, 08950, Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain. Email: mireia.camos@sjd.es and montserrat.torredadell@sjd.es

Funding information

Fundació la Marató de TV3, Grant/Award Number: Grant 201921-30; Fundació CRIS contral el càncer, Grant/Award Number: No oficial number; Instituto de Salud Carlos III, Grant/Award Number: PI16/00246

Summary

Clinical and biological variables like genetic aberrations at diagnosis and the levels of measurable residual disease (MRD) are the most powerful biomarkers to predict the outcome of paediatric leukaemia. Recently, a model integrating the genetic abnormalities, transcriptional identity, and leukaemia stemness measured as leukaemic stem cell score (pLSC6) has been proposed to identify high-risk paediatric acute myeloid leukaemia (AML) patients. However, the role of epigenetics in defining prognosis still needs to be established. We evaluated the role of 89 miRNAs regulating stemness and their contribution to predicting outcomes in 110 paediatric patients with acute leukaemia. We identified a 24-miRNA signature capable of distinguishing paediatric AML patients with excellent or poor outcomes. We validated these results in an independent cohort using public repository-based data. The 24-miRNA signature was significantly associated with the leukaemic stemness scores and the underlying genetics of patients. Notably, the combination of classical prognostic factors (MRD and genetics), the pLSC6 score and the 24-miRNA signature had a higher capacity to predict the overall and event-free survival than each variable individually. Our 24-miRNA signature provides epigenetic data to integrate into genetics, MRD and stemness-related leukaemic scores to refine risk stratification in paediatric AML patients.

KEYWORDS

miRNA, paediatric acute myeloid leukaemia, prognosis, stemness

INTRODUCTION

Despite the high survival rates, leukaemia remains the leading cause of death related to cancer in children.¹ Besides, treatment short- and long-term side effects hugely impact the survivors' and families' quality of life,² stressing the need to improve the current risk stratification of patients. Genetic aberrations at diagnosis and measurable residual

disease (MRD) levels are used as prognostic biomarkers.³ The stemness pathway, regulated by the NOTCH, WNT/ β -catenin, HOX, and FLT3 pathways, among others, is often altered in leukaemia,^{4,5} and high expression of stemness-related genes has been associated with poor outcomes in children and adult patients. Ng et al. developed a 17-gene leukaemic stem cell score (LSC17) to predict prognosis in adults with acute myeloid leukaemia (AML),⁶ and Elsayed

Soledad Gómez-González and Sara Perez-Jaume contributed equally to this work and share the second authorship.

Montserrat Torredadell and Mireia Camós contributed equally and share senior authorship.

© 2023 British Society for Haematology and John Wiley & Sons Ltd.

et al. created a prognostic six-gene paediatric leukaemic stem cell score (pLSC6) for paediatric AML.⁷ Fornerod et al. proposed a classification model for paediatric AML patients integrating genetics, transcriptional identity, and

leukaemia stemness, measured by the pLSC6 score.⁸ This integrative model was better at identifying high-risk patients than using the classical factors individually. However, the role of epigenetics was not explored. MicroRNA (miRNA)

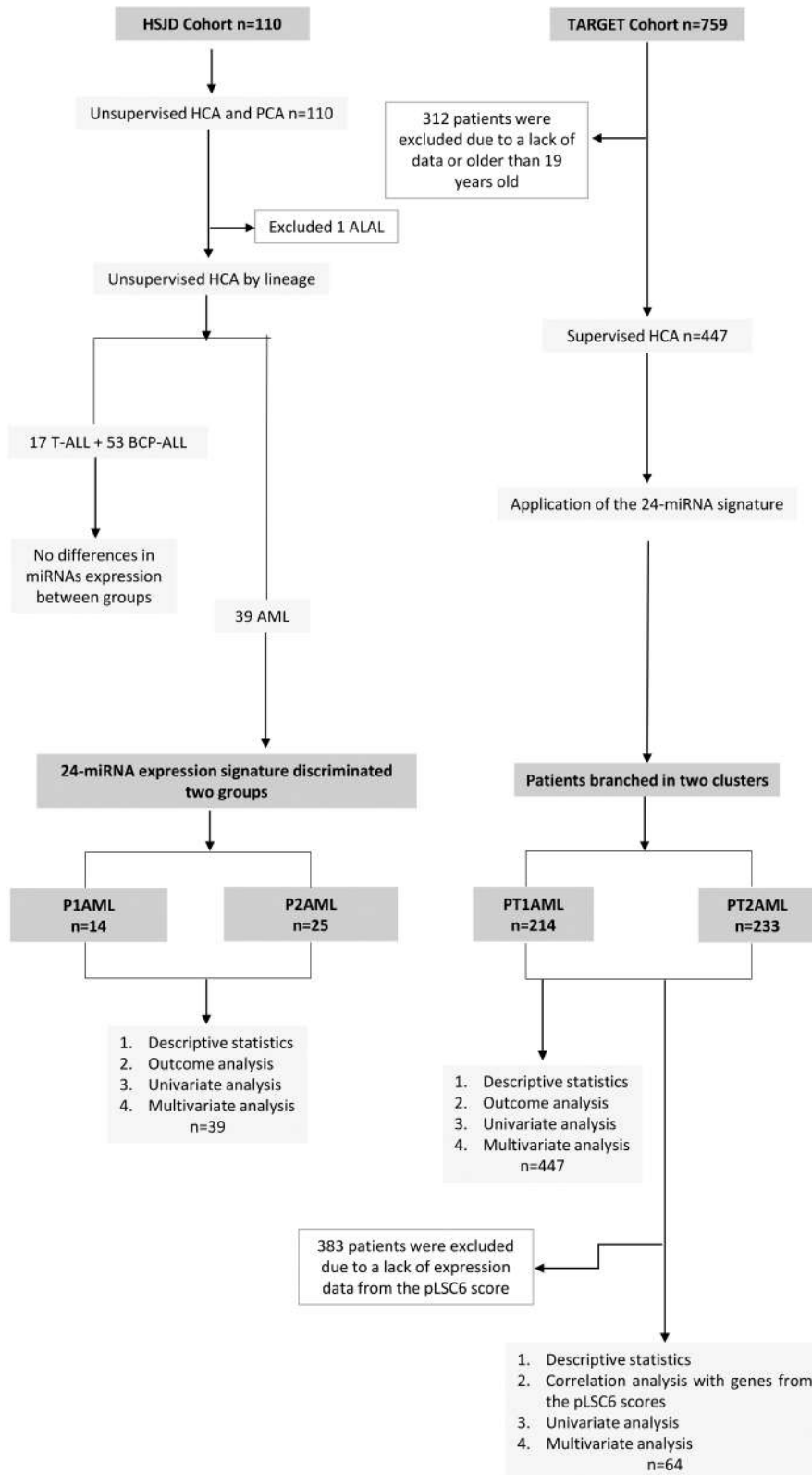


FIGURE 1 Study design flow chart.

TABLE 1 Main clinical and biological characteristics of the 110 paediatric patients with acute leukaemia included in the study.

Patients	Total no. (%) 110
Gender (n = 110)	
Female	42 (38.2%)
Male	68 (61.8%)
Age, years (n = 110)	
Median [range]	6.1 [0.0–17.4]
<1 year old	17 (15.5%)
1–9 years old	59 (53.6%)
>10 years old	34 (30.9%)
WBC count, ×10 ⁹ /L, median [range] (n = 110)	59.2 [0.6–741.0]
CNS disease (n = 108)	
CNS-1	76 (70.3%)
CNS-2	14 (13%)
CNS-3	18 (16.7%)
Lineage (n = 110)	
BCP-ALL	53 (48.2%)
T-ALL	17 (15.5%)
AML	39 (35.5%)
ALAL	1 (0.9%)
Phenotype (n = 70)	
BCP-ALL (n = 53)	
Common CD10+	43 (61.4%)
Pro-B CD10-	10 (14.4%)
T-ALL (n = 17)	
Pro-T	1 (1.4%)
Pre-T	5 (7.1%)
Early T-cell Precursor	5 (7.1%)
Cortical	3 (4.3%)
Mature	3 (4.3%)
Molecular category (n = 110)	
BCP-ALL (n = 53)	
High hyperdiploidy	5 (9.4%)
Hypodiploidy	1 (1.9%)
t(12;21)(p13;q22) <i>ETV6::RUNX1</i>	5 (9.4%)
t(1;19)(q23;p13) <i>TCF3::PBX1</i>	5 (9.4%)
t(9;22)(q34;p11) <i>BCR::ABL1</i>	5 (9.4%)
<i>KMT2A</i> rearranged	13 (24.5%)
iAMP21	6 (11.3%)
B-other	13 (24.5%)
T-ALL (n = 17)	
T-ALL not otherwise defined	15 (88.2%)
<i>KMT2A</i> rearranged	2 (11.8%)
AML (n = 39)	
t(8;21)(q22;q22.1) <i>RUNX1::RUNX1T1</i>	4 (10.3%)
inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22) <i>CBFB::MYH11</i>	4 (10.3%)
t(15;17)(q22;q12) Acute promyelocytic leukaemia <i>PML::RARA</i>	4 (10.3%)

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Patients	Total no. (%) 110
<i>KMT2A</i> rearranged	16 (41.0%)
AML not otherwise defined	11 (28.1%)
ALAL (n = 1)	
<i>KMT2A</i> rearranged	1 (100.0%)
<i>KMT2A</i> partner (n = 32)	
BCP-ALL (n = 13)	
<i>AFF1</i>	2 (15.4%)
<i>MLLT3</i>	2 (15.4%)
<i>MLLT1</i>	1 (7.7%)
<i>MKLI</i>	1 (7.7%)
<i>TNRC18</i>	1 (7.7%)
Unknown partner ^a	6 (46.2%)
T-ALL (n = 2)	
<i>MLLT1</i>	1 (50.0%)
Unknown partner ^a	1 (50.0%)
AML (n = 16)	
<i>MLLT3</i>	7 (43.8%)
<i>ABII</i>	1 (6.3%)
<i>MLLT10</i>	1 (6.3%)
<i>ELL1</i>	2 (12.5%)
Unknown partner ^a	5 (31.3%)
ALAL (n = 1)	
Unknown partner ^a	1 (100.0%)
Protocol (n = 110)	
AML (n = 39)	
PETHEMA LPA 2005/2012	4 (10.3%)
SHOP AML 2001/2007	24 (61.5%)
NOPHO DBH AML 2012	9 (23.1%)
LANL 2002	2 (5.1%)
ALL (n = 70)	
SEHOP-PETHEMA 2013	40 (57.1%)
SHOP 1999/2005	22 (31.4%)
INTERFANT-06/99	5 (7.1%)
PETHEMA	1 (1.4%)
SHOP 2001	2 (2.9%)
ALAL (n = 1)	
INTERFANT-06	1 (100.0%)
EFS (n = 109)	
5-year estimate (95% CI)	73.9% (65.4%–83.5%)
10-year estimate (95% CI)	69.6% (60.0%–80.7%)
OS (n = 109)	
5-year estimate (95% CI)	84.6% (78.0%–91.9%)
10-year estimate (95% CI)	76.8% (66.9%–88.3%)

Abbreviations: ALAL, acute leukaemia of ambiguous lineage; AML, acute myeloid leukaemia; BCP-ALL, B-cell progenitor acute lymphoblastic leukaemia; CI, confidence interval; CNS, central nervous system; T-ALL, T-cell acute lymphoblastic leukaemia; WBC, white blood cell.

^aOther *KMT2A*-rearranged cases with an unknown partner (FISH-positive cases).

are small non-coding RNAs that regulate gene expression in different processes, including stemness, and may act as oncomiRNAs or tumour-suppressor miRNAs in leukemogenesis.^{9–12} Moreover, particular miRNAs have been correlated to prognosis.¹³ Our study aimed to analyse the role of miRNAs regulating stemness in predicting prognosis in childhood leukaemia.

MATERIALS AND METHODS

Figure 1 depicts the study design. We analysed 110 non-consecutive paediatric patients (0–19 years) diagnosed with acute leukaemia between 2000 and 2020 in Hospital Sant Joan de Déu (HSJD), with available samples and representing the main genetic subtypes (Table 1 and Supplementary Information). Our series was primed in *KMT2A* rearranged (*KMT2A*+) cases from all lineages, as these patients harbour few mutations, and epigenetics plays an important role. Other Spanish hospitals contributed with *KMT2A*-rearranged cases. We validated the results in an independent cohort from the Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments (TARGET) (<https://ocg.cancer.gov/programs/target>) initiative, phs000218. The data used for the analyses are available at <https://portal.gdc.cancer.gov/projects>.

We designed a reverse-transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR) assay to study 89 selected miRNAs with a

described role in stemness pathways and/or clinical relevance in paediatric leukaemia (Tables S1 and S2, Figure S1). Raw RT-qPCR data curation, normalisation, reference control selection, unsupervised and supervised analyses were made to calculate the miRNA expression (Figure S2). We studied the function of several miRNAs by target prediction and pathways analysis. Statistical analyses were performed using the R software, version 4.2.1,¹⁴ considering *p*-values under 0.05 statistically significant.

RESULTS

Patients were separated by lineage in the unsupervised analysis

Using the expression profiling of the 89 miRNA genes in 110 samples, we performed an unsupervised two-way (miRNAs expression against samples) hierarchical cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA). Samples were clustered into two groups (Figure 2A). The first cluster corresponded to most BCP-ALL patients except for two AML cases. The second cluster was split into two major branches: the first included most patients with T-ALL; and the second branched off into three arms, one mainly including BCP-ALL patients, the second AML cases and the third arm the three lineages. Globally, most patients with the same molecular category tended to cluster together. Similarly, in

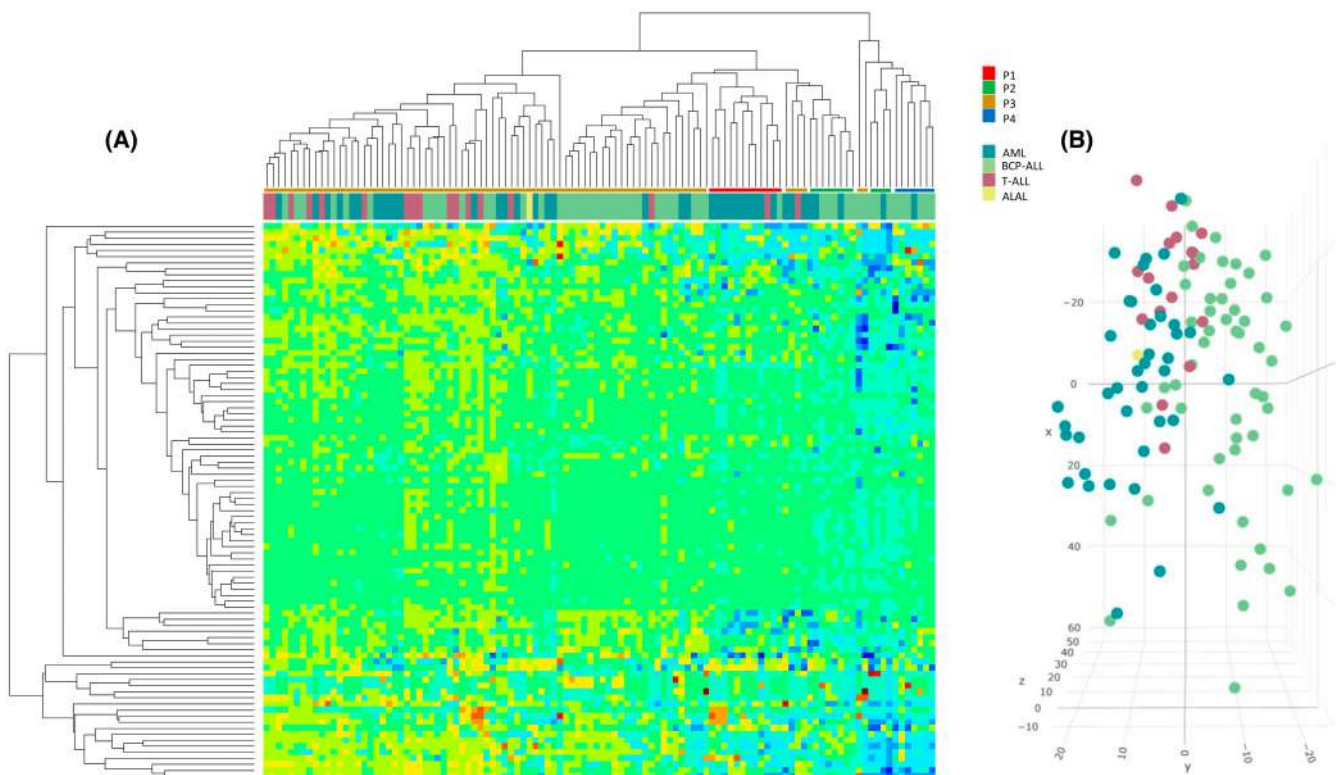


FIGURE 2 Hierarchical cluster analysis (HCA) (A) and principal component analysis (PCA) (B) based on the miRNA expression of 110 patient samples.

the PCA, patients were separated by lineage, especially AML patients and BCP-ALL patients (Figure 2B).

most AML cases and P4 most ALL patients). Similarly, patients separated in the PCA according to survival, forming the same clusters (Figure 3B).

Clusters associated with patients' outcome

We tried to correlate the HCA clusters with clinical-biological variables besides lineage and molecular category. We found no association with age, sex, central nervous system infiltration or white blood cell count. However, some clusters had significantly different event-free survival (EFS) ($p = 0.033$) (Figures 2A and 3A). Thus, we could distinguish two groups with poor survival (P1 and P4 clusters), one group with good survival (P2) and a fourth (P3) with intermediate survival. Notably, clusters with good and poor survival branched off again according to lineage (P1 included

miRNAs expression does not differentiate outcomes in ALL patients

The outcome of 69 assessable BCP-ALL and T-ALL patients is shown in Figure S3. With a median follow-up of 6.1 years (range 0.5–18.8), we observed a group with worse outcome (P1ALL, OS 87% (98.7%–75.3%) and EFS 50% (67.7%–32.3%) at 5 years), compared with the remaining patients (P2ALL, OS and EFS of 85% (98.2%–71.8%) at 5 years; and P3ALL, OS 86% (90.7%–81.3%) and EFS 81% (86.9%–75.1%) at 5 years). However, the differences in EFS were non-significant. These

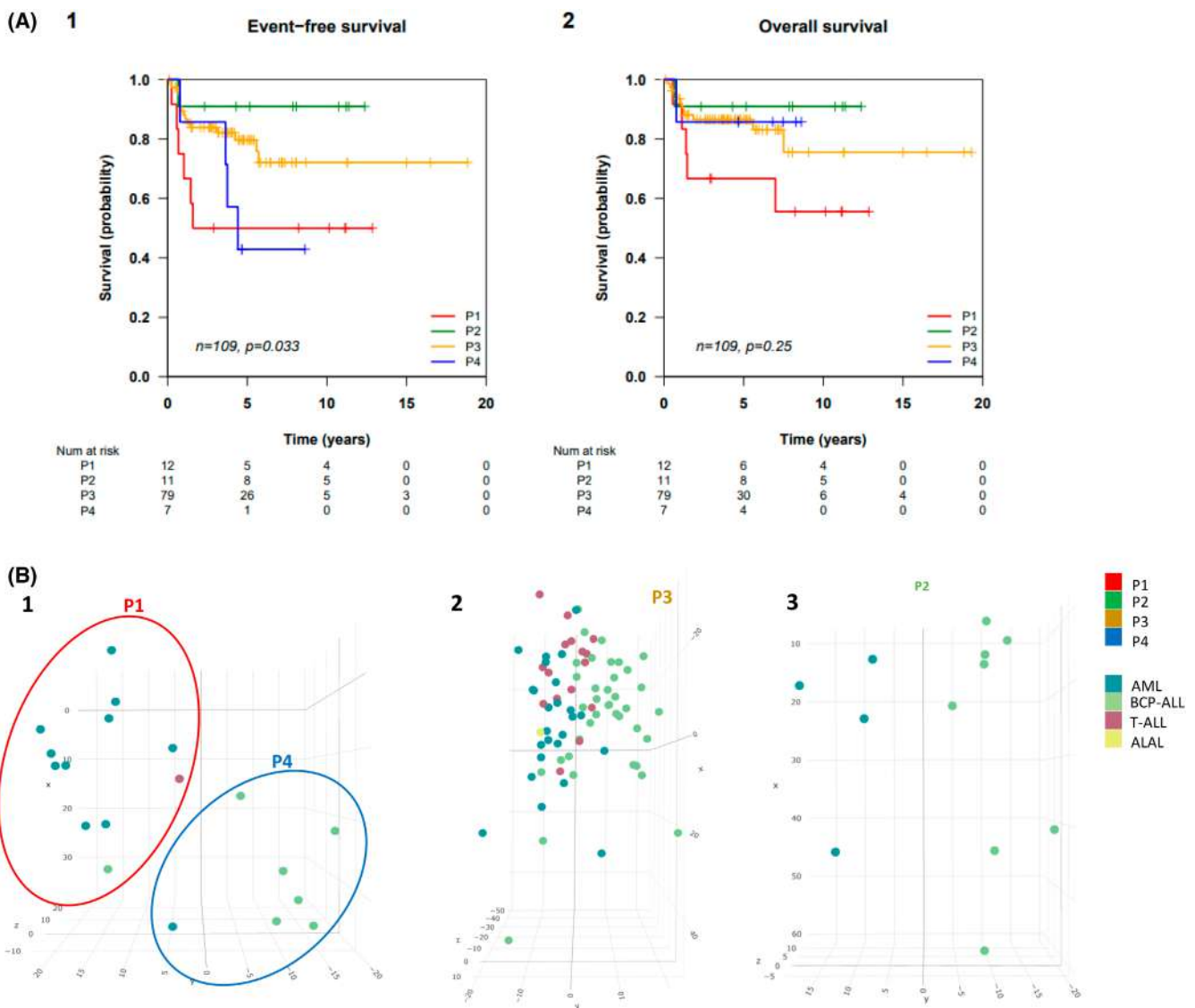


FIGURE 3 (A) Event-free survival (left) and overall survival (right) of patients grouped according to the four clusters identified in the unsupervised analysis (P1, P2, P3, and P4). (B) Visualisation of the four groups (P1–P4) identified in the principal component analysis. B1 shows patients with a bad prognosis (P1 and P4), B2 shows patients with an intermediate prognosis (P3), and B3 shows patients with a good prognosis.

groups matched ALL patients in groups P4, P2 and P3 from the unsupervised global analysis.

A miRNA expression signature identified AML patients with poor and excellent outcomes

The HCA distinguished two groups with different outcomes in the 39 AML patients (features in Table S3). After

a median follow-up of 5.7 years (range 0.1–19.3), we identified a group of 14 patients (P1AML) with a significantly worse outcome: OS at 5 years of 64.3% (77.1%–51.5%) versus the remaining AML patients (grouped in P2AML), all showing excellent survival with an OS of 90.9% (97.3%–84.5%) at 5 years ($p = 0.024$). Noticeably, differences in EFS at 5 years were even higher: 42.9% (56.1%–29.7%) (P1AML) versus 87.3% (94.5%–80.1%) (P2AML), $p = 0.0027$ (Figure 4A,B).

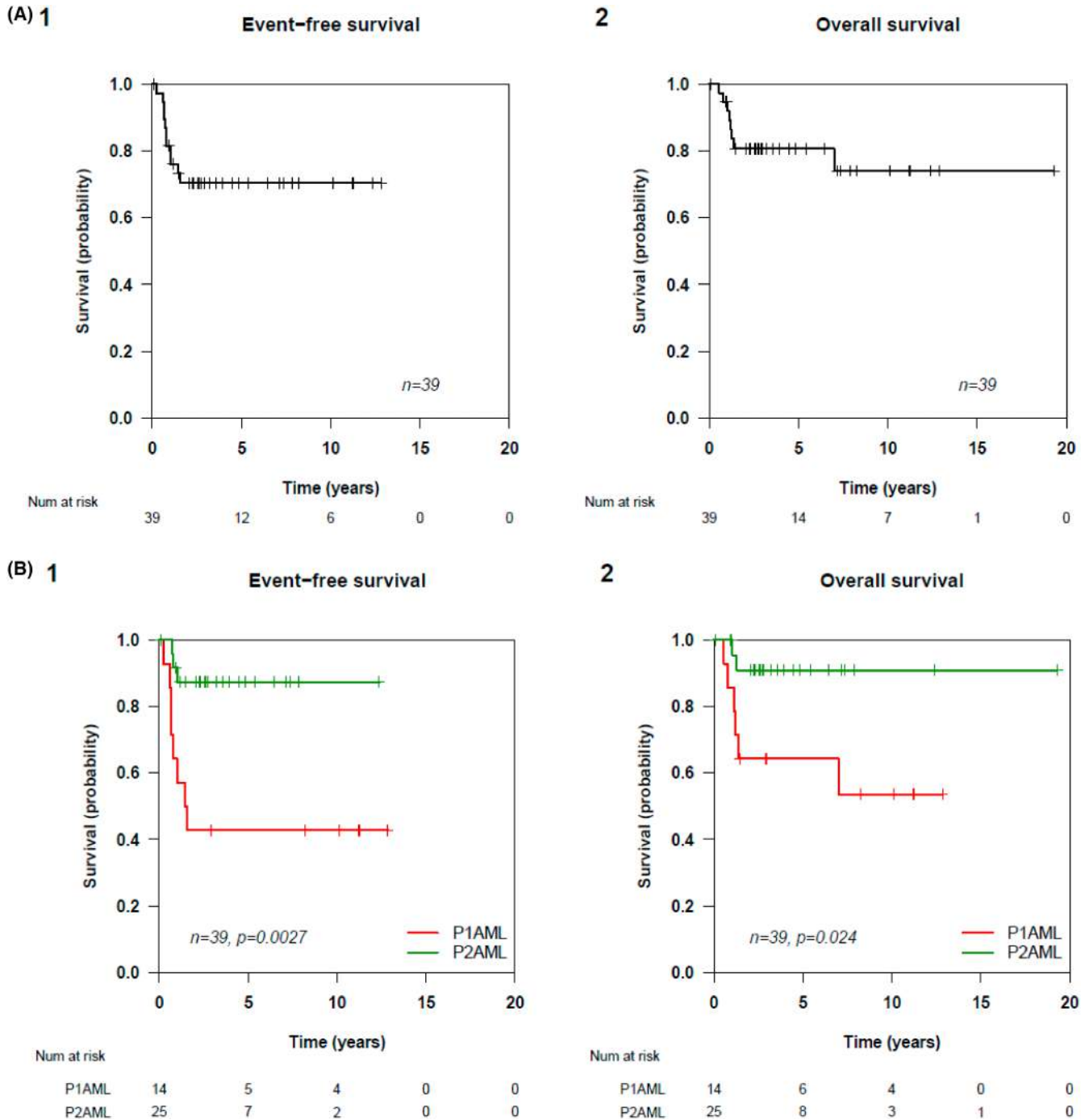


FIGURE 4 (A) EFS (left) and OS (right) of the whole cohort of AML patients ($n = 39$). (B) EFS (left) and OS (right) according to the groups P1AML and P2AML identified in the unsupervised analysis.

P1AML and P2AML included cases from almost all molecular categories

P1AML and P2AML included cases from main molecular categories (*RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11*, *KMT2A+* and patients without recurrent genetic alterations). Interestingly, no *PML::RARA* cases fell in P1AML, while all *NPM1*-mutated cases were found in this group (Table S3). We found no clinical or biological differences between groups to explain the different survival other than the miRNAs expression profile. Twenty-four miRNAs were differentially expressed between P1AML and P2AML with a significant level (Figure 5 and Table 2). Compared with P2AML patients, P1AML patients were characterised by the underexpression of 23 miRNAs and the overexpression of hsa-miR-9-5p.

Functional pathways involved in the 24 miRNA signature

To understand the functions and role of the 24 miRNAs in leukaemogenesis, we performed a heatmap with the DIANA-miRPath v3.0 pathway analysis web server (Figure 6 and Table S4). Overall, the 24 miRNAs were involved in cancerogenesis and cancer progression, and several miRNAs associated with different types of cancer, including

leukaemia. We observed an association with the MAPK, PI3K-Akt, TGF-beta, FoxO signalling pathways, cell cycle and signalling pathways regulating the pluripotency of stem cells. Regarding the potential targets, seven and eight miRNAs from our signature potentially regulated *SOCS2* or *SPI1*, respectively. Also, most miRNAs interacted with gene expression modifiers like *MBNL3*, which regulates alternative splicing, or *CPEB3*, a transcription regulator. Different miRNAs were involved in cell communication and interaction by regulating adherent junctions and focal adhesion.

Potential targets of the 24-miRNA signature included in the LSC scores

We evaluated the relationship between the 24-miRNA signature and the stemness prognostic scores LSC17 and pLSC6, using the TargetScan web server. The in silico analysis (Figure 7) revealed that 8 miRNAs from the 24-miRNA signature targeted 3 genes in the pLSC6 score, and 11 miRNAs targeted 9 genes in the LSC17 score. In the pLSC6 score, *SOCS2* was the most frequently targeted gene, followed by *CD34* and *ADGRG1*, targeted by seven, three and one miRNA, respectively. Regarding the LSC17 score, in addition to those mentioned, *CDK6*, *BEX3*, *EMP1*, *LAPTM4B*, and *DPYSL3* were targeted by five, four, three and two miRNA, respectively; *NYNRIN* was targeted by

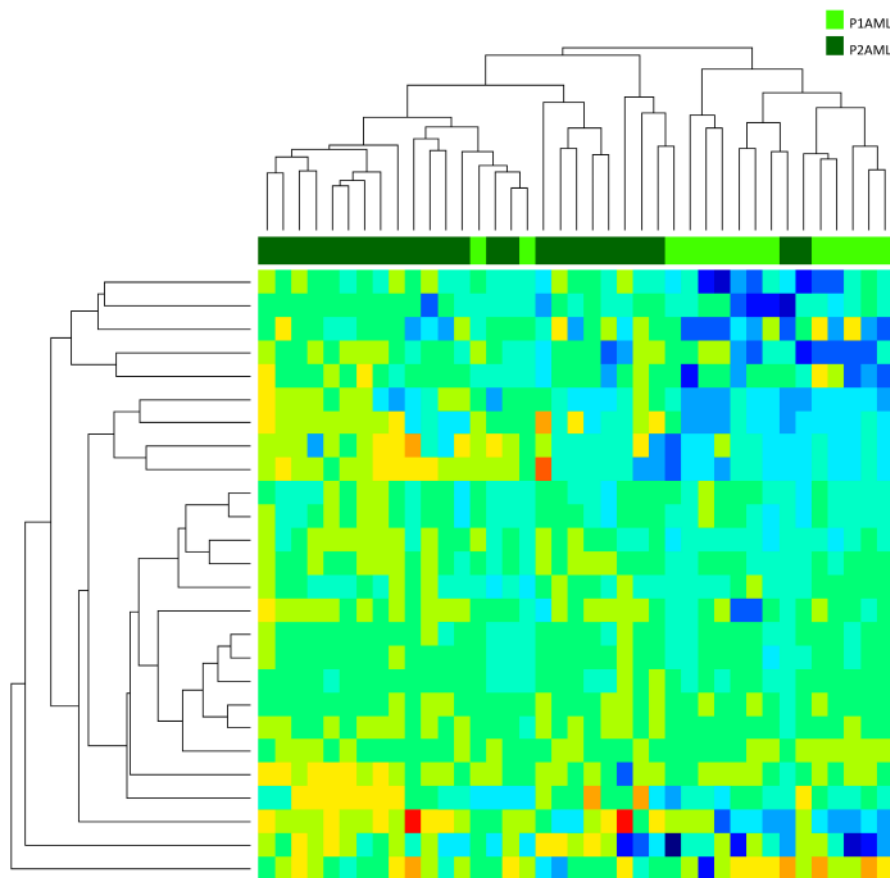


FIGURE 5 Heatmap showing the 24 miRNAs expression profiles able to discriminate AML patients with worse outcomes (P1AML) vs the remaining patients, grouped in P2AML, with a favourable outcome.

one miRNA only. Notably, hsa-miR-1290 was the miRNA that potentially regulated the higher number of genes in the score, followed by hsa-miR-34b-5p and hsa-miR-222-5p. Some genes in both scores were not targeted by any of our miRNAs. Thus, several miRNAs from our signature potentially targeted genes in both stemness scores.

The 24-miRNA signature predicted patients' outcomes in the univariate analysis

We found no significant factors predicting outcome other than the 24-miRNAs signature, which was an adverse prognostic factor for EFS and OS (log-rank test: $p = 0.0027$ and $p = 0.024$, respectively; Cox model: hazard ratio [HR] 5.97, 95% confidence interval [CI] 1.58–22.54, $p = 0.0084$ and [HR] 5.26, 95% [CI] 1.06–26.22, $p = 0.043$, respectively) (Table S5).

Validation of the 24-miRNA signature in an independent cohort

We validated our results in an independent series of 447 AML patients from the TARGET database (Table S6).

The 24-miRNA signature separated two groups with different outcomes

In the HCA, the expression of the 24-miRNAs differentiated two clusters in the TARGET cohort (Figure S4). Survival analysis showed that 214 patients (PT1AML) had a significantly worse OS at 5 years 58.5% (52.1%–65.7%) versus a group of 233 patients (PT2AML) showing better OS at 5 years 71.3% (65.6%–77.4%) ($p < 0.0071$). We also observed significant differences in EFS: PT1AML patients had an EFS at 5 years of 41.6% (35.4%–48.9%) versus PT2AML with an EFS at 5 years of 59.9% (53.4%–66.6%) ($p < 0.0001$) (Figure 8, Table 3). Hence, we confirmed the prognostic impact of our 24-miRNA signature in the validation cohort.

Genetics was unevenly distributed between both PT1AML and PT2AML groups

In the validation series, the genetic subtypes were unevenly distributed in the PT1AML and PT2AML groups (Table 3): P2TAML was significantly enriched in good-risk genetics, while P1TAML had a higher proportion of adverse abnormalities.

TABLE 2 Twenty-four miRNAs differentially expressed between P1AML and P2AML clusters.

miRNAs	FDR	P1AML	P2AML	P1AML-P2AML
hsa-mir-20b-5p	0.00015197	6.693350649	1.507636364	5.185714286
hsa-mir-223-3p	0.00015197	-1.211285714	-1.3318	0.120514286
hsa-mir-193a-3p	0.000269182	5.462038961	1.535181818	3.926857143
hsa-mir-24-3p	0.001189043	-0.488415584	-0.939872727	0.451457143
hsa-mir-128-3p	0.001608793	4.769103896	2.344818182	2.424285714
hsa-mir-17-5p	0.001608793	2.686285714	-0.1718	2.858085714
hsa-mir-199b-5p	0.005176352	-1.640935065	-1.909563636	0.268628571
hsa-mir-181c-5p	0.006100758	5.088324675	1.336781818	3.751542857
hsa-mir-181a-5p	0.007067649	1.668766234	1.149309091	0.519457143
hsa-mir-181b-5p	0.007067649	1.407714286	1.3186	0.089114286
hsa-mir-21-5p	0.007067649	-0.305467532	-1.126781818	0.821314286
hsa-mir-222-5p	0.007067649	3.906896104	-2.820418182	6.727314286
hsa-mir-331-5p	0.010275888	4.314454545	-0.218145455	4.5326
hsa-mir-373-3p	0.010275888	4.298532468	-1.063781818	5.362314286
hsa-mir-708-5p	0.010275888	4.69387013	1.601527273	3.092342857
hsa-mir-34b-5p	0.018008167	2.970701299	-1.592127273	4.562828571
hsa-mir-195-5p	0.022483156	3.764350649	0.126436364	3.637914286
hsa-mir-151a-5p	0.032429259	1.566597403	0.968854545	0.597742857
hsa-mir-30b-5p	0.035537702	0.705038961	0.503181818	0.201857143
hsa-mir-22-3p	0.042360357	1.803571429	-1.5042	3.307771429
hsa-let-7g-5p	0.04498747	1.139597403	0.142454545	0.997142857
hsa-let-7i-5p	0.04498747	1.267519481	-0.124909091	1.392428571
hsa-mir-1290	0.04498747	3.523251948	-0.381890909	3.905142857
hsa-mir-9-5p	0.045759834	-2.955142857	-1.6118	-1.343342857

Correlation between 24-miRNAs signature and pLSC6 score data in a subset of 64 patients

We calculated the pLSC6 score in the subset of 64 TARGET patients with available gene expression data and found that 37% of patients had a high pLSC6 score (≥ 4.08). The analysis of the relationship between both variables showed that patients defined as PITAML by the 24-miRNA signature presented a significantly higher proportion of high pLSC6 scores (Tables S7 and S8). We analysed the correlation between the 24 miRNAs' expression and the expression of genes in the pLSC6 score. Most of the miRNAs in our signature were significantly correlated (positively or negatively) with genes in the score (Figure S5). We also found a correlation between the 24 miRNAs and LSC17 genes within the same subset of patients.

The multivariate analysis confirmed genetics and MRD as prognostic factors

MRD-positive levels ($\geq 0.1\%$ as assessed by flow cytometry) at the end of induction predicted a worse EFS and OS

($p < 0.0001$ for both). Among genetics, patients harbouring core-binding factor (CBF) leukaemias (*RUNX1::RUNX1T1* and *CBFB::MYH11*), *NPM1+/FLT3 ITD-* and *NPM1+/FLT3 ITD+* mutations had better EFS ($p < 0.0001$, $p = 0.027$ and $p = 0.032$, respectively). In contrast, *NPM1-/FLT3 ITD+* mutations predicted a worse EFS ($p = 0.0059$). *KMT2A* translocations other than $t(9;11)$ negatively impacted OS ($p = 0.028$). A significantly better OS was observed in the newest protocols ($p = 0.032$). Again, the 24-miRNA signature predicted a different EFS and OS ($p < 0.0001$ and 0.0075 , respectively). Finally, a higher pLSC6 score was an adverse prognostic factor for EFS and OS ($p < 0.0001$ and 0.0022 , respectively) (Table S9).

In the Cox model for multivariate analysis, MRD ($p < 0.0001$), CBF leukaemias ($p = 0.00012$), *NPM1+/FLT3 ITD-* ($p = 0.046$) and *NPM1+/FLT3 ITD+* ($p = 0.039$) remained significant to predict EFS, while only MRD ($p = 0.00036$) and CBF leukaemias ($p = 0.00062$) were prognostic factors for OS (Table S10). In the sub-cohort of 64 patients, only the pLSC6 score predicted the outcome ($p = 0.0012$ and $p = 0.0085$ for EFS and OS, respectively) (Table S11).

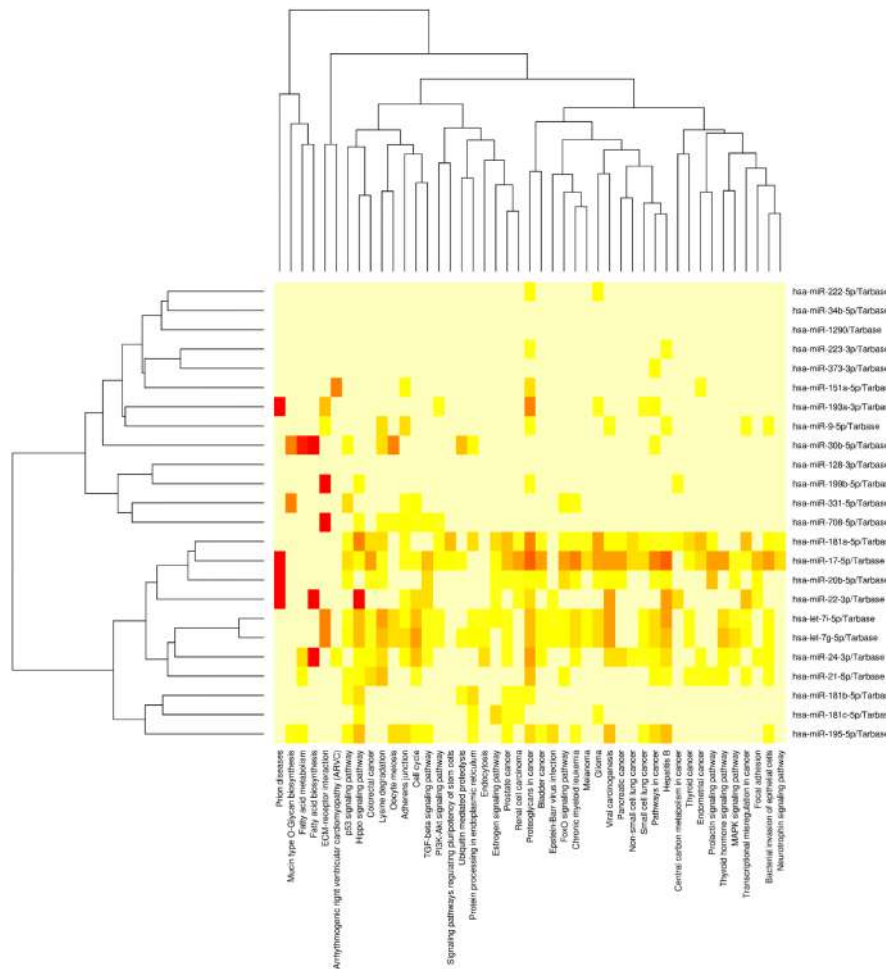


FIGURE 6 Heatmap showing the significantly targeted pathways by the 24 selected miRNAs that segregated PITAML and P2AML.

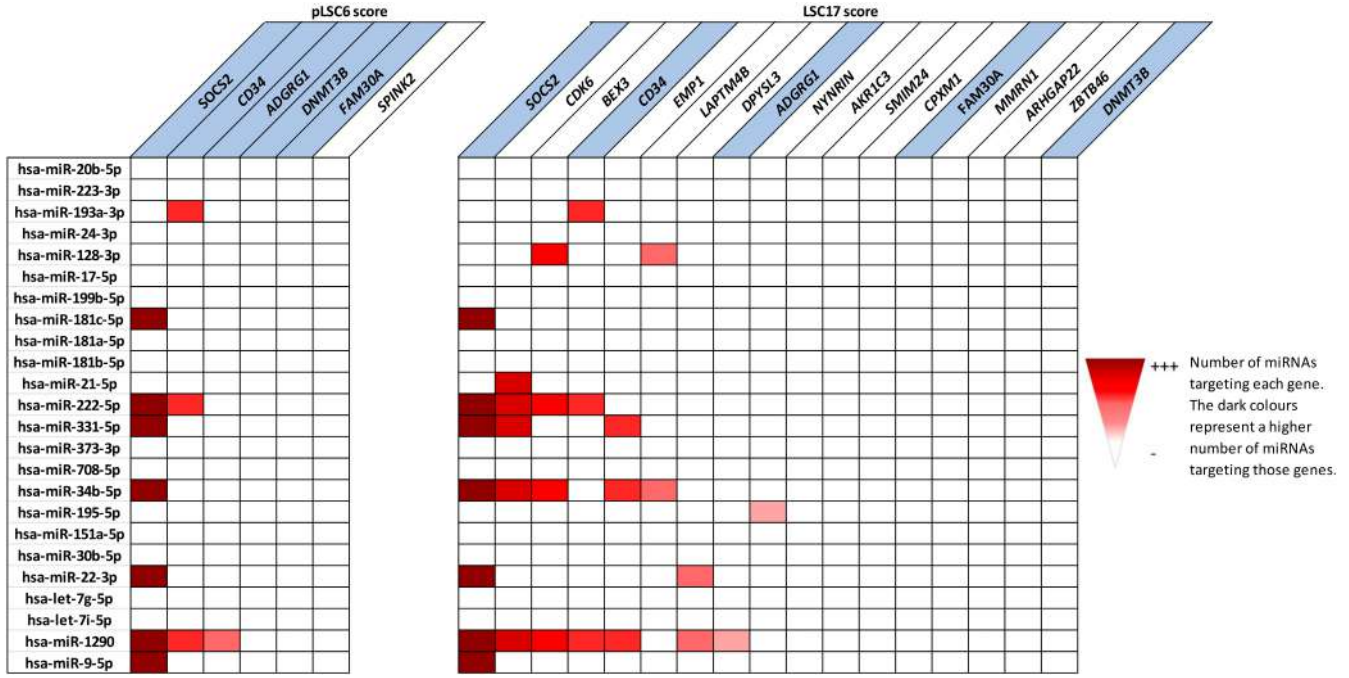


FIGURE 7 Genes included in the pLSC6 (left) and LSC17 (right) scores. Genes targeted by each of the miRNAs of the signature are coloured. Genes coloured in blue are common to both scores.

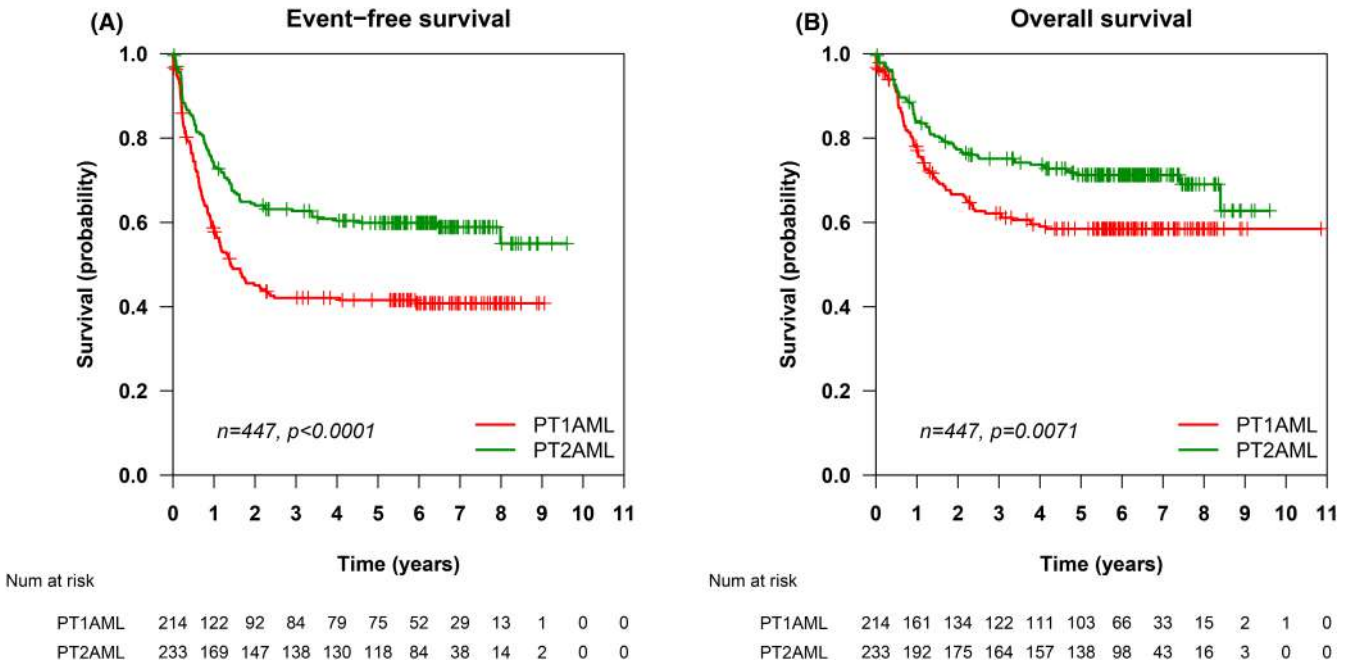


FIGURE 8 Differences in EFS (A) and OS (B) between PT1AML and PT2AML, groups defined by the 24-miRNA expression in the validation cohort.

MRD, genetics, pLSC6 score, and the 24-miRNAs signature contribute to predicting the outcome

We used the C-index to evaluate the relative contribution of genetics, MRD, the pLSC6 score, and the 24-miRNA signature to predicting outcomes, first individually and then combined (Table 4 and Table S12). A high pLSC6 score had

the highest predictive capacity both for EFS (C-index: 0.730) and OS (C-index: 0.701). The best combination to predict an event included the MRD, genetics, high pLSC6 score, and the 24-miRNAs signature for EFS (C-index: 0.793) and OS (C-index: 0.769). Adding the miRNA signature to the combination of MRD, genetics, and high pLSC6 score slightly increased the C-index for OS but not for EFS (Table S12).

The proposed combined classification was better at identifying high-risk patients than the pLSC6 score alone (Figure 9).

DISCUSSION

Genetic aberrations and leukaemia stemness impact prognosis in AML patients,^{4–8,15,16} but few studies have analysed the role of epigenetics. We analysed the expression of 89 preselected miRNAs and identified a 24-miRNA signature related to stemness capable of predicting outcomes in paediatric AML patients. Moreover, we observed that the combination

of MRD, genetics, pLSC6 score, and the 24-miRNA signature had a higher capacity to predict the outcome than each variable individually.

In the unsupervised analyses, our patients were segregated by lineage according to the miRNA expression.^{17–19} Interestingly, the clusters were associated with different outcomes in both lineages, although not significantly in ALL, probably due to the low number of events and patients. In contrast, the miRNA expression in AML patients defined a group with significantly worse OS and EFS (PIAML). PIAML patients underexpressed 23 miRNAs and overexpressed one miRNA, and our analyses suggested a higher activation of stemness in these patients. PIAML and P2AML

TABLE 3 Main clinical and biological characteristics of PT1AML versus PT2AML.

	PT1AML <i>n</i> = 214	PT2AML <i>n</i> = 233	<i>p</i> -value
Gender (<i>n</i> = 447)			0.28
Female (<i>n</i> = 219)	111 (51.9%)	108 (46.4%)	
Male (<i>n</i> = 228)	103 (48.1%)	125 (53.6%)	
Age, years (<i>n</i> = 447)			
Median [range]	8.9 [0.0;18.8]	10.5 [0.1;18.9]	0.040
[0,2) years old (<i>n</i> = 82)	45 (21.0%)	37 (15.9%)	0.37
[2,10) years old (<i>n</i> = 144)	71 (33.2%)	73 (31.3%)	
[10,15) years old (<i>n</i> = 124)	57 (26.6%)	67 (28.8%)	
[15,19) years old (<i>n</i> = 97)	41 (19.2%)	56 (24.0%)	
WBC count, $\times 10^9/L$ [range] (<i>n</i> = 447)	40.5 [0.2;526.0]	30.0 [1.1;473.0]	0.12
CNS disease (<i>n</i> = 447)			0.78
Not infiltrated	199 (93.0%)	214 (91.8%)	
Infiltrated	15 (7.0%)	19 (8.2%)	
t(8;21) <i>RUNX1::RUNX1T1</i> (<i>n</i> = 433)	3/209 (1.4%)	63/224 (28.1%)	<0.00001
inv(16) <i>CBFB::MYH11</i> (<i>n</i> = 433)	4/209 (1.9%)	53/224 (23.7%)	<0.00001
KMT2A+ (<i>n</i> = 433)	49/209 (23.4%)	10/224 (4.5%)	<0.00001
t(9;11)(p22;q23) (<i>n</i> = 429)	22/207 (10.6%)	3/222 (1.4%)	<0.0001
t(10;11)(p11.2;q23) (<i>n</i> = 433)	7/209 (3.3%)	1/224 (0.4%)	0.032
t(11;19)(q23;p13.1) (<i>n</i> = 433)	8/209 (3.8%)	3/224 (1.3%)	0.18
AML-other karyotypes (<i>n</i> = 433)	143/209 (68.4%)	97/224 (43.3%)	<0.00001
<i>FLT3</i> ITD mutation (<i>n</i> = 446)	75/214 (35.0%)	18/232 (7.8%)	<0.00001
<i>NPM1</i> mutation (<i>n</i> = 442)	33/212 (15.6%)	5/230 (2.2%)	<0.0001
Protocol (<i>n</i> = 447)			
AAML03P1 (<i>n</i> = 17)	8 (3.7%)	9 (3.9%)	0.24
AAML0531 (<i>n</i> = 427)	203 (94.9%)	224 (96.1%)	
CCG2961 (<i>n</i> = 3)	3 (1.4%)	0 (0.0%)	
MRD $\geq 0.1\%$ at the end of induction (<i>n</i> = 362)	49/170 (28.8%)	55/192 (28.6%)	1.00
EFS (<i>n</i> = 447)			<0.0001
5-year estimate (95% CI)	41.6% (35.4%–48.9%)	59.9% (53.4%–66.6%)	
10-year estimate (95% CI)	–	–	
OS (<i>n</i> = 447)			0.0071
5-year estimate (95% CI)	58.5% (52.1%–65.7%)	71.3% (65.6%–77.4%)	
10-year estimate (95% CI)	58.5% (52.1%–65.7%)	–	

Abbreviations: CI, confidence interval; CNS, Central nervous system; EFS, event-free survival; ITD, internal tandem duplication; OS, overall survival; WBC, white blood cell.

did not significantly differ in variables other than the outcome. However, all *PML::RARA* patients were in P2AML, while all *NPM1*-mutated cases clustered in P1AML. As *PML::RARA* cases are differentiated leukaemias, we could argue that they have low stemness levels. Alternatively, the miRNA signature could be a surrogate of their good-risk underlying genetics. Despite associating with good prognosis, *NPM1*-mutated cases were allocated to P1AML, probably due to the *HOX* gene upregulation in these patients.^{20,21}

The 24-miRNAs were involved in regulating stemness, differentiation, and proliferation, and our signature was enriched in cancer pathways.^{22–29} Most underexpressed miRNAs functioned as tumour suppressors.³⁰ hsa-miR-223-3p has been

reported to inhibit cell proliferation and enhance apoptosis in AML cells,³¹ and its upregulation is associated with good prognosis in ALL patients.³² hsa-miR-193a-3p has a role in AML progression^{33,34}; its upregulation stimulated apoptosis and blast differentiation through *RUNX1::RUNX1T1* inhibition. A low hsa-miR-181a-5p expression is associated with a worse outcome in AML.^{10,35} hsa-miR-181a-5p downregulates *KRAS*, *NRAS*, and *MAPK1*, and its upregulation reduces cell proliferation. In *KMT2A*+ AML, the downregulation of hsa-miR-34b-5p targeting *CDK4*, *BCL2*, *RAS*, and *HOX* has been reported.³³ Additionally, hsa-miR-34b-5p suppressed AML cell proliferation and survival by targeting *HSF1*, leading to the inactivation of Wnt/ β -catenin.^{36,37} Conversely, the miRNA overexpressed in our signature, hsa-miR-9-5p, promotes proliferation and inhibits apoptosis, acting as oncomiR in *KMT2A*+ AML cases.³⁸

As expected, several miRNAs were related to stemness pathways. Stemness-related genes like *SOCS2* or *SPI* could be potentially targeted by 7 and 8 miRNAs from our signature, respectively. Other genes potentially targeted by several miRNAs in our signature were *CD34*, *MBNL3* or *ADGRG1*, all involved in signalling, transcription regulation, miRNA regulation or stemness.^{39–42} Several miRNAs from our signature were predicted to target genes in the LSC17 and pLSC6 scores.^{6,7} However, we lack direct evidence of the miRNA expression at functional levels in normal haematopoietic stem cells; therefore, we cannot assume that the downregulation of the miRNAs in our signature causes aberrant expression of the predicted targets.

miRNAs can predict relapse and improve risk stratification.⁴³ The 24-miRNA signature was the only significant predictive factor for OS and EFS in our study cohort. Notably, we

TABLE 4 C-index to evaluate the capacity to predict the outcome, both individually and by combining different factors.

	EFS		OS	
	C-index	S.E.	C-index	S.E.
C-index estimate individually for each variable				
MRD+ ($\geq 0.1\%$)	0.560	0.052	0.541	0.058
Genetics	0.717	0.055	0.703	0.063
pLSC6 score (≥ 4.08)	0.730	0.049	0.701	0.060
24-miRNA signature	0.646	0.053	0.653	0.056
C-index estimate combining four variables				
MRD+ ($\geq 0.1\%$) + Genetics + pLSC6 score (≥ 4.08) + 24-miRNA signature	0.793	0.048	0.769	0.055

Abbreviations: MRD+, measurable residual disease at the end of induction; pLSC6, paediatric leukaemic stem cell score; SE, standard error.

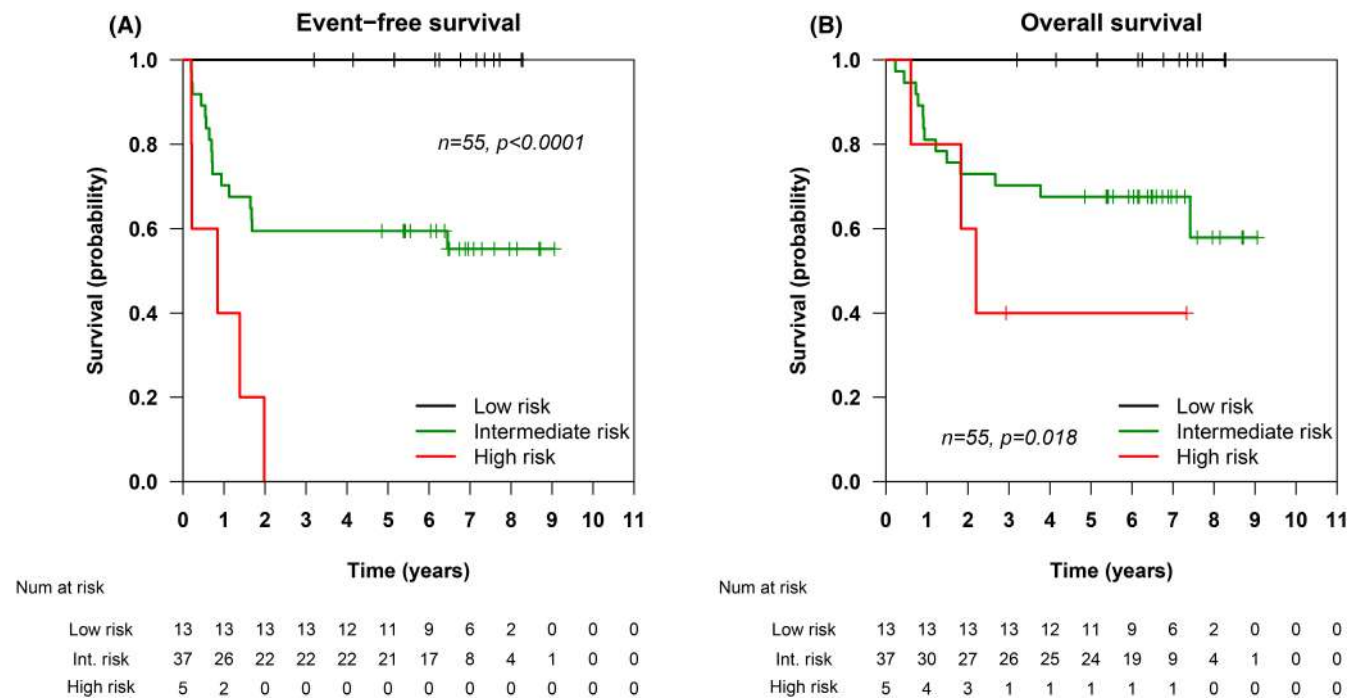


FIGURE 9 Differences in EFS (A) and OS (B) between different risk groups with the proposed stratification model combining genetics, MRD, pLSC6 score, and 24-miRNA signature.

confirmed the predictive value of the 24-miRNA signature in the unbiased validation cohort of 447 AML patients. In this cohort, genetics was unevenly distributed between groups defined by the miRNA expression, with all the good-risk genetic abnormalities being in the P2TAML group associated with better outcomes. We also found a correlation between our 24-miRNA signature and the pLSC6 score. The LSC17 and pLSC6 scores have been significantly associated with underlying genetic aberrations.^{6,8} Overall, our 24-miRNA signature could be seen as the epigenetic counterpart of the genetic and stemness expression variables predicting the outcome.

The multivariate analysis confirmed genetics and MRD as prognostic factors for EFS and OS. The pLSC6 score predicted the outcome in the subcohort of patients with available data. Genetics, MRD levels, gene expression, and leukaemia stemness have been reported to impact prognosis,^{6–8,44} but epigenetic data was scarce. Some studies described the impact of a group of miRNAs in AML patients; others reported the combined value of individual miRNAs with the LSC17.^{34,45}

In contrast, our study analysed a wide number of miRNAs involved in stemness and identified a 24-miRNA signature predicting prognosis in AML patients. Although our miRNAs signature was not independent of the underlying genetics and stemness gene expression, we believe we provide novel and meaningful information about the role of epigenetic factors in the stemness pathway deregulation in paediatric AML patients. Moreover, the predictive capacity of the combination of MRD, genetics, pLSC6 score, and the 24-miRNA signature was superior to that of each variable individually, and adding the miRNA information increased the predictive capacity for OS.

The low number of patients, the heterogeneity of treatment, the selection bias on the availability of samples and data, and the enrichment in *KTM2A+* cases in the test cohort could limit our study. Nevertheless, we have validated our results in a large, independent and unbiased cohort, confirming the predictive value of the 24-miRNA signature in real-world paediatric AML series. The validation series was comparable with the test cohort except for age, WBC, CNS infiltration, *KMT2A+* representation, and EFS. Those differences could be explained by the bias in *KMT2A+* cases in the HSJD series, with a higher proportion of infants and CNS infiltration. We analysed the impact of the 24-miRNA signature within each molecular category and observed no differences according to *KMT2A* rearrangement. Detecting surrogates of our signature (like *CD34* and *ADGRG1*) by flow cytometry^{46,47} could overcome the complexity of applying a gene expression signature. Confirmation of our results is needed in large series before any clinical application is planned. Also, functional analyses could be further explored in the paediatric AML setting.

In summary, we obtained a 24-miRNA signature capable of distinguishing outcomes in paediatric AML patients. The 24-miRNA signature correlated with pLSC6 and underlying genetics but added predictive value to those variables in a global model combining MRD, genetics, pLSC6 score, and the miRNA expression. We propose a model combining genetics,

MRD and stemness (including RNA and miRNA expression), to refine the risk stratification of paediatric AML patients.

ETHICAL ISSUES

The study was conducted following the ethical standards and the Declaration of Helsinki according to national and international guidelines. After obtaining a favourable report from our Ethics Committee (IRB PIC12-17, available upon request), samples were used after written informed consent from the patients or their legal guardians were obtained and stored in the legally competent Biobank of HSJD.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

E.E.C., N.V.G., and M.C. designed the study, and M.C. and M.T. supervised the project; S.R., A.C., M.O., L.M., R.A., J.A.S., C.R., A.Carboné., recruited patients and provided samples and data. M.T. and M.C. performed the molecular diagnosis and flow cytometry characterisation of HSJD patients. N.V.G. and M.C. selected the miRNAs for the study. E.E.C., C.V.G., and M.R.F. performed the experimental studies, S.G.G. performed the miRNAs expression analysis, S.P.J. performed the statistical analysis, and E.E.C., M.C., and M.T. analysed the data. E.E.C., N.V.G., C.V.G., M.T., and M.C. wrote the paper with the contribution of M.F.R., S.G.G., S.P., A.C., and S.R. All authors have read and agreed to the submitted version of the manuscript. M.T. and M.C. are the guarantors of this work; as such, they have full access to all data in the study and take responsibility for the data integrity and the accuracy of the data analysis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We want to thank Dr Margarita Ortega from the Hospital Vall d'Hebron, Dr Luz Muñoz from Hospital Parc Taulí, Dr Rosa Adán from Hospital Universitario Cruces, Dr José Antonio Salinas from Hospital Universitario Son Espases and Dr Carmen Rodriguez and Dr Ana Carboné from Hospital Universitario Miguel Servet for providing valuable patients samples. We also are indebted to patients and families and Obra Social Hospital Sant Joan de Déu, Candela polsera solidària, Força Miquel, Magic, Mua Association, 'Fundación Cris contra el Càncer', and the 'Fundació la Marató TV3' (grant 201921-30) for their support. We are indebted to the 'Biobanc de l'Hospital Infantil Sant Joan de Déu per a la Investigació' integrated into the Spanish Biobank Network of ISCIII for the sample and data procurement and 'Mitjans audiovisuals department' from Hospital Sant Joan de Déu. This study has been funded by PI16/00246 project integrated into Plan Nacional de I+D+I and co-funded by ISCIII–Subdirecció General de Evaluació y Fomento de la Investigación Sanitaria. The results published here are in whole or part based upon data generated by the Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments (<https://ocg.cancer.gov/programs/target>) initiative, phs000218. The data used for this analysis are available at <https://portal.gdc.cancer.gov/projects>.

FUNDING INFORMATION

This study has been supported by Instituto de Salud Carlos III (PI16/00246), 'Fundación Cris contra el Cáncer association', and the Fundació La Marató TV3 (grant 201921-30).

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

We have no disclosure of interest or any commercial affiliation.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Elena Esperanza-Cebollada  <https://orcid.org/0000-0001-5451-0370>

Soledad Gómez-González  <https://orcid.org/0000-0002-0578-4276>

Sara Perez-Jaume  <https://orcid.org/0000-0002-9805-4810>


Nerea Vega-García  <https://orcid.org/0000-0002-3190-063X>

Clara Vicente-Garcés  <https://orcid.org/0000-0002-2556-043X>

Mercè Richarte-Franqués  <https://orcid.org/0000-0001-6033-9880>

Susana Rives  <https://orcid.org/0000-0002-5658-1831>

Albert Català  <https://orcid.org/0000-0003-0133-1752>

Montserrat Torredadell  <https://orcid.org/0000-0002-0027-3215>

Mireia Camós  <https://orcid.org/0000-0003-3658-7942>

REFERENCES

- Klco JM, Mullighan CG. Advances in germline predisposition to acute leukaemias and myeloid neoplasms. *Nat Rev Cancer*. 2021;21(2):122–37. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00315-z>
- Kimura S, Mullighan CG. Molecular markers in ALL: clinical implications. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2020;33(3):101193.
- Zwaan CM, Kolb EA, Reinhardt D, Abrahamsson J, Adachi S, Aplenc R, et al. Collaborative efforts driving progress in pediatric acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2015;33(27):2949–62.
- Krivtsov AV, Twomey D, Feng Z, Stubbs MC, Wang Y, Faber J, et al. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature*. 2006;442(7104):818–22.
- Yeung J, Esposito MT, Gandillet A, Zeisig BB, Griessinger E, Bonnet D, et al. β -Catenin mediates the establishment and drug resistance of MLL leukemic stem cells. *Cancer Cell*. 2010;18(6):606–18. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.10.032>
- Ng SWK, Mitchell A, Kennedy JA, Chen WC, McLeod J, Ibrahimova N, et al. A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature*. 2016;540(7633):433–7.
- Elsayed AH, Rafiee R, Cao X, Downing JR, Ribeiro R, Fan Y, et al. A 6-gene leukemic stem cell score identifies high risk pediatric acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2020;34(3):735–45.
- Fornierod M, Ma J, Noort S, Liu Y, Walsh MP, Shi L, et al. Integrative genomic analysis of pediatric myeloid-related acute Leukemias identifies novel subtypes and prognostic indicators. *Blood Cancer Discov*. 2021;2(6):586–99.
- Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(2):126–39.
- Mardani R, Jafari Najaf Abadi MH, Motieian M, Taghizadeh-Boroujeni S, Bayat A, Farsinezhad A, et al. MicroRNA in leukemia: tumor suppressors and oncogenes with prognostic potential. *J Cell Physiol*. 2019;234(6):8465–86.
- Schotte D, Pieters R, Den Boer ML. MicroRNAs in acute leukemia: from biological players to clinical contributors. *Leukemia*. 2012;26(1):1–12. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.151>
- Szczepanek J. Role of microRNA dysregulation in childhood acute leukemias: diagnostics, monitoring and therapeutics: a comprehensive review. *World J Clin Oncol*. 2020;11(6):348–69.
- Khan AQ, Ahmed EI, Elareer NR, Junejo K, Steinhoff M, Uddin S. Role of miRNA-regulated cancer stem cells in the pathogenesis of human malignancies. *Cell*. 2019;8(8):840.
- R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2022 Available from: <https://www.r-project.org/>
- Bullinger L, Döhner K, Bair E, Fröhling S, Schlenk RF, Tibshirani R, et al. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2004;350(16):1605–16.
- Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid. *Leukemia*. 2016;374(23):2209–21.
- Zhi F, Cao X, Xie X, Wang B, Dong W, Gu W, et al. Identification of circulating MicroRNAs as potential biomarkers for detecting acute myeloid leukemia. *PLoS One*. 2013;8(2):1–10.
- Mi S, Lu J, Sun M, Li Z, Zhang H, Neilly MB, et al. MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(50):19971–6.
- Wang Y, Li Z, He C, Wang D, Yuan X, Chen J, et al. MicroRNAs expression signatures are associated with lineage and survival in acute leukemias. *Blood Cells Mol Dis*. 2010;15(44):191–7.
- Alcalay M, Tiacci E, Bergomas R, Bigerna B, Venturini E, Minardi SP, et al. Acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic nucleophosmin (NPMc+ AML) shows a distinct gene expression profile characterized by up-regulation of genes involved in stem-cell maintenance. *Blood*. 2005;106(3):899–902.
- Ikeda D, Chi S, Uchiyama S, Nakamura H, Guo YM, Yamauchi N, et al. Molecular classification and overcoming therapy resistance for acute myeloid leukemia with adverse genetic factors. *Int J Mol Sci*. 2022;23(11):1–22.
- Syeda ZA, Langden SSS, Munkhzul C, Lee M, Song SJ. Regulatory mechanism of microRNA expression in cancer. *Int J Mol Sci*. 2020;21(5):1–18.
- Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(6):321–33. <https://doi.org/10.1038/nrc3932>
- Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2014;9:287–314.
- Wuchty S, Arjona D, Bozdag S, Bauer PO. Involvement of microRNA families in cancer. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(17):8219–26.
- Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer contents. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:199–227.
- Carvalho J, Oliveira D, Alberto C, Sol M, Gois A, Alejandra J, et al. Differential MiRNA expression in childhood acute lymphoblastic leukemia and association with clinical and biological features. *Leuk Res*. 2011;36(3):293–8. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2011.10.005>
- Carvalho de Oliveira J, Molinari Roberto G, Baroni M, Bezerra Salomão K, Alejandra Pezuk J, Sol BM. MiRNA dysregulation in childhood hematological cancer. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9):1–30.
- Galardi A, Colletti M, Di Paolo V, Vitullo P, Antonetti L, Russo I, et al. Exosomal MiRNAs in pediatric cancers. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18):1–22.
- Yoshida K, Yamamoto Y, Ochiya T. miRNA signaling networks in cancer stem cells. *Regen Ther*. 2021;17:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2021.01.004>
- Xiao Y, Su C, Deng T. miR-223 decreases cell proliferation and enhances cell apoptosis in acute myeloid leukemia via targeting FBXW7. *Oncol Lett*. 2016;12(5):3531–6.

32. Grobbelaar C, Ford AM. The role of MicroRNA in paediatric acute lymphoblastic Leukaemia: challenges for diagnosis and therapy. *J Oncol*. 2019;2019:1–14.
33. Anelli L, Zagaria A, Specchia G, Musto P, Albano F. Dysregulation of mirna in leukemia: exploiting mirna expression profiles as biomarkers. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13):1–22.
34. Bhayadia R, Krowiorz K, Haetscher N, Jammal R, Emmrich S, Obulkasim A, et al. Endogenous tumor suppressor microRNA-193b: therapeutic and prognostic value in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2018;36(10):1007–16.
35. Huang X, Schwind S, Santhanam R, Eisfeld AK, Chiang CL, Lankenau M, et al. Targeting the RAS/MAPK pathway with miR-181a in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2016;7(37):59273–86.
36. Li G, Song Y, Zhang Y, Wang H, Xie J. MIR-34b targets HSF1 to suppress cell survival in acute myeloid leukemia. *Oncol Res*. 2016;24(2):109–16.
37. Balgobind BV, Hollink IHIM, Arentsen-Peters STCJM, Zimmermann M, Harbott J, Berna Beverloo H, et al. Integrative analysis of type-I and type-II aberrations underscores the genetic heterogeneity of pediatric acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2011;96(10):1478–87.
38. Chen P, Price C, Li Z, Li Y, Cao D, Wiley A, et al. miR-9 is an essential oncogenic microRNA specifically overexpressed in mixed lineage leukemia-rearranged leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(28):11511–6.
39. Grandits AM, Wieser R. Gene expression changes contribute to stemness and therapy resistance of relapsed acute myeloid leukemia: roles of SOCS2, CALCRL, MTSS1, and KDM6A. *Exp Hematol*. 2021;99:1–11.
40. Holm F, Hellqvist E, Mason CN, Ali SA, Delos-Santos N, Barrett CL, et al. Reversion to an embryonic alternative splicing program enhances leukemia stem cell self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(50):15444–9.
41. Vagapova ER, Lebedev TD, Tikhonova AD, Goikhman BV, Ivanenko KA, Spirin PV, et al. High expression level of SP1, CSF1R, and PAK1 correlates with sensitivity of leukemia cells to the antibiotic Mithramycin. *Mol Biol*. 2020;54(3):458–63.
42. Liu B, Ma H, Liu Q, Xiao Y, Pan S, Zhou H, et al. MiR-29b/Sp1/FUT4 axis modulates the malignancy of leukemia stem cells by regulating fucosylation via Wnt/ β -catenin pathway in acute myeloid leukemia. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):1–14.
43. Avigad S, Verly IR, Lebel A, Kordi O, Shichrur K, Ohali A, et al. miR expression profiling at diagnosis predicts relapse in pediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosom Cancer*. 2016;55(4):328–39. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/gcc.22334> [cited 2022 Oct 14].
44. Bolouri H, Farrar JE, Triche T Jr, Ries RE, Lim EL, Alonzo TA, et al. The molecular landscape of pediatric acute myeloid leukemia reveals recurrent structural alterations and age-specific mutational interactions. *Nat Med*. 2018;24(1):103–12. <https://doi.org/10.1038/nm.4439>
45. Lauber C, Correia N, Trumpp A, Rieger MA, Dolnik A, Bullinger L, et al. Survival differences and associated molecular signatures of DNMT3A-mutant acute myeloid leukemia patients. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69691-8>
46. Jentzsch M. High expression of the stem cell marker GPR56 at diagnosis identifies acute myeloid leukemia patients at higher relapse risk after allogeneic stem cell transplantation with the CD34+/CD38– population. *Haematologica*. 2012;9(6):898–900.
47. Daga S, Rosenberger A, Quehenberger F, Krisper N, Prietl B, Reinisch A, et al. High GPR56 surface expression correlates with a leukemic stem cell gene signature in CD34-positive AML. *Cancer Med*. 2019;8(4):1771–8.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Esperanza-Cebollada E, Gómez-González S, Perez-Jaume S, Vega-García N, Vicente-Garcés C, Richarte-Franqués M, et al. A miRNA signature related to stemness identifies high-risk patients in paediatric acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2023;00:1–15. <https://doi.org/10.1111/bjh.18746>

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary Methods

Supplementary Table 1. List of the 89 miRNA selected, grouped by family and cluster, their described targets in self-renewal and stemness pathways and/or their possible clinical relevance in diagnosis, prognosis, or treatment in paediatric acute leukaemia.

Supplementary Table 2. Sequence of the 96 miRNA genes included in the panel.

Supplementary Table 3. Main clinic and biological characteristics of 39 AML patients classified within P1AML or P2AML groups according to their miRNA expression.

Supplementary Table 4. List of pathways targeted by the 24 selected miRNAs and their p-value.

Supplementary Table 5. Univariate analysis of HSJD cohort.

Supplementary Table 6. Comparison between AML patients included in HSJD and TARGET cohorts.

Supplementary Table 7. Main clinic and biological characteristics of the 64 patients with pLSC6 gene expression available data.

Supplementary Table 8. Correlation between the pLSC6 levels and the groups (P1TAML and P2TAML), as defined by the 24-miRNAs signature.

Supplementary Table 9. Univariate analysis of the TARGET cohort.

Supplementary Table 10. Multivariate analysis of the TARGET cohort.

Supplementary Table 11. Multivariate analysis of the sub-cohort of 55 patients from the TARGET cohort with available data on the pLSC6 score, the 24-miRNA signature's expression, and clinical and genetic data.

Supplementary Table 12. C-Index to evaluate the capacity to predict the outcome individually and combining the different factors.

Supplementary Figure 1. miRNA panel design.

Supplementary Figure 2. Standard deviation analysis of potential reference endogenous controls.

Supplementary Figure 3. Event-free survival (EFS) and overall survival (OS) of ALL patients: entire ALL cohort and separated by groups according to the unsupervised analysis.

Supplementary Figure 4. Unsupervised hierarchical clustering analysis based on the miRNA expression of 447 patients of the TARGET cohort.

Supplementary Figure 5. Correlation analysis between the 24 miRNAs from the signature and the genes in pLSC6 and LSC17 score.

Supplementary Material and Methods

1. Test cohort

Patients' origin and therapeutic protocols

Patients were diagnosed and treated at Hospital Sant Joan de Déu (HSJD). As the frequency of *KMT2A* rearrangements is low, several hospitals (Hospital Vall d'Hebron, Hospital Parc Taulí, Hospital Universitario Cruces, Hospital Universitario Son Espases, and Hospital Universitario Miguel Servet) contributed with *KMT2A*-rearranged cases. An integrated diagnosis of leukaemia was made by combining morphology, multiparametric flow cytometry (4-colour and 8-colour panels and DNA index), karyotype, fluorescent in situ hybridisation (FISH), and polymerase chain reaction (PCR) for the main rearrangements data.

Patients were treated according to the Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátricas (SEHOP), Programa Español de Tratamientos de Hematología (PETHEMA), INTERFANT-99, and INTERFANT-06 specific protocols for ALL. AML patients were treated according to SHOP AML, PETHEMA APL (acute promyelocytic leukaemia) and Nordic Society for Paediatric Haematology and Oncology (NOPHO) protocols.

miRNA selection

Supplementary Table 1 lists the selected 89 miRNAs, grouped by family and cluster, their described targets in self-renewal and stemness pathways and/or their possible clinical relevance in diagnosis, prognosis, or treatment in paediatric acute leukaemia. We also included three endogenous controls: hsa-miR-103a-3p (repeated twice), hsa-miR-191-5p, and U6 snRNA. Finally, we included three spike-in controls, two of them as interplate (UniSp3 IPC) and one as intraplate control (UniSp6 CP) (Supplementary Figure 1 and Supplementary Table 2). The miRBase repository was used to identify the miRNAs sequence, annotated, and group them into different clusters and families (1–7).

RNA extraction, cDNA synthesis, and quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Bone marrow mononuclear cells were treated with a Ficoll-Hypaque (Sigma, St Louis, MO, USA) centrifugation gradient. Total RNA was extracted from samples using TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) and Direct-zol RNA MiniPrep kit (Zymo Research, California, United States). The RNA was stored in DEPC-treated water at -80°C.

Total RNA (10 ng) was retrotranscribed using the miRCURY LNATM Universal RT microRNA PCR kit (Bionova Científica, Madrid, Spain), and qRT-PCR was performed using SybrGreen Master Mix according to the manufacturer's protocol. The microRNA levels were measured using the LightCycler 480 equipment (Roche, Basel, Switzerland).

Raw qRT-PCR data curation and normalization

Raw qRT-PCR threshold cycles (Ct) values over 35 were regarded as negative and censored to a 45 Ct value. Raw Ct values were normalized using the interplate control (IPC), subtracting the global IPC mean from the IPC mean of each sample (CTnorm).

Reference endogenous control selection

Standard deviation analysis was performed on CTnorm values of potential reference endogenous controls: U6 snRNA, hsa-miR-191-5p, and hsa-miR-103a-3p. hsa-miR-191-5p showed the lowest standard deviation (SD=2.306) among the endogenous controls and was chosen as a reference (Supplementary Figure 2).

miRNA expression analysis

Unsupervised analysis

Delta CT (Δ CT) values were obtained by computing the difference between the endogenous hsa-miR-191-5p CTnorm values and the miRNAs CTnorm values. Unsupervised hierarchical clustering analysis (HCA) of miRNAs' Δ CT values was performed using the heatmap.2 function of the R/Bioconductor gplots package. The euclidean measure was used to obtain the distance matrix and the complete agglomeration method for clustering.

The unsupervised hierarchical clustering dendrograms were cut into clusters using the cutree function of the R/Bioconductor stats package.

Principal Component Analysis (PCA) was performed by applying the prcomp function of the stats R/Bioconductor package to the Δ CT values and represented using the plotly package.

Supervised analysis

Relative expression values ($\Delta\Delta$ CT) were calculated using the Global Mean of leukaemic samples as a calibrator and plotted as a heatmap of hierarchical clustering. miRNAs $\Delta\Delta$ CT expression differences between paired subgroups of interest were calculated using the lmFit function of the limma R package. We used the false discovery rate (FDR) method to adjust the p-values with a 0.05 cut-off (8).

To calculate miRNAs $\Delta\Delta$ CT expression differences between multiple subgroups of interest, the ANOVA function aov of the stats R package was applied.

miRNA pathways analysis

The heatmap to understand miRNA function and the pathways they are involved in were calculated using the DIANA-mirPath v3.0 web server. The server identifies all the significantly targeted pathways by the selected miRNAs. The server performs the enrichment analysis and estimates the significance levels (p-values) between each miRNA and every pathway. Subsequently, a merged p-value is extracted for each pathway by combining the previously calculated significance levels using Fisher's meta-analysis method. The resulting p-value depicts 1- the probability that the examined pathways are significantly enriched with gene targets of at least one selected miRNA. The merged p-values signify if a particular pathway is targeted by at least one miRNA out of the initially selected group (9).

miRNA Target prediction

The miRNA targets of interest were identified using the TargetScan Human database V8.0 (<http://www.targetscan.org/>) (10,11), which predicts the miRNA biological targets by looking for complementary binding sites for miRNAs.

2. Validation cohort

To validate the twenty-four miRNAs signature, we extracted data from the Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments (TARGET) program (<https://target-data.nci.nih.gov/>): the clinical information, the miRNA-seq, and the gene expression microarray data of the AML patients.

The validation series was comparable with the test cohort except for the age, WBC, CNS infiltration, *KMT2A*+ representation, and EFS. Those differences could be explained by the bias in *KMT2A*+ cases in the HSJD series, with a higher proportion of infants and frequent CNS infiltration.

For the miRNA-seq data, we subset the reads per million of the miRNA signature from 759447 AML samples. We excluded 312 patients due to the lack of data on outcomes and patients older than 19 years old. Then, we applied the $\log_2(1 + \text{Reads per million})$ transformation to the miRNA-seq data. Unsupervised hierarchical clustering of the subsetted miRNA-seq transformed data was performed using the `heatmap.2` function of the R/Bioconductor `gplots` package. The euclidean measure was used to obtain the distance matrix and the complete agglomeration method for clustering. Then, the unsupervised hierarchical clustering dendrogram was cut into two clusters using the `cutree` function of the R/Bioconductor `stats` package. A Kaplan-Meier analysis of the survival rates of the two clusters obtained from the `cutree` function was performed using the `Surv` and `survfit` functions of the R package `survival` v3.3-1.

For the gene expression microarray data, we extracted the RMA normalized gene expression values (`TARGET_AML_RMA_norm_GE_level2.txt`) of the AML gene expression signature. We performed a Pearson correlation between the miRNA expression obtained from the miRNA-seq and the mRNA expression obtained from the gene expression microarray for the 64 patients identified with matched data. We also calculated the paediatric leukaemic stem cell score (pLSC6) (12) to assess the predictive ability of the proposed model integrating the LSC and the miRNA profile (see statistical methods).

Statistical methods

Quantitative variables were described using the median, minimum, and maximum. Qualitative variables were described with absolute frequencies and percentages. The association between quantitative variables was assessed using Spearman's correlation. We used the Mann-Whitney test to compare quantitative variables between the two groups. To compare qualitative variables among groups, we used the Fisher or khi-squared test, depending on whether the applicability conditions of the latter were fulfilled.

Event free-survival (EFS) was defined as the time in years from diagnosis to the first event of interest (relapse or death) or, if no events occurred, until the last follow-up. Overall survival (OS) was defined as the time in years from diagnosis until death or the last contact. Patients with no events were right-censored. Survival was assessed with the Kaplan-Meier estimator (13), and survival curves were compared among groups using the log-rank test (14). Cox proportional hazards models (15) were used to perform univariate and multivariate survival analyses. From these models, hazard ratios and their corresponding confidence intervals were derived. Only those statistically significant variables in the univariate analysis were included in the multivariate analysis. In cases in which Cox models could not be fit because of the absence of events in one of the groups, Firth correction was applied (16). C-index (17) was used to assess the predictive ability of the proposed variables individually and in combination. We used recursive-partitioning Cox regression models for EFS to find an optimal threshold for the 6-gene pLSC score (12).

All analyses were conducted with R software, version 4.2.1 (18). All p-values under 0.05 were considered statistically significant.

Supplementary Table 1. List of the 89 miRNA selected, grouped by family and cluster, their described targets in self-renewal and stemness pathways and/or their possible clinical relevance in diagnosis, prognosis, or treatment in paediatric acute leukaemia.

Gene family (1-7)	Clustered miRNAs (1-7)	miRNA	Stemness pathways	Clinical relevance in diagnosis, leukaemogenesis, prognosis and treatment	Target genes included in PLSC6 and/or LSC17 (10,11)	Target genes involved in stemness pathways (10,11)	References
let-7	hsa-let-7a-1, hsa-let-7f, hsa-let-7d	hsa-let-7a-5p	X	X	CDK6, DPYSL, NVMNRIN	FZD3, DTX2, HOXB4, TP53, CCND2, HOXA1, NRAS, POLR2D, PBX1, WNT9A, NKD1, VANGL2, HOXD1, ABL2, SENP2, CBL, WNT9B, CCND1, DTX4, SH2B3, MEIS1, PPP3CA, FZD4, Y11, PSENNEN, GAB2, KMT2D, APC2, NCOR1, AKT2, NLK, SMAD2, CSNK2A1, MAPK8, DVL3, PIK3CA, WNT1	(19,20)
let-7	hsa-let-7a-3, hsa-let-7b	hsa-let-7b-5p	X	X	CDK6, DPYSL, NVMNRIN	HDAC5, FZD3, DTX2, HOXB1, TP53, CCND2, HOXA1, NRAS, POLR2D, PBX1, WNT9A, NKD1, VANGL2, HOXD1, ABL2, SENP2, CBL, WNT9B, CCND1, DTX4, SH2B3, MEIS1, PPP3CA, FZD4, Y11, PSENNEN, GAB2, KMT2D, APC2, NCOR1, AKT2, NLK, SMAD2, CSNK2A1, MAPK8, DVL3, PIK3CA, WNT1	(20,21)
let-7	hsa-let-7c-5p, hsa-mir-99a	hsa-let-7c-5p	X	X	CDK6, DPYSL, NVMNRIN	HDAC5, FZD3, DTX2, HOXB1, TP53, CCND2, HOXA1, NRAS, POLR2D, PBX1, WNT9A, NKD1, VANGL2, HOXD1, ABL2, SENP2, CBL, WNT9B, CCND1, DTX4, SH2B3, MEIS1, PPP3CA, FZD4, Y11, PSENNEN, GAB2, KMT2D, APC2, NCOR1, AKT2, NLK, SMAD2, CSNK2A1, MAPK8, DVL3, PIK3CA, WNT1	(19)
let-7	hsa-let-7a-1, hsa-let-7f, hsa-let-7d	hsa-let-7d-5p	X	X	CDK6, DPYSL, NVMNRIN	FZD3, DTX2, HOXB1, TP53, CCND2, HOXA1, NRAS, POLR2D, PBX1, WNT9A, NKD1, VANGL2, HOXD1, ABL2, SENP2, CBL, WNT9B, CCND1, DTX4, SH2B3, MEIS1, PPP3CA, FZD4, Y11, PSENNEN, GAB2, KMT2D, APC2, NCOR1, AKT2, NLK, SMAD2, CSNK2A1, MAPK8, DVL3, PIK3CA, WNT1	(19)
let-7	hsa-let-7g	hsa-let-7g-5p	X	X	CDK6, DPYSL, NVMNRIN	FZD3, DTX2, HOXB1, TP53, CCND2, HOXA1, NRAS, POLR2D, PBX1, WNT9A, NKD1, VANGL2, HOXD1, ABL2, SENP2, CBL, WNT9B, CCND1, DTX4, SH2B3, MEIS1, PPP3CA, FZD4, Y11, PSENNEN, GAB2, KMT2D, APC2, NCOR1, AKT2, NLK, SMAD2, CSNK2A1, MAPK8, DVL3, PIK3CA, WNT1	(19,20)
let-7	-	hsa-let-7i-5p	X	X	CDK6, DPYSL, NVMNRIN	FZD3, DTX2, HOXB1, TP53, CCND2, HOXA1, NRAS, POLR2D, PBX1, WNT9A, NKD1, VANGL2, HOXD1, ABL2, SENP2, CBL, WNT9B,	(19,20)

let-7	hsa-let-7a-1 hsa-let-7f-1 hsa-let-7d	hsa-let-7f-5p	X	X		CDK6, DPYSL, NYNRIN	FZD3, DTX2, HOXB1, TP53, CCND2, HOXA1, NRAS, POLR2D, PBX1, WNT9A, NKD1, VANGL2, HOXD1, ABL2, SENP2, CBL, WNT9B, CCND1, DTX4, SH2B3, MEI1, PPP3CA, FZD4, YY1, PSENE1, GAB2, KMT2D, APC2, NCOR1, AKT2, NLK, SMAD2, CSNK2A1, MAPK8, DVL3, PIK3CA, WNT1	(19,20)
let-7	hsa-mir-99b hsa-let-7e hsa-mir-125a	hsa-let-7e-5p	X	X		CDK6, DPYSL, NYNRIN	FZD3, DTX2, HOXB1, TP53, CCND2, HOXA1, NRAS, POLR2D, PBX1, WNT9A, NKD1, VANGL2, HOXD1, ABL2, SENP2, CBL, WNT9B, CCND1, DTX4, SH2B3, MEI1, PPP3CA, FZD4, YY1, PSENE1, GAB2, KMT2D, APC2, NCOR1, AKT2, NLK, SMAD2, CSNK2A1, MAPK8, DVL3, PIK3CA, WNT1	(19)
mir-8	hsa-mir-200c hsa-mir-141	hsa-miR-141-3p	X	X		CDK6, DPYSL3, ZBTB46	YY1, PRKACB, RARB, GRB2, CCND2, SOX17, ABL2, CHP1, SIAH1, CBL, STAT5A, PPP2CA, STAT5B, PSEN1, PPP2R5E, CSNK1A1, PPP3R1, PRICKLE1, CTBP2, CSNK2A1, EGR2, JAG1, WNT5A, CXXC4, PLCB4, PBX1, FZD4, NCOA3, KMT2C	(20,22)
mir-8	hsa-mir-200b hsa-mir-200a hsa-mir-429	hsa-miR-200b-3p	X	X		DNMT3B	ZEB2, PRKACB, JUN, PPP2CA, RHOA, CDKN1B, GRAP2, PIK3CA, LFNG, CBL, PPP2R5E, PTPN11, KRAS, RAC1, SMAD2, NCOA3, CNOT6, AKT2, NKD1, EP300, FBXW11, NOTCH1, ROCK2, CTBP2, TBL1XR1, PPP2R5C, EED, SUZ12, SIAH1, SOCS6, KMT2C, CAMK2D, PRKCA	(20,23)
mir-8	hsa-mir-200c hsa-mir-141	hsa-miR-200c-3p	X	X		DNMT3B	ZEB2, PRKACB, JUN, PPP2CA, RHOA, CDKN1B, GRAP2, PIK3CA, LFNG, CBL, PPP2R5E, PTPN11, KRAS, RAC1, SMAD2, NCOA3, CNOT6, AKT2, NKD1, EP300, FBXW11, NOTCH1, ROCK2, CTBP2, TBL1XR1, PPP2R5C, EED, SUZ12, SIAH1, SOCS6, KMT2C, CAMK2D, PRKCA	(20,23,24)
mir-9	-	hsa-miR-9-5p	X	X		SOCS2	PIK3R3, NOTCH2, SOCS2, HES1, KCNK10, RHOA, CSNK1A1, TCF7, VANGL1, BCL2L11, HOXD1, SH2B3, PPP2R5D, HOXB1, GAB2, GSK3B, SOS1, AJUBA, PPAR, FOXO3, NCOA3, NFATC3, PTPRJ, WNT4, CBL, PSEN1, ABL2, RXRA, PRKCA, TBL1XR1, MAML2, FZD5	(20,25-28)
mir-10	-	hsa-miR-10a-3p	X	X		CDK6	HOXA3, HOXA, PAX6, PPP2R5A, LRP6, WNT3, PIK3CA, APK8, JAG1, SMAD4, PLCB2, WNT16, C15ORF37, FZD6, DTX4, CDKN1B, C15orf37, SOCS6, KRAS, PBX1, HOXB3, PAGR1, UBB, PRICKLE1, FZD1, VANGL1, FZD3, PLCB1, CTNNB1, MAPK10, TCF7L2, NLK, NLK, PRKX, YY1, RBBP5, POLR2D, WNT5A, CNOT6, MAPK9, RBBP4, STAT5B, RPS27A, NFATC2, PPP3R2, CBL, WNT2B,	(23,29,30)

							GOLGA6L9, PRICKLE2, ROCK1, KMT2D, ABL2, NCOA3, SMAD3, GSK3B, PSEN1, TBL1XR1, PPP3CB, PPP2R5E, FZD5, SMAD2, PIAS2, CSNK2A1, PKNOX1, NCOA1, SOX17, NKD1	
mir-10	-	hsa-miR-10a-5p	X	X	CDK6	HOXA3, HOXB3, MAP3K7, PIK3CA, CTNNBIP1, CAMK2B, WNT9B, HOXA1, NCOA6, FZD2, TBL1X, CAMK2G, NFAT5, CNOT6, BCL2L11, BTRC, DVL3, SMAD2	(20,23,29)	
mir-10	-	hsa-miR-10b-5p	X	-	CDK6	HOXA3, HOXB3, MAP3K7, PIK3CA, CTNNBIP1, CAMK2B, WNT9B, HOXA1, NCOA6, FZD2, TBL1X, CAMK2G, NFAT5, CNOT6, BCL2L11, BTRC, DVL3, SMAD2	(23,29)	
mir-10	hsa-miR-99a hsa-let-7c	hsa-miR-99a-5p	X	X	-	HOXA1, FZD8, PPP3CA, FZD5	(19,31)	
mir-10	hsa-miR-100 hsa-miR-10526 hsa-let-7a-2	hsa-miR-100-5p	X	X	-	HOXA1, FZD8, PPP3CA, FZD5	(19,31)	
mir-10	-	hsa-miR-125b-5p	X	X	CD34	LFNG, CSNK2A1, GRB10, PPP2CA, PPP2R5C, APC, DAAM1, HOXD1, AKT3, HOXB3, GAB2, SH2B3, ABL2, DAAM2, MAPK10, VANGL2, PPP2R1B, DTX4, SMAD2, VANGL1, DVL3	(20,31)	
mir-15	hsa-miR-15a hsa-miR-16-1	hsa-miR-15a-5p	X	X	CDK6, NVNRIIN, ZBTB46	PDCD4, ARL2, BTG2, WNT3A, WNT7A, AKT3, CCND1, AXIN2, CCND2, DLL1, BTRC, WNT2B, CCND3, SOCS6, MAPK8, RARB, FLT3, ABL2, CHP1, WNT4, FOSL1, PPP2R5C, CTNNBIP1, FZD6, SIAH1, WIF1, LRP6, SMAD3, SIAH1, WIF1, LRP6, SMAD3, NKD1, EED, PIAS2, WNT10B, PIK3R1, FZD4, PPP2R1A, NOTCH2, PTPRJ, GRB10, HOXA3, KMT2D, NFATC3, KRAS, TBL1XR1, NFATC2, ROCK1, PPP2R1B, KMT2C, APC, SUZ12, ROCK2, GSK3B	(20,32)	
mir-15	hsa-miR-15b hsa-miR-16-2	hsa-miR-15b-5p	X	X	CDK6, NVNRIIN, ZBTB46	WNT3A, WNT7A, AKT3, CCND1, AXIN2, CCND2, DLL1, BTRC, WNT2B, CCND3, SOCS6, MAPK8, RARB, FLT3, ABL2, CHP1, WNT4, FOSL1, PPP2R5C, CTNNBIP1, FZD6, SIAH1, WIF1, LRP6, SMAD3, NKD1, EED, PIAS2, WNT10B, PIK3R1, FZD4, PPP2R1A, NOTCH2, PTPRJ, GRB10, HOXA3, KMT2D, NFATC3, KRAS, TBL1XR1, NFATC2, ROCK1, PPP2R1B, KMT2C, APC, SUZ12, ROCK2, GSK3B	(33)	
mir-15	hsa-miR-15a	hsa-miR-16-5p	X	X	CDK6, NVNRIIN, ZBTB46	WNT3A, WNT7A, AKT3, CCND1, AXIN2, CCND2, DLL1, BTRC, WNT2B, CCND3, SOCS6, MAPK8, RARB, FLT3, ABL2, CHP1, WNT4,	(20,33)	

hsa-mir-16-1							FOSL1, PPP2R5C, CTNNBIP1, FZD6, SIAH1, WIF1, LRP6, SMAD3, NKD1, EED, PIAS2, WNT10B, PIK3R1, FZD4, PPP2R1A, NOTCH2, PTPRJ, GRB10, HOXA3, KMT2D, NFATC3, KRAS, TBL1XR1, NFATC2, ROCK1, PPP2R1B, KMT2C, APC, SUZ12, ROCK2, GSK3B		
hsa-mir-497	hsa-miR-195-5p	X	X		CDK6, NYNRIN, ZBTB46		WNT3A, WNT7A, AKT3, CCND1, AXIN2, CCND2, DLL1, BTRC, WNT2B, CCND3, SOCS6, MAPK8, RARB, FLT3, ABL2, CHP1, WNT4, FOSL1, PPP2R5C, CTNNBIP1, FZD6, SIAH1, WIF1, LRP6, SMAD3, NKD1, EED, PIAS2, WNT10B, PIK3R1, FZD4, PPP2R1A, NOTCH2, PTPRJ, GRB10, HOXA3, KMT2D, NFATC3, KRAS, TBL1XR1, NFATC2, ROCK1, PPP2R1B, KMT2C, APC, SUZ12, ROCK2, GSK3B	(20,34)	
hsa-mir-17	hsa-miR-17-3p	X	X		SOCS2, CDK6, EMP1, DPYSL3, ZBTB46		PPP2CA, POLR2D, WNT5A, AKT3, C1orf220, HRAS, FOSL1, SFRP4, PPARC, BCL2L11, SMAD4, PPP3CA, STAT5A, FZD4, CAMK2D, APC, CAMK2B, WNT10B, NKD1, SFRP1, RBL1, MEIS1, MAML2, C2orf15, SLA2, MAPK10, SOCS2, RAC2, ABL2, GOLGA6L9, PIK3R1, GOLGA6L9, CAMK2G, NFATC3, NFAT5, RBL1, CTBPI, WNT4, WNT2B, ROCK1, SLA, SYK, KRAS, HOXD1, PSEN1, WNT5B, JAG1, GRB10, PRKX, TCF7, PPP2R5C, C2ORF15, HOXA1, HOXD4, CBL, KMT2C, PPP2R1B, DTX4, AJUBA, PPP2R5A, NFATC2, PRICKLE2, MAPK9, GRAP2, FZD2, RBBP4, HEYL, WNT3, C1ORF220, SOX17, CSNK2A1, FZD3, TBL1X, PIK3CA, WNT9B, NFATC4, CAMK2A, SMAD3, CNOT6, TP53, SKP1, PTPRJ, PLCB4, SUZ12, BTRC, FZD10, NRAS, WNT7B, PPP2R5D, DAAM2, HOXB3, FOXO3, HOXD3, TBL1XR1, CCND2, AKT1, GSK3B, YY1, ARRB1, CACYBP, SOS1, PPP3CC, PAX6, ASH2L, UBA52, RBBP5, WNT1, AKT2, NKD2, SAP30, PIAS2, PPP2R1A	(35)	
hsa-mir-17	hsa-miR-17-5p	X	X		CDK6		BCL11B, PPP3R1, UBC, RBBP7, SOS1, TCF7L1, VANGL1, EGR2, ABL2, CCND1, SOCS6, NCOA3, FZD3, PRKACB, FBXW11, HOXA2, CSNK1A1, AJUBA, BCL2L11, CCND2, PLCB1, PKNOX1, WNT9B, AKT3, PTPRJ, KMT2C, TBL1X, ROCK2, PPARC, RARB, NFAT5, PPP2CA, PIK3R1, FZD4, PSEN1, NCOR1	(20,35,36)	

mir-17	hsa-mir-17 hsa-mir-18a hsa-mir-19a hsa-mir-20a hsa-mir-19b-1 hsa-mir-92a-1	hsa-mir-18a-5p	X	X	-	CCND2, DAAM2, SMAD2, PRKACB, WNT8B, FZD3, NOTCH2, WNT9A, GAB2, NFAT5	(20,35,37)
mir-17	hsa-mir-17 hsa-mir-18a hsa-mir-19a hsa-mir-20a hsa-mir-19b-1 hsa-mir-92a-1	hsa-mir-20a-5p	X	X	CDK6	PPP3R1, UBC, RBBP7, SOS1, TCF7L1, VANGL1, EGR2, ABL2, CCND1, SOCS6, NCOA3, FZD3, PRKACB, FBXW11, HOXA2, CSNK1A1, AJUBA, BCL2L11, CCND2, PLCB1, PKNOX1, WNT9B, AKT3, PTPRJ, KMT2C, TBL1X, ROCK2, PPARD, RARB, NFAT5, PPP2CA, PIK3R1, FZD4, PSEN1, NCOR1	(20,29,35,38)
mir-17	hsa-mir-106a hsa-mir-18b hsa-mir-20b hsa-mir-19b-2 hsa-mir-92a-2 hsa-mir-363	hsa-mir-20b-5p	X	X	CDK6	PPP3R1, UBC, RBBP7, SOS1, TCF7L1, VANGL1, EGR2, ABL2, CCND1, SOCS6, NCOA3, FZD3, PRKACB, FBXW11, HOXA2, CSNK1A1, AJUBA, BCL2L11, CCND2, PLCB1, PKNOX1, WNT9B, AKT3, PTPRJ, KMT2C, TBL1X, ROCK2, PPARD, RARB, NFAT5, PPP2CA, PIK3R1, FZD4, PSEN1, NCOR1	(39,40)

mir-19	hsa-mir-17 hsa-mir-18a hsa-mir-19a hsa-mir-20a hsa-mir-19b-1 hsa-mir-92a-1	hsa-miR-19a-3p	X	X	X	ZBTB46	CCND1, PKNOX1, PRICKLE2, PPP2R5E, PRKACB, PIK3CA, WNT3, WNT10A, CCND2, FZD6, CNOT6, GRB10, WNT7B, PPP2R5A, HOXD1, PLCB1, PRKX, FBXW11, KDM6A, SOCS6, KRAS, YY1, NFATC2, BCL2L11, TMEM236, NLK, HOXD4, SUZ12, FZD3, VANGL1, RXRA, CSNK2A1, MAPK8, PAX6, WNT1	(20,35,41)
mir-19	hsa-mir-17 hsa-mir-18a hsa-mir-19a hsa-mir-20a hsa-mir-19b-1 hsa-mir-92a-1	hsa-miR-19b-3p	X	X	X	ZBTB46	CCND1, PKNOX1, PRICKLE2, PPP2R5E, PRKACB, PIK3CA, WNT3, WNT10A, CCND2, FZD6, CNOT6, GRB10, WNT7B, PPP2R5A, HOXD1, PLCB1, PRKX, FBXW11, KDM6A, SOCS6, KRAS, YY1, NFATC2, BCL2L11, TMEM236, NLK, HOXD4, SUZ12, FZD3, VANGL1, RXRA, CSNK2A1, MAPK8, PAX6, WNT1	(20,35,41)
mir-21	-	hsa-miR-21-5p	X	X	X	CDK6	ST3GAL6, JAG1, PIK3R1, MAPK10, SOCS6, PPP3CA, LRP6, MEIS1, CNOT6, SUZ12, WNT2B, NFAT5, FZD8	(20,42)
mir-22	-	hsa-miR-22-3p	X	X	X	SOCS2, DPYSL3	TET2, FRAT, ARRB1, CBL, AKT3, HOXA4, CSNK1A1, WNT10B, CAMK2G, TP53, MAPK10, SOCS2, EP300, NRAS, TCF7L2, NFAT5, PAX6, FZD8, WNT1	(20,23,43)
mir-24	hsa-mir-23b hsa-mir-27b hsa-mir-3074	hsa-miR-24-3p	X	X	X	-	BCL2L11, CDKN1B, WNT8B, CAMK2B, RBBP4, TCF7, CSK, CNOT6, WNT4, GSK3B, DLL1, WNT2B, GAB2, CAMK2D, SOCS6, PRKCA, RARG, NFAT5, NLK, FZD5, DVL3, PIAS2	(20,44)

	hsa-mir-24-1						
	hsa-mir-17 hsa-mir-18a hsa-mir-19a hsa-mir-20a hsa-mir-19b-1 hsa-mir-92a-1	hsa-mir-92a-3p	X	X	ZBTB46	CAMK2A, FZD10, BCL2L11, PTPRJ, CXXC4, DTX2, HOXC4, EZH2, EGR2, CTNNBIP1, SOCS6, NCOA3, DAAM1, TBLXR1, NLK, MAPK8, NRAS, ABL2, NOTCH1, NFAT5, PIK3CA	(20,35)
mir-25	-	hsa-mir-92b-3p	X	X	ZBTB46	CAMK2A, FZD10, BCL2L11, PTPRJ, CXXC4, DTX2, HOXC4, EZH2, EGR2, CTNNBIP1, SOCS6, NCOA3, DAAM1, TBLXR1, NLK, MAPK8, NRAS, ABL2, NOTCH1, NFAT5, PIK3CA	(35)
mir-26	-	hsa-mir-26a-5p	X	X	CDK6	EZH2, FRAT2, LEF1, JAG1, PPP3R1, VANGL2, PPP3CB, ABL2, PLCB1, CREBBP, TCF7L2, GRB10 PPP2R5A, EP300, CAMK2A, SLA2, CTNNBIP1, SOX17, GSK3B, KDM6A, KMT2C, WNT5A, SOCS6 TBLXR1, HOXD4, CCND2, NRAS, ROCK1, NLK, SAP30, APC, ST3GAL6, GRAP2	(20,45)
mir-28	-	hsa-mir-151a-5p	X	X	-	-	(19)
mir-29	hsa-mir-29b-1 hsa-mir-29a	hsa-mir-29a-3p	X	X	DNMT3B, CDK6, DPYSL3, ZBTB46	TNFRM236, FRAT2, FOXO3, PIK3R1, FZD4, CCND2, CAMK2G, MAFB, RAR8, GRAP2, FZD5, AKT3, DAAM2, CTNNBIP1, VANGL1, DTX4, MAPK10, NOTCH2, YY1, CNOT6, PRICKLE2, LRP6, HEYL, NCOA3, NFATC3, DAAM1, NRAS, EED, GSK3B, WNT10B, WNT8B, NFAT5, MAPK8, PPARC, NFATC4, FOSL1, GAB2, PPP2CA, ARRB1, PIK3CA, APC	(20,46,47)
mir-29	hsa-mir-29b-1 hsa-mir-29a	hsa-mir-29b-3p	X	X	DNMT3B, CDK6, DPYSL3, ZBTB46	TNFRM236, FRAT2, FOXO3, PIK3R1, FZD4, CCND2, CAMK2G, MAFB, RAR8, GRAP2, FZD5, AKT3, DAAM2, CTNNBIP1, VANGL1, DTX4, MAPK10, NOTCH2, YY1, CNOT6, PRICKLE2, LRP6, HEYL, NCOA3, NFATC3, DAAM1, NRAS, EED, GSK3B, WNT10B, WNT8B, NFAT5, MAPK8, PPARC, NFATC4, FOSL1, GAB2, PPP2CA, ARRB1, PIK3CA, APC	(20,46,47)

mir-29	hsa-mir-29b-2 hsa-mir-29c	hsa-miR-29c-3p	X	X					DNMT3B, CDK6, DPYSL3, ZBTB46	HDAC4, TMEM236, FRAT2, FOXO3, PIK3R1, FZD4, CCND2, CAMK2G, MAFB, RARB, GRAP2, FZD5, AKT3, DAAM2, CTNNBIP1, VANG1, DTX4, MAPK10, NOTCH2, YY1, CNOT6, PRICKLE2, LRP6, HEYL, NCOA3, NFATC3, DAAMI, NRAS, EED, GSK3B, WNT10B, WNT8B, NFAT5, MAPK8, PPAR, NFATC4, FOSL1, GAB2, PPP2CA, ARRB1, PIK3CA, APC	(20,48)
mir-30	-	hsa-miR-30a-5p	X	X					-	MYC, EED, RARB, HOXA1, FZD3, RARG, PPP3CA, SOCS6, CSNK1A1, SOS1, SAP30, CAMK2D, SH2B3, PSEN2, NFAT5, BCL2L11, KMT2C, GRR10, TCF7, PPP3CB, NFATC3, NCOA3, ABL2, MAPK8, PRICKLE1, LRP6, CNOT6, SMAD2, PPP3R1, FZD2, FOXO3, HOXA2, MAP3K7, PPP2R5E, ROCK2, NFATC2, KRAS, YY1, TBLXR1, NOTCH1, WNT7B, TBL1X, KMT2D, NLK, CSNK2A1	(20,49)
mir-30	hsa-mir-30d hsa-mir-30b	hsa-miR-30b-5p	X	X					-	MYC, EED, RARB, HOXA1, FZD3, RARG, PPP3CA, SOCS6, CSNK1A1, SOS1, SAP30, CAMK2D, SH2B3, PSEN2, NFAT5, BCL2L11, KMT2C, GRR10, TCF7, PPP3CB, NFATC3, NCOA3, ABL2, MAPK8, PRICKLE1, LRP6, CNOT6, SMAD2, PPP3R1, FZD2, FOXO3, HOXA2, MAP3K7, PPP2R5E, ROCK2, NFATC2, KRAS, YY1, TBLXR1, NOTCH1, WNT7B, TBL1X, KMT2D, NLK, CSNK2A1	(19)
mir-30	hsa-mir-30e hsa-mir-30c-1	hsa-miR-30e-5p	X	X					-	MYC, EED, RARB, HOXA1, FZD3, RARG, PPP3CA, SOCS6, CSNK1A1, SOS1, SAP30, CAMK2D, SH2B3, PSEN2, NFAT5, BCL2L11, KMT2C, GRR10, TCF7, PPP3CB, NFATC3, NCOA3, ABL2, MAPK8, PRICKLE1, LRP6, CNOT6, SMAD2, PPP3R1, FZD2, FOXO3, HOXA2, MAP3K7, PPP2R5E, ROCK2, NFATC2, KRAS, YY1, TBLXR1, NOTCH1, WNT7B, TBL1X, KMT2D, NLK, CSNK2A1	(50)
mir-34	-	hsa-miR-34a-5p	X	X					CDK6, ZBTB46	FOSL1, DLL1, LEF1, NOTCH1, ROCK1, NOTCH2, YY1, DAAM1, JAG1, PRKACB, KMT2D, PPP3R1, CCND1, RARB, CNOT6, GRAP2, SMAD4, TBL1XR1, WNT1	(20,31)
mir-34	hsa-mir-34b hsa-mir-34c	hsa-miR-34b-5p	X	X					SOCS2, CDK6, EMP1, LAPTM4B, ZBTB46	Sirt1 HDAC1, ZNF281, GABRA3, CREB, DLL1, DKK1, POLR2G, MYC, MAPK10, C2ORF15, MAP3K7, CBL, EP300, FZD5, NCOR1, GRR2, NOTCH1, RBBP5, SKP1, SOCS2, RHOA, RXRA, DAAMI, EGR2, C2orf15, GSK3B, WNT5B, PPP3R2, HOXD3, HOXB3, RARA, PPP3CA, PRKCA, VANG1, JAG1, CTNNB1, VANGL2, DAAM2, HEYL, GRR10, BCL2L11, LRP6, NOTCH2, CCND2, WNT2B, PRKX, CNOT6, CTNNBIP1, GOLGA6L9, SH2B3, GOLGA6L9, SMAD4, PRICKLE1, PPP2R5A, RBBP4, SMAD2, C15orf37, C15orf37, BTRC, POLR2F, GRAP2, UBB, RBBP7, ROCK1, NFAT5, FZD4, KMT2D,	(20,23,51)

							<i>CTBP2, NCOA3, RPS27A, EED, PIAS2, NKD1, PKNOX1, PAGR1, SLA, FZD8, PPP2R1A</i>	
mir-34	hsa-mir-34b hsa-mir-34c	hsa-mir-34c-5p	X	X	<i>SOCS2, CDK6, EMP1, LAPTM4B, ZBTB46</i>	<i>CDK6, DLL1, DKK1, POLR2G, MYC, MAPK10, C2ORF15, MAP3K7, CBL, EP300, FZD5, NCOR1, GRB2, NOTCH1, RBBP5, SKP1, SOCS2, RHOA, RXRA, DAAM1, EGR2, C2orf15, GSK3B, WNT5B, PPP3R2, HOXD3, HOXB3, RARA, PPP3CA, PRKCA, VANGL1, JAG1, CTNNB1, VANGL2, DAAM2, HEYL, GRB10, BCL2L11, LRP6, NOTCH2, CCND2, WNT2B, PRKX, CNOT6, CTNNB1P1, GOLGA6L9, SH2B3, GOLGA6L9, SMAD4, PRICKLE1, PPP2R5A, RBBP4, SMAD2, C15ORF37, BTRC, POLR2F, GRAP2, UBB, RBBP7, ROCK1, NFAT5, FZD4, KMT2D, CTBP2, NCOA3, RPS27A, EED, PIAS2, NKD1, PKNOX1, PAGR1, SLA, FZD8, PPP2R1A</i>	(20,23)	
mir-126	-	hsa-mir-126-3p	X	X	-	<i>LRP6</i>	(31)	
mir-126	-	hsa-mir-126-5p	X	X	-	<i>LRP6</i>	(31)	
mir-128	-	hsa-mir-128-3p	X	X	<i>LAPTM4B</i>	<i>PRKX, VANGL1, VANGL2, SOCS6, JAG1, CACYPB, ABL2, DVL2, DTX4, GRB2, WNT3A, CNOT6, PIK3R1, PRICKLE1, DTX1, MAPK10, GSK3B, AXIN1, DKK2, KMT2C, FZD3, RARA, SOS1, PSEN1, NFAT5, SUZ12, LRP6, SFRP1, RXRA, SMAD2, PIK3CA, PAX6</i>	(31,35,52)	
mir-132	hsa-mir-212 hsa-mir-132	hsa-mir-132-3p	X	X	<i>SOCS2, DPYSL3</i>	<i>SOCS2, EP300, PPP2R5C, PPP2CB, SMAD2, TCF7L1, DAAM1, NFATC2, SOS1, FOXO3, PPP2R5E, TCF7L2, PPP3CA, MEIS1, AKT3, PRICKLE2, GSK3B, PIK3CA, NFAT5, ROCK1, CHD8, NLK, NCOR1</i>	(20,23)	
mir-133	hsa-mir-1-2 hsa-mir-133a-1	hsa-mir-133a-3p	X	X	<i>SOCS2</i>	<i>CTBP2, PPP2R5D, KAT2A, PPP2CA, RBBP4, RARB, DAAM2, PPP2CB, CAMK2G, ABL2, MEIS1, SOCS2, PSEN1, NFAT5, ARRB1, SENP2</i>	(53,54)	
mir-139	-	hsa-mir-139-5p	X	X	<i>SOCS2, CDK6</i>	<i>HOXB2, CAMK2D, JUN, PPP2CA, SOCS2, FZD3, MAPK8, ROCK2, DVL1, PRKCA, ROCK1, PTPRJ, NOTCH1, CCND2, CTNNB1, KMT2D, NFAT5</i>	(55,56)	
mir-140	-	hsa-mir-140-5p	X	X	-	<i>WNT9A, EGR2, SIAH1, JAG1, NLK, CTCE, NFAT5, SMAD2, PAX6, WNT1, SAP30</i>	(57)	

mir-142	hsa-mir-4736 hsa-mir-142	hsa-miR-142-3p	X	X	-	RAC1, APC, KDM6A, RARG, TBL1X, SKP1, PLCB1, ROCK2, PPP3CA, SOCS6, ABL2, TBL1XR1, MEIS1, PPP3R1, VANGL1	(20,58)
mir-150	-	hsa-miR-150-5p	X	X	-	NOTCH3, SKP1, TP53, EGR2, PSEN1, PRICKLE2, CTNNB1, PPP2CB, EP300, CBL, CSNK1A1, CAMK2G, APC, WNT2B, FZD4, CCND2, PRKCA, ROCK1, NFATC3, AKT3, FBXW11, NOTCH3, GSK3B, ST3GAL6	(59,60)
mir-155	-	hsa-miR-155-5p	X	X	-	CSNK1A1, TCF7L2, KRAS, MEIS1, FOXO3, MAP3K7, PIK3CA, MAFB, CHD8, SOCS6, SLA, CBL, PTPRJ, APC, PIK3R1, GSK3B, SMAD2, NFAT5, SOS1, FZD5	(20,61)
mir-181	hsa-mir-181a-2 hsa-mir-181b-2	hsa-miR-181a-5p	X	X	SOCS2	RBBP7, HOXD1, HOXA1, SLA, KRAS, TCF7L2, BCL2L11, SH2B3, PPP3R1, WNT9A, HOXB4, GRB10, AKT3, TBL1XR1, PRICKLE2, WIF1, EED, YY1, SOS1, SOCS2, NFATC2, SFRP4, TBL1X, CAMK2G, KMT2C, NRAS, SENP2, NFAT5, CSNK1A1, NOTCH2, PPP2R5E, LRP6, NLK, PKNOX1, SMAD2, VANGL1, MAPK8, PBX1	(20,62)
mir-181	hsa-mir-181a-1 hsa-mir-181b-1	hsa-miR-181b-5p	X	X	SOCS2	RBBP7, HOXD1, HOXA1, SLA, KRAS, TCF7L2, BCL2L11, SH2B3, PPP3R1, WNT9A, HOXB4, GRB10, AKT3, TBL1XR1, PRICKLE2, WIF1, EED, YY1, SOS1, SOCS2, NFATC2, SFRP4, TBL1X, CAMK2G, KMT2C, NRAS, SENP2, NFAT5, CSNK1A1, NOTCH2, PPP2R5E, LRP6, NLK, PKNOX1, SMAD2, VANGL1, MAPK8, PBX1	(20,62)
mir-181	hsa-mir-181c hsa-mir-181d	hsa-miR-181c-5p	X	X	SOCS2	RBBP7, HOXD1, HOXA1, SLA, KRAS, TCF7L2, BCL2L11, SH2B3, PPP3R1, WNT9A, HOXB4, GRB10, AKT3, TBL1XR1, PRICKLE2, WIF1, EED, YY1, SOS1, SOCS2, NFATC2, SFRP4, TBL1X, CAMK2G, KMT2C, NRAS, SENP2, NFAT5, CSNK1A1, NOTCH2, PPP2R5E, LRP6, NLK, PKNOX1, SMAD2, VANGL1, MAPK8, PBX1	(20,62)
mir-183	hsa-mir-183 hsa-mir-96 hsa-mir-182	hsa-miR-183-5p	X	X	-	PSEN2, PPP2CA, TCF7L2, PPP2CB, PPP2R5C, LRP6, SMAD4, SOCS6, VANGL1, PRKACB, DAAMI1, PRKCA, CAMK2D, NRAS, CBL, CCND2, CSNK2A1, PLCB4	(20,63)
mir-190	-	hsa-miR-190a-5p	X	X	-	SMAD2, CDKN1B, CXXC4, ROCK1, PPP3R1, PAX6, PLCB4, CCND2	(64)
mir-192	hsa-mir-6750 hsa-mir-	hsa-miR-192-5p	X	X	-	YY1, CTNNBIP1, CTCF, PRKACB, NCOA3, NFAT5, CBL	(20,65,66)

	194-2 hsa-mir-192							
mir-193	-	hsa-mir-193a-3p	X	X	CD34	CD34, <i>CKIT</i> , <i>BEX3</i> , <i>KRAS</i> , <i>CCND1</i> , <i>PSEN1</i> , <i>CNOT6</i> , <i>PPP2R5C</i> , <i>SIAH1</i> , <i>CXCC4</i> , <i>TBL1XR1</i> , <i>AJUBA</i> , <i>MAPK10</i> , <i>DAAM12</i> , <i>EED</i> , <i>SKP1</i>	(23)	
mir-193	hsa-mir-193b hsa-mir-365a	hsa-mir-193b-3p	X	X	CD34	<i>KRAS</i> , <i>CCND1</i> , <i>PSEN1</i> , <i>CNOT6</i> , <i>PPP2R5C</i> , <i>SIAH1</i> , <i>CXCC4</i> , <i>TBL1XR1</i> , <i>AJUBA</i> , <i>MAPK10</i> , <i>DAAM12</i> , <i>EED</i> , <i>SKP1</i>	(20,67)	
mir-194	hsa-mir-194-1 hsa-mir-215	hsa-mir-194-5p	X	X	SOC52	<i>RBX1</i> , <i>TCF7L2</i> , <i>SOC52</i> , <i>CAMK2G</i> , <i>AKT2</i> , <i>SOX17</i> , <i>CHD8</i> , <i>RBBP4</i> , <i>DAAM1</i> , <i>ROCK2</i> , <i>KMT2C</i> , <i>CSNK2A1</i> , <i>STAT5B</i> , <i>PPP3R1</i> , <i>NFAT5</i> , <i>RARA</i> , <i>FZD4</i> , <i>FZD5</i>	(20,68)	
mir-196	-	hsa-mir-196a-5p	X	X	SOC52	<i>HOX</i> , <i>NRAS</i> , <i>CDKN1B</i> , <i>HOXB1</i> , <i>SOC52</i> , <i>ROCK1</i> , <i>POLR2D</i> , <i>PBX1</i> , <i>YY1</i> , <i>PSENNEN</i> , <i>CCND2</i> , <i>ABL2</i> , <i>PRICKLE1</i> , <i>MAPK8</i>	(19,20)	
mir-196	-	hsa-mir-196b-5p	X	X	SOC52	<i>HOX</i> , <i>MYC</i> , <i>NRAS</i> , <i>CDKN1B</i> , <i>HOXB1</i> , <i>SOC52</i> , <i>ROCK1</i> , <i>POLR2D</i> , <i>PBX1</i> , <i>YY1</i> , <i>PSENNEN</i> , <i>CCND2</i> , <i>ABL2</i> , <i>PRICKLE1</i> , <i>MAPK8</i>	(19)	
mir-199	-	hsa-mir-199a-3p	X	X	-	<i>NLK</i> , <i>PPP2R5E</i> , <i>KDM6A</i> , <i>WNT9A</i> , <i>MAPK8</i> , <i>CHP1</i> , <i>PLCB1</i> , <i>FBXW11</i> , <i>CSNK1A1</i> , <i>ABL2</i> , <i>SUZ12</i> , <i>VANGL1</i>	(20,69)	
mir-199	-	hsa-mir-199b-5p	X	X	-	<i>FZD6</i> , <i>GRB10</i> , <i>FZD4</i> , <i>WNT2</i> , <i>CDKN1B</i> , <i>GSK3B</i> , <i>NLK</i> , <i>RBBP4</i> , <i>BTRC</i> , <i>ROCK1</i> , <i>JAG1</i> , <i>WNT7B</i> , <i>CB1</i> , <i>NCOR1</i> , <i>CNOT6</i> , <i>TBL1XR1</i> , <i>MAPK8</i>	(70)	
mir-203	hsa-mir-203a hsa-mir-203b	hsa-mir-203a	X	X	ZBTB46	<i>ABL1</i> , <i>BGR::ABL1</i> , <i>DKK2</i> , <i>AKT3</i> , <i>CUL1</i> , <i>MAPK8</i> , <i>PRKCB</i> , <i>SOC56</i> , <i>SFRP1</i> , <i>PRICKLE2</i> , <i>KMT2C</i> , <i>EP300</i> , <i>APC</i> , <i>AXIN1</i> , <i>HES1</i> , <i>ABL2</i> , <i>WNT2B</i> , <i>MEIS1</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>NOTCH2</i> , <i>CSNK1A1</i> , <i>PRKCA</i> , <i>HEY1</i> , <i>HOXD3</i> , <i>CTBP2</i> , <i>MAPK10</i> , <i>NKD1</i> , <i>SOS1</i> , <i>BTRC</i> , <i>NLK</i> , <i>DVL3</i>	(23)	
mir-221	hsa-mir-222 hsa-mir-221	hsa-mir-221-3p	X	X	-	<i>CDKN1B</i> , <i>PPP3R1</i> , <i>PIK3R1</i> , <i>SKP1</i> , <i>NLK</i> , <i>TCF7L2</i> , <i>DKK2</i> , <i>CTCF</i> , <i>AXIN2</i> , <i>NFATC3</i> , <i>KMT2C</i> , <i>GRB10</i> , <i>CB1</i> , <i>NFATC2</i> , <i>CHD8</i> , <i>MAPK10</i> , <i>CNOT6</i> , <i>FRA12</i> , <i>PPP2R5E</i> , <i>BCL2L11</i> , <i>NFAT5</i> , <i>MEIS1</i>	(20,71)	
mir-221	hsa-mir-222 hsa-mir-221	hsa-mir-222-3p	X	X	-	<i>CDKN1B</i> , <i>PPP3R1</i> , <i>PIK3R1</i> , <i>SKP1</i> , <i>NLK</i> , <i>TCF7L2</i> , <i>DKK2</i> , <i>CTCF</i> , <i>AXIN2</i> , <i>NFATC3</i> , <i>KMT2C</i> , <i>GRB10</i> , <i>CB1</i> , <i>NFATC2</i> , <i>CHD8</i> , <i>MAPK10</i> , <i>CNOT6</i> , <i>FRA12</i> , <i>PPP2R5E</i> , <i>BCL2L11</i> , <i>NFAT5</i> , <i>MEIS1</i>	(71)	

mir-221	hsa-mir-222 hsa-mir-221	hsa-miR-222-5p	X	-	SOCS2, CD34, C2ORF15, CDK6, C15ORF37, TMEM236, TMEM236	NLK, SOCS2, PPP2R5E, PRKX, AKT3, SFRP4, KDM6A, HOXB2, EP300, PPP3R1, JAG1, GRAP2, NRAS, AJUBA, PTPRJ, ROCK1, CSNK1A1, HOXD4, RBBP4, SH2B3, CACYBP, WNT9B, POLR2D, SOCS6, PPP3CB, CREBBP, PRKCB, MAML2, PRICKLE1, KRAS, PLCB1, ROCK2, CXC4, PIK3R1, MAPK8, APC, WNT9A, CAMK2D, ABL2, FZD3, RARA, KMT2C, FZD7, MAP3K7, NOTCH2, SMAD3, C2ORF15, SMAD2, FOXO3, TBL1XR1, PPP2R1B, WNT4, C15ORF37, PRKCA, CAMK2B, CTBP2, FBXW11, WNT5A, UBA52, FZD4, TMEM236, TMEM236, PIK3CA, VANGL1, ARRB1, RBBP5, NCOR1, DVL3, FZD1, PAX6, PPP3CC, PKNOX1, SKP1, FZD8, NKD1, PRKACB, PIAS2, UBC, HEYL, SAP30	(72)
mir-223	-	hsa-miR-223-3p	X	X	-	SIAH1, APC, FOXO3, FZD4, PRKACB, MAFB, SH2B3, RBBP4, KMT2C, PAX6, PKNOX1, E2F1	(21,23,52)
mir-290	hsa-mir-371a hsa-mir-371b hsa-mir-372 hsa-mir-373	hsa-miR-371a-3p	X	X	SOCS2, CDK6	WNT7B, POLR2D, MEIS1, WNT10A, POLR2K, WNT9B, PLCB2, SOCS2, CHP1, NFATC2, GRAP2, WNT2B, DLL1, PPARD, PRKCB, HOXB4, FOXO3, WNT3A, SOS1, NFATC1, PLCB4, PPP2R5C, PPP2CA, PIK3CA, VANGL1, AKT2, PBX1, PIAS2	(73)
mir-290	hsa-mir-371a hsa-mir-371b hsa-mir-372 hsa-mir-373	hsa-miR-372-3p	X	X	-	FZD6, PPP3R1, RBBP7, SMAD2, LEF1, CCND2, FZD3, CCND1, AJUBA, PRKACB, DKK1, HOXB3, ABL2, WNT9B, AKT1, CNOT6, TCF7L1, NCOA3, WNT9A, SUZ12, GAB2, ROCK2, CSNK1A1, BCL2L11, PSEN1, KMT2C, APC, FOXO3	(19)
mir-322	hsa-mir-424 hsa-mir-503 hsa-mir-542 hsa-mir-450a-2	hsa-miR-424-5p	X	X	CDK6, NYNRIN, ZBTB46	WNT3A, WNT7A, AKT3, CCND1, AXIN2, CCND2, DLL1, BTRC, WNT2B, CCND3, SOCS6, MAPK8, RARB, FLT3, ABL2, CHP1, WNT4, FOSL1, PPP2R5C, CTNNBIP1, FZD6, SIAH1, WIF1, LRP6, SMAD3, NKD1, EED, PIAS2, WNT10B, PIK3R1, FZD4, PPP2R1A, NOTCH2, PTPRJ, GRB10, HOXA3, KMT2D, NFATC3, KRAS, TBL1XR1, NFATC2, ROCK1, PPP2R1B, KMT2C, APC, SUZ12, ROCK2, GSK3B	(19,20)

	hsa-mir-450a-1 hsa-mir-450b						
mir-331	hsa-mir-331 hsa-mir-3685	hsa-mir-331-5p	X	X	SOCS2, CDK6, EMP1	KRAS, RBX1, POLR2K, C10orf220, SOCS2, PTPRJ, RHOA, DKK1, NRAS, WIF1, HOXB3, GOLGA6L9, LRP6, GOLGA6L9, C10orf220, ABL2, PPP3R2, TP53, SMAD3, SMAD2, SH2B3, PPP2R5E, WNT3, CBL, PPP2R5C, ROCK1, SMAD4, HOXD3, CCND2, CTBP2, SENP2, KMT2D, NFATC2, PRKGB, NKD1, FOXO3, SOS1, CDKN1B, VANGL1, PAX6, FZD5, DVL3, FZD8, HEYL, PPP2R1A, SAP30, NOTCH2, PIAS2, APC	(19,74)
mir-342	hsa-mir-151b hsa-mir-342	hsa-mir-342-3p	X	X	CDK6	EP300, CTBP2, CSK, AKT2, PPP2R5E, KMT2D, FZD5	(75)
mir-373	hsa-mir-371a hsa-mir-371b hsa-mir-372 hsa-mir-373	hsa-mir-373-3p	X	X	-	FZD6, PPP3R1, RBBP7, SMAD2, LEF1, CCND2, FZD3, CCND1, AUBA, PRKACB, DKK1, HOXB3, ABL2, WNT9B, AKT1, CNOT6, TCF7L1, NCOA3, WNT9A, SUZ12, GAB2, ROCK2, CSNK1A1, BCL2L11, PSEN1, KMT2C, APC, FOXO3	(76)
mir-425	hsa-mir-191 hsa-mir-425	hsa-mir-425-3p	X	X	-	RAC1, PRKCG, CSNK2A2, NFATC2, WNT7B, PBX1, FZD3, CCND2, APC, NOTCH2, WNT7B, PLCB1, WNT7A, CAMK2D, TBL1X, ARRB1, PIK3CA, AKT1, RBX1, PPP2R1A	(19,20)
mir-425	hsa-mir-191 hsa-mir-425	hsa-mir-425-5p	X	X	-	MEIS1, PPP2CB, CBL, FZD4, SMAD2, PPP3CA	(19)
mir-449	hsa-mir-449c hsa-mir-449b hsa-mir-449a	hsa-mir-449a	X	X	CDK6, ZBTB46	FOSL1, DLL1, LEF1, NOTCH1, ROCK1, NOTCH2, YY1, DAAM1, JAG1, PRKACB, KMT2D, PPP3R1, CCND1, RARB, CNOT6, GRAP2, SMAD4, TBL1XR1, WNT1	(51)

mir-449	hsa-mir-449c hsa-mir-449b hsa-mir-449a	hsa-miR-449b-5p	X	X	CDK6, ZBTB46	FOSL1, DLL1, LEF1, NOTCH1, ROCK1, NOTCH2, YY1, DAAM1, JAG1, PRKACB, KMT2D, PPP3R1, CCND1, RARB, CNOT6, GRAP2, SMAD4, TBL1XR1, WNT1	(51)
mir-450	hsa-mir-424 hsa-mir-503 hsa-mir-542 hsa-mir-450a-2 hsa-mir-450a-1 hsa-mir-450b	hsa-miR-450a-5p	X	-	-	-	(19)
mir-451	hsa-mir-4732 hsa-mir-144 hsa-mir-451b hsa-mir-451a	hsa-miR-451a	X	X	-	PRICKLE2	(77)
mir-542	hsa-mir-424 hsa-mir-503 hsa-mir-542 hsa-mir-450a-2 hsa-mir-450a-1 hsa-mir-450b	hsa-miR-542-5p	X	X	SOCS2	HOXD3, TCF7L2, TCF7L1, WNT9A, SOCS2, PRKACA, CUL1, FZD10, TBL1X, CSNK2A2, WNT10A, WNT7B, CCND3, DAAM1, PRKCA, BTRC, ABL2, NOTCH1, PBX1, GRAP2, PPP2R1A, NCOR1	(19)

mir-545	hsa-mir-374a hsa-mir-545	hsa-mir-545-3p	X	X	CD34, CDK6, EMP1, LAPTM4B, NNNRIN, ARHGAP22, ZBTB46	CAMK2D, MAP3K7, ABL2, FZD6, RBX1, PPP3R2, CHP2, MAPK8, TP53, PIAS2, FZD10, PTPN11, VANGL1, HOXD4, WNT7A, NRAS, CSNK1E, FZD3, SMAD4, PRKX, GRB2, FOXO3, CSNK1A1L, PSEN1, SOCS6, TBL1X, NFATC1, TCF7L2, RARG, CTNNB1, PIK3R1, CSNK1A1, NCOR1, PPP3R1, CCND1, PRKCA, LRP6, HOXD1, WNT9B, LFNIG, POLR2D, PPP3CA, NCOA3, CBL, CAMK2B, PLCB1, RBBP4, FZD4, HDAC3, CTNNBIP1, CAMK2G, RBBP5, CCND3, SYK, CXXC4, HOXD3, ROCK2, PCGF2, PTPRJ, DKK2, WNT5A, TMEM236, HOXA1, TMEM236, PRKCB, NFATC4, ROCK1, MAFB, UBB, AKT3, TBL1XR1, SMAD2, CTBP2, PPARC, YY1, BCL2L11, CAMK2A, FRAT2, GRB10, PLCB3, FZD2, MAPK9, NLK, ARRB1, VANGL2, TCF7L1, KMT2D, GAB2, WNT5B, PPP3CB, SMAD3, PRICKLE2, BTRC, KRAS, NKD1, NFAT5, JAG1, NFATC2, STAT5B, CNOT6, NOTCH2, AKT1, PPP2CA, SKP1, GRAP2, FZD8, SAP30, PBX1, HOXB4, HEYL	(19)
mir-708	-	hsa-mir-708-5p	X	X	-	HOXB3, RARG, NRAS, GSK3B, FOXO3, RBBP5, CBL	(19)
mir-1290	-	hsa-mir-1290		X	SOCS2, CD34, CDK6, EMP1, DPYSL3	CER1, FZD3, GSK3B, CTBP1, CAMK2A, NRAS, CAMK2D, RBBP4, CSNK2A1, SFRP4, FBXW11, WNT7A, PIK3CA, RUVBL1, PLCB1, SMAD3, NFAT5, WNT7B, DVL3, CDKN1B, PPP3CB, HOXD1, CXXC4, PRKX, SOCS2, FOSL1, KRAS, MAP3K7, NKD1, LRP6, PAX6, PRKCB, KMT2D, AXIN2, CREBBP, PRKACA, SOS1, PPP3R1, SUZ12, TCF7, NCOR1, VANGL2, SLA2, NFATC2, FZD4, GAB2, AKT3, PTPRJ, SMAD4, PLCB4, NOTCH3, NOTCH1, HES1, CNOT6, WNT5A, C10orf220, C10orf220, PRICKLE2, WNT4, NOTCH2, PSEN1, NLK, CACYBP, SKP1, C15orf37, C15orf37, LEF1, FZD5, SMAD2, AJUBA, PPP3CC, RBBP5, CSNK1A1, POLR2E, PKNOX1, UBC, HEYL, PPP2R1A	(78)

Supplementary Table 2. Sequence of the 96 miRNA genes included in the panel.

microRNA Name	Target sequence	LNA™ PCR primer set, Product No
hsa-let-7a-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	205727
hsa-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU	204750
hsa-let-7c-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	204767
hsa-let-7d-5p	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU	204124
hsa-miR-140-5p	CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG	204540
hsa-miR-545-3p	UCAGCAAACAUUUUAUUGUGUGC	206087
hsa-let-7g-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU	204565
hsa-let-7i-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUU	204394
hsa-miR-181c-5p	AACAUUCAACCGUCGGUGAGU	204683
hsa-miR-100-5p	AACCCGUAGAUCGGAACUUGUG	205689
hsa-let-7f-5p	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	204359
UniSp3 IPC		n/a
hsa-miR-193a-3p	AACUGGCCUACAAAGUCCCAGU	204591
hsa-miR-342-3p	UCUCACACAGAAAUCGCACCCGU	205625
hsa-miR-132-3p	UAACAGUCUACAGCCAUGGUCG	206035
hsa-miR-222-3p	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	204551
hsa-miR-222-5p	CUCAGUAGCCAGUGUAGAUCU	204314
hsa-miR-542-5p	UCGGGGAUCAUCAUGUCACGAGA	204198
hsa-miR-194-5p	UGUAAACAGCAACUCCAUGUGGA	204080
hsa-miR-125b-5p	UCCCUGAGACCCUAAAUUGUGA	205713
hsa-miR-126-3p	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG	204227
hsa-miR-141-3p	UAACACUGUCUGGUAAGAUGG	204504
hsa-miR-193b-3p	AACUGGCCUCAAAGUCCCAGU	204226
UniSp6 CP		n/a
hsa-miR-10b-5p	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG	205637
hsa-miR-128-3p	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU	205995
hsa-miR-449a	UGGCAGUGUAUUGUUAGCUGGU	204481
hsa-miR-371a-3p	AAGUGCCGCCAUCUUUUGAGUGU	204299
hsa-miR-151a-5p	UCGAGGAGCUCACAGUCUAGU	204007
hsa-miR-16-5p	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	205702
hsa-miR-26a-5p	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	206023
hsa-miR-150-5p	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG	204660
hsa-miR-155-5p	UUAAUGCUAAUCGUGAUAGGGGU	204308
hsa-miR-15a-5p	UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG	204066
hsa-miR-15b-5p	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA	204243
UniSp3 IPC		n/a
hsa-miR-196b-5p	UAGGUAGUUUCCUGUUGUUGGG	204555
hsa-miR-17-5p	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	204771
hsa-miR-181a-5p	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	206081
hsa-miR-181b-5p	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU	204530
hsa-miR-372-3p	AAAGUCGUCGACAUUUGAGCGU	204137
hsa-miR-133a-3p	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG	204788
hsa-miR-373-3p	GAAGUGCUUCGAUUUUGGGGUGU	204604
hsa-miR-199b-5p	CCCAGUGUUUAGACUAUCUGUUC	204152
hsa-miR-18a-5p	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG	204207
hsa-miR-191-5p	CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG	204306
hsa-miR-708-5p	AAGGAGCUUACAAUCUAGCUGGG	204490
U6 snRNA		203907
hsa-miR-199a-3p	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA	204536

hsa-miR-195-5p	UAGCAGCACAGAAAUAUUGGC	205869
hsa-miR-196a-5p	UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGG	204386
hsa-miR-19a-3p	UGUGCAAUUCUAUGCAAACUGA	205862
hsa-miR-19b-3p	UGUGCAAUCCAUGCAAACUGA	204450
hsa-miR-20a-5p	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG	204292
hsa-miR-200b-3p	UAAUACUGCCUGGUAUUGAUGA	206071
hsa-miR-200c-3p	UAAUACUGCCGGGUAUUGAUGGA	204482
hsa-miR-30a-5p	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG	205695
hsa-miR-10a-5p	UACCCUGUAGAUCGAAUUUGUG	204778
hsa-miR-17-3p	ACUGCAGUGAAGGCACUUGUAG	206008
hsa-miR-425-5p	AAUGACACGAUCACUCCCGUUGA	204337
hsa-miR-1290	UGGAUUUUUGGAUCAGGGA	2118634
hsa-miR-20b-5p	CAAAGUGCUCUAUAGUGCAGGUAG	204755
hsa-miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	204230
hsa-miR-451a	AAACCGUUACCAUUCUGAGUU	204734
hsa-miR-126-5p	CAUUUUUACUUUUUGGUACGCG	206010
hsa-miR-30e-5p	UGUAAACAUCUUGACUGGAAG	204714
hsa-miR-92a-3p	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU	204258
hsa-miR-425-3p	AUCGGGAAUGUCGUGUCCGCC	204038
hsa-miR-221-3p	AGCUACAUUGUCUGUGGGUUUC	204532
hsa-miR-139-5p	UCUACAGUGCACGUGUCUCCAGU	205874
hsa-miR-223-3p	UGUCAGUUUGUCAAUACCCCA	205986
hsa-miR-449b-5p	AGGCAGUGUAUUGUUAGCUGGC	204751
hsa-miR-203a	GUGAAAUGUUUAGGACCACUAG	205914
hsa-miR-24-3p	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	204260
hsa-miR-10a-3p	CAAUUUCGUAUCUAGGGGAUA	205688
hsa-miR-34c-5p	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC	205659
hsa-miR-331-5p	CUAGGUAUGGUCCAGGGAUCC	204423
hsa-miR-30b-5p	UGUAAACAUCCUACACUCAGCU	204765
hsa-miR-183-5p	UAUGGCACUGGUAGAAUUCACU	206030
hsa-miR-29a-3p	UAGACCAUCUGAAAUCGGUUA	204698
hsa-miR-29b-3p	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	204679
hsa-miR-29c-3p	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA	204729
hsa-miR-22-3p	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU	204606
hsa-miR-34b-5p	UAGGCAGUGUCAUUAGCUGAUUG	204424
hsa-miR-190a-5p	UGAUAGUUUGAUUAUUUAGGU	204763
hsa-miR-34a-5p	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	204486
hsa-miR-450a-5p	UUUUGCGAUGUGUUCUAAUUAU	206085
hsa-miR-142-3p	UGUAGUGUUCCUACUUUAUGGA	204291
hsa-miR-9-5p	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	204513
hsa-let-7e-5p	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU	205711
hsa-miR-92b-3p	UAUUGCACUCGUCCCGGCCUCC	204384
hsa-miR-424-5p	CAGCAGCAAUUCAUGUUUUGAA	204736
hsa-miR-99a-5p	AACCCGUAGAUCCGAUCUUGUG	204521
hsa-miR-192-5p	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	204099
hsa-miR-103a-3p	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	204063
hsa-miR-103a-3p	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	204063

Supplementary Table 3. Main clinic and biological characteristics of 39 AML patients classified within P1AML or P2AML groups according to their miRNA expression.

	P1AML <i>n</i> =14	P2AML <i>n</i> =25	<i>p</i> -value
Gender (<i>n</i> =39)			0.74
Female (<i>n</i> =14)	6 (42.9%)	8 (32.0%)	
Male (<i>n</i> =25)	8 (57.1%)	17 (68.0%)	
Age, years (<i>n</i> =39)			
Median [range]	2.7 [0.1;17.0]	3.5 [0.2;16.4]	0.48
[0,2) years old	5 (35.7%)	7 (28.0%)	
[2,10) years old	5 (35.7%)	10 (40.0%)	0.96
[10,15) years old	2 (14.3%)	4 (16.0%)	
[15,19) years old	2 (14.3%)	4 (16.0%)	
WBC count, x10⁹/L [range] (<i>n</i> =39)	11.9 [3.5;146.0]	9.6 [0.6;253.0]	1.00
CNS disease (<i>n</i> =38)			0.70
Not infiltrated (<i>n</i> =29)	10 (71.4%)	19 (79.2%)	
Infiltrated (<i>n</i> =9)	4 (28.6%)	5 (20.8%)	
t(15;17)(q22;q12) PML::RARA (<i>n</i> =39)	0/14 (0.0%)	4/25 (16.0%)	0.28
t(8;21)(q22;q22.1) RUNX1::RUNX1T1 (<i>n</i> =39)	2/14 (14.3%)	2/25 (8.0%)	0.61
inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1;q22) CBFβ::MYH11 (<i>n</i> =39)	1/14 (7.1%)	3/25 (12.0%)	1.00
KMT2A+ (<i>n</i> =39)	6/14 (42.9%)	10/25 (40.0%)	1.00
t(9;11)(p22;q23) (<i>n</i> =39)	2/14 (14.3%)	6/25 (24.0%)	0.69
t(10;11)(p11.2;q23) (<i>n</i> =39)	1/14 (7.1%)	1/25 (4.0%)	1.00
t(11;19)(q23;p13.1) (<i>n</i> =39)	1/14 (7.1%)	1/25 (4.0%)	1.00
AML-Other karyotypes (<i>n</i> =39)	5/14 (35.7%)	6/25 (24.0%)	0.48
FLT3 ITD mutation (<i>n</i> =38)	1/14 (7.1%)	4/24 (16.7%)	0.63
NPM1 mutation (<i>n</i> =15)	3/7 (42.9%)	0/8 (0.0%)	0.077
MRD≥0.1% at the end of induction (<i>n</i> =29)	3/12 (25.0%)	3/17 (17.6%)	0.67
EFS (<i>n</i> =39)			0.0027
5-year estimate (95% CI)	42.9% (23.4%-78.5%)	87.3% (74.8%-100.0%)	
10-year estimate (95% CI)	42.9% (23.4%-78.5%)	87.3% (74.8%-100.0%)	
OS (<i>n</i> =39)			0.024
5-year estimate (95% CI)	64.3% (43.5%-95.0%)	90.9% (79.7%-100.0%)	
10-year estimate (95% CI)	53.6% (31.5%-91.0%)	90.9% (79.7%-100.0%)	

WBC: white blood cell. CNS: Central Nervous System. ITD: internal tandem duplication. CI: confidence interval. *AML-other karyotypes include patients with a normal karyotype and two with a complex karyotype. EFS: event-free survival. OS: overall survival.

Supplementary Table 4. List of pathways targeted by the 24 selected miRNAs and their p-value.

KEGG pathway*	p-value	#genes	#miRNAs
Proteoglycans in cancer	0	131	16
Hippo signalling pathway	0	91	12
Hepatitis B	0	92	11
Pathways in cancer	5.55E-10	213	11
Adherens junction	5.93E-05	52	11
Lysine degradation	1.11E-10	28	10
p53 signalling pathway	3.61E-04	45	10
Viral carcinogenesis	0	117	9
Cell cycle	2.53E-06	80	9
Prostate cancer	9.28E-01	58	9
Glioma	3.88E-07	35	8
Chronic myeloid leukaemia	1.48E-04	48	8
Bacterial invasion of epithelial cells	1.43E-01	50	8
TGF-beta signalling pathway	3.22E-01	45	8
Colorectal cancer	5.69E-04	40	7
FoxO signalling pathway	4.92E-02	68	7
Transcriptional misregulation in cancer	1.29E-01	95	7
Bladder cancer	2.00E-01	29	7
Small cell lung cancer	2.07E+00	53	7
Protein processing in the endoplasmic reticulum	0.0002295268	84	7
ECM-receptor interaction	0	26	6
Renal cell carcinoma	1.27E+01	42	6
Estrogen signalling pathway	0.0004439923	49	6
PI3K-Akt signalling pathway	0.001097869	132	6
Oocyte meiosis	2.03E-02	50	5
Thyroid hormone signalling pathway	4.72E-02	65	5
Endometrial cancer	0.0004592499	28	5
Thyroid cancer	0.01371944	17	5
MAPK signalling pathway	0.04221966	97	5
Prion diseases	0	8	4
Pancreatic cancer	3.34E+00	38	4
Fatty acid metabolism	4.42E+01	22	4
Focal adhesion	0.0002528746	88	4
Prolactin signalling pathway	0.0002609678	31	4
Melanoma	0.004557802	27	4
Ubiquitin mediated proteolysis	0.004623076	65	4
Epstein-Barr virus infection	0.01771869	85	4
Fatty acid biosynthesis	0	5	3
Non-small cell lung cancer	0.005083879	29	3
Central carbon metabolism in cancer	0.0291216	26	3
Endocytosis	0.03471336	75	3
Mucin-type O-Glycan biosynthesis	0.03962723	8	3
Signalling pathways regulating pluripotency of stem cells	0.00580632	50	2
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	0.03114162	14	2
Neurotrophin signalling pathway	0.04005991	46	2

*KEGG pathway (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) is a collection of pathway maps representing the molecular interaction, reaction and relation networks for metabolism, genetic information processing cellular processes, organismal systems, human diseases and drug development.

Supplementary Table 5. Cox model for univariate analysis of HSJD cohort.

	EFS			OS		
	HR	p-value	p-value global	HR	p-value	p-value global
Protocol						
SHOP AML	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
NOPHO	1.38 [0.33;4.52]	0.62	0.68	1.55 [0.28;6.47]	0.58	0.78
PETHEMA LPA	0.44 [0.00;3.49]	0.52		0.63 [0.00;5.35]	0.74	
Age. years						
[0,2) years old	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
[2,10) years old	0.11 [0.01;0.88]	0.038	0.050	0.20 [0.02;1.11]	0.066	0.085
[10,15) years old	0.88 [0.22;3.55]	0.86		1.40 [0.31;5.76]	0.64	
[15,19) years old	0.23 [0.03;1.93]	0.18		0.18 [0.00;1.65]	0.15	
MRD at EOI						
<0.1%	Ref.	Ref.	-	Ref.	Ref.	-
≥0.1%	1.92 [0.37;9.97]	0.44		3.28 [0.55;19.74]	0.19	
Genetics						
AML-Other	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
Inv(16) + t(8;21)	0.27 [0.04;1.40]	0.134		0.26 [0.02;2.01]	0.19	
<i>KMT2A</i> + not t(9;11)	0.48 [0.10;2.28]	0.375		0.74 [0.14;4.54]	0.72	
<i>KMT2A</i> + t(9;11)	0.26 [0.04;1.35]	0.121	0.71	0.27 [0.02;2.04]	0.20	0.80
<i>NPM1</i> -/ <i>FLT3</i> <i>ITD</i> +	0.52 [0.00;5.46]	0.999		0.75 [0.01;9.30]	0.85	
<i>NPM1</i> +/ <i>FLT3</i> <i>ITD</i> -	0.72 [0.07;4.44]	0.617		0.81 [0.07;6.55]	0.85	
<i>NPM1</i> +/ <i>FLT3</i> <i>ITD</i> +	0.40 [0.00;4.19]	0.999		0.75 [0.01;9.30]	0.85	
t(15;17)	0.13 [0.00;1.40]	0.998		0.22 [0.00;2.80]	0.27	
24-miRNAs signature						
P2AML	Ref.	Ref.	-	Ref.	Ref.	-
P1AML	5.97 [1.58;22.54]	0.0084		5.26 [1.06;26.22]	0.043	
Genetic-based risk stratification						
Favourable	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
Intermediate	2.14 [0.41;11.05]	0.36	0.37	2.60 [0.27;25.03]	0.41	0.18
Adverse	3.25 [0.59;17.81]	0.17		5.92 [0.66;53.20]	0.11	

MRD+ at EOI: measurable residual disease at the end of induction. HR: hazard ratio. EFS: event-free survival. OS: overall survival.

Supplementary Table 6. Comparison between AML patients included in HSJD and TARGET cohorts.

	HSJD <i>n</i> =39	TARGET <i>n</i> =447	<i>p</i> -value
Gender (<i>n</i> =486)			0.16
Female (<i>n</i> =233)	14 (35.9%)	219 (49.0%)	
Male (<i>n</i> =253)	25 (64.1%)	228 (51.0%)	
Age, years (<i>n</i> =486)			
Median [range]	3.4 [0.1;17.0]	9.8 [0.0;18.9]	0.0038
[0,2) years old (<i>n</i> =94)	12 (30.8%)	82 (18.3%)	
[2,10) years old (<i>n</i> =159)	15 (38.5%)	144 (32.2%)	0.11
[10,15) years old (<i>n</i> =130)	6 (15.4%)	124 (27.7%)	
[15,19) years old (<i>n</i> =103)	6 (15.4%)	97 (21.7%)	
CNS disease (<i>n</i> =485)			0.0034
Not infiltrated (<i>n</i> =442)	29 (76.3%)	413 (92.4%)	
Infiltrated (<i>n</i> =43)	9 (23.7%)	34 (7.6%)	
t(15;17)(q22;q12) PML::RARA (<i>n</i> =39)	4/39 (10.3%)	-	-
t(8;21)(q22;q22.1) RUNX1::RUNX1T1 (<i>n</i> =472)	4/39 (10.3%)	66/433 (15.2%)	0.55
inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1;q22) CBFβ::MYH11 (<i>n</i> =472)	4/39 (10.3%)	57/433 (13.2%)	0.79
KMT2A+ (<i>n</i> =472)	16/39 (41.0%)	59/433 (13.6%)	<0.0001
t(9;11)(p22;q23) (<i>n</i> =468)	8/39 (20.5%)	25/429 (5.8%)	0.0033
t(10;11)(p11.2;q23) (<i>n</i> =472)	2/39 (5.1%)	8/433 (1.8%)	0.20
t(11;19)(q23;p13.1) (<i>n</i> =472)	2/39 (5.1%)	11/433 (2.5%)	0.29
t(6;11)(q27;q23) (<i>n</i> =472)	0/39 (0.0%)	7/433 (1.6%)	1.00
AML- Other karyotypes (<i>n</i> =472)	11/39 (28.2%)	240/433 (55.4%)	0.0020
FLT3 ITD mutation (<i>n</i> =484)	5/38 (13.2%)	93/446 (20.9%)	0.36
NPM1 mutation (<i>n</i> =457)	3/15 (20.0%)	38/442 (8.6%)	0.14
Protocol (<i>n</i> =486)			-
SHOP and PETHEMA AML 1996/2001/2002/2007	26 (66.7%)	-	
NOPHO AML 2012	9 (23.1%)	-	
PETHEMA LPA 2005/2012	4 (10.3%)	-	
AAML03P1	-	17 (3.8%)	
AAML0531	-	427 (95.5%)	
CCG2961	-	3 (0.7%)	
MRD≥0.1% at the end of induction (<i>n</i> =391)	6/29 (20.7%)	104/362 (28.7%)	0.48
EFS (<i>n</i> =486)			0.028
5-year estimate (95% CI)	70.4% (57.1%-86.8%)	51.2% (46.7%-56.1%)	
10-year estimate (95% CI)	70.4% (57.1%-86.8%)	-	
OS (<i>n</i> =486)			0.12
5-year estimate (95% CI)	80.8% (69.0%-94.7%)	65.2% (60.9%-69.9%)	
10-year estimate (95% CI)	74.1% (58.7%-93.5%)	60.5% (52.8%-69.3%)	

WBC: white blood cell. CNS: Central Nervous System. ITD: internal tandem duplication. CI: confidence interval. EFS: event-free survival. OS: overall survival.

Supplementary Table 7. Main clinic and biological characteristics of the 64 patients with pLSC6 gene expression available data.

Patients	Total no. (%) 64
Gender (n=64)	
Female	27 (42.2%)
Male	37 (57.8%)
24-miRNA signature (n=64)	
P1TAML	33 (51.6%)
P2TAML	31 (48.4%)
Age, years (n=64)	
Median [range]	11.4 [1.6-18.2]
[0,2) years old	3 (4.7%)
[2,10) years old	22 (34.4%)
[10,15) years old	19 (29.7%)
[15,19) years old	20 (31.2%)
WBC count, x10⁹ /L, median [range] (n=64)	
	46.1 [3.1-473.0]
CNS disease (n=64)	
Not infiltrated	55 (85.9%)
Infiltrated	9 (14.1%)
t(8;21) RUNX1::RUNX1T1 (n=62)	
	14 (22.6%)
inv(16) CBFβ::MYH11 (n=62)	
	7 (11.3%)
KMT2A+ (n=62)	
	8 (12.9%)
t(9;11)(p22;q23) (n=61)	3 (4.9%)
t(10;11)(p11.2;q23) (n=62)	0 (0.0%)
t(11;19)(q23;p13.1) (n=62)	1 (1.6%)
AML-Other karyotypes (n=62)	
	32 (51.6%)
FLT3 ITD mutation (n=64)	
	20 (31.3%)
NPM1 mutation (n=64)	
	9 (14.1%)
Protocol (n=64)	
AAML03P1	2 (3.1%)
AAML0531	60 (93.8%)
CCG2961	2 (3.1%)
pLSC6 (n=64)	
Low pLSC6 (<4.08)	40 (62.5%)
High pLSC6 (≥4.08)	24 (37.5%)
MRD≥0.1% at the end of induction (n=56)	
	14 (25.0%)

WBC: white blood cell. CNS: Central Nervous System. ITD: internal tandem duplication. pLSC6: paediatric leukaemic stem cell score.

Supplementary Table 8. Correlation between the pLSC6 levels and the groups (P1TAML and P2TAML), as defined by the 24-miRNAs signature.

		P1TAML <i>n=33</i>	P2TAML <i>n=31</i>	<i>p</i>-value
Low pLSC6 (<i>n=40</i>)	<4.08	13 (39.4%)	27 (87.1%)	0.00023
High pLSC6 (<i>n=24</i>)	≥4.08	20 (60.6%)	4 (12.9%)	

pLSC6: paediatric leukaemic stem cell score.

Supplementary Table 9. Cox model for univariate analysis of the TARGET cohort.

	EFS			OS		
	HR	p-value	p-value global	HR	p-value	p-value global
Protocol						
AAML03P1	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
AAML0531	0.77 [0.39;1.49]	0.43	0.12	0.48 [0.24;0.94]	0.032	0.042
CCG2961	2.26 [0.61;8.35]	0.22		1.18 [0.25;5.49]	0.83	
Age. years						
[0,2) years old	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
[2,10) years old	0.66 [0.44;0.97]	0.035	0.11	0.66 [0.41;1.05]	0.082	0.15
[10,15) years old	0.91 [0.62;1.34]	0.62		0.92 [0.58;1.46]	0.71	
[15,19) years old	0.95 [0.64;1.42]	0.81		1.06 [0.66;1.71]	0.80	
MRD at EOI						
<0.1	Ref.	Ref.	-	Ref.	Ref.	-
≥0.1	2.59 [1.91;3.51]	<0.0001		2.47 [1.71;3.55]	<0.0001	
Genetics						
AML-Other	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
Inv(16) + t(8;21)	0.33 [0.22;0.50]	<0.0001		0.34 [0.20;0.56]	<0.0001	
<i>KMT2A</i> + not t(9;11)	1.39 [0.87;2.22]	0.17		1.78 [1.06;2.98]	0.028	
<i>KMT2A</i> + t(9;11)	0.70 [0.37;1.31]	0.26	<0.0001	0.77 [0.37;1.60]	0.48	<0.0001
<i>NPM1</i> -/ <i>FLT3 ITD</i> +	1.65 [1.16;2.37]	0.0059		1.48 [0.96;2.28]	0.076	
<i>NPM1</i> +/ <i>FLT3 ITD</i> -	0.39 [0.17;0.90]	0.027		0.42 [0.15;1.15]	0.091	
<i>NPM1</i> +/ <i>FLT3 ITD</i> +	0.37 [0.15;0.92]	0.032		0.23 [0.06;0.95]	0.042	
t(6;9)(p23;q34)	0.88 [0.39;2.02]	0.77		0.55 [0.17;1.75]	0.31	
24-miRNAs signature						
P2AML	Ref.	Ref.	-	Ref.	Ref.	-
P1AML	1.72 [1.31;2.25]	<0.0001		1.55 [1.12;2.13]	0.0075	
pLSC6 score						
<4.08	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
≥4.08	6.14 [2.64;14.27]	<0.0001	-	4.54 [1.72;11.97]	0.0022	-

MRD+ at EOI: measurable residual disease at the end of induction. HR: hazard ratio. EFS: event-free survival. OS: overall survival. ITD: internal tandem duplication.

Supplementary Table 10. Cox model for multivariate analysis of the TARGET cohort.

	EFS					OS				
	HR	95% CI	CI	p-value	p-value global	HR	95% CI	CI	p-value	p-value global
MRD at EOI:										
<0.1%	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	-	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	-
≥0.1%	2.20	1.59	3.04	<0.0001	-	2.04	1.38	3.01	0.00036	-
Genetics:										
AML-Other	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	-	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	-
Inv(16) + t(8;21)	0.38	0.23	0.62	0.00012	-	0.33	0.17	0.63	0.00062	-
<i>KMT2A</i> + not t(9;11)	1.07	0.61	1.86	0.82	-	1.52	0.82	2.82	0.18	-
<i>KMT2A</i> + t(9;11)	0.46	0.18	1.17	0.10	<0.0001	0.60	0.21	1.70	0.34	0.00041
<i>NPM1</i> -/ <i>FLT3 ITD</i> +	1.22	0.78	1.90	0.38	-	1.07	0.61	1.81	0.81	-
<i>NPM1</i> +/ <i>FLT3 ITD</i> -	0.42	0.18	0.98	0.046	-	0.46	0.16	1.29	0.14	-
<i>NPM1</i> +/ <i>FLT3 ITD</i> +	0.37	0.15	0.95	0.039	-	0.26	0.06	1.11	0.070	-
t(6;9)(p23;q34)	1.11	0.44	2.82	0.83	-	0.39	0.09	1.67	0.20	-
24-miRNAs signature:										
P2AML	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	-	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	-
P1AML	1.41	0.96	2.08	0.081	-	1.22	0.77	1.93	0.39	-
Protocol:										
AAML03P1	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	-	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	-
AAML0531	-	-	-	-	-	0.47	0.21	1.03	0.059	-

MRD+ at EOI: measurable residual disease at the end of induction. HR: hazard ratio. CI: confidence interval. EFS: event-free survival. OS: overall survival. ITD: internal tandem duplication.

Supplementary Table 11. Multivariate analysis of the sub-cohort of 55/64 patients from the TARGET cohort with available data on the pLSC6 score, the 24-miRNAs signature's expression, and clinical and genetic data.

	EFS				OS				
	HR	95% CI	CI	p-value	HR	95% CI	CI	p-value	
MRD at EOI:									
<0.1%	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
≥0.1%	1.25	0.50	3.09	0.63	1.09	0.37	3.19	0.88	
24-miRNAs signature:									
P2AML	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
P1AML	1.28	0.43	3.78	0.66	1.10	0.32	3.75	0.88	
pLSC6:									
score <4.08	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
score ≥4.08	6.19	2.05	18.68	0.0012	5.84	1.57	21.71	0.0085	
Protocol:									
AAML03P1	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
AAML0531	-	-	-	-	0.25	0.02	2.71	0.25	

MRD+ at EOI: measurable residual disease at the end of induction. HR: hazard ratio. CI: confidence interval. EFS: event-free survival. OS: overall survival.

Supplementary Table 12. C-Index to evaluate the ability to predict the outcome individually and combining the different factors.

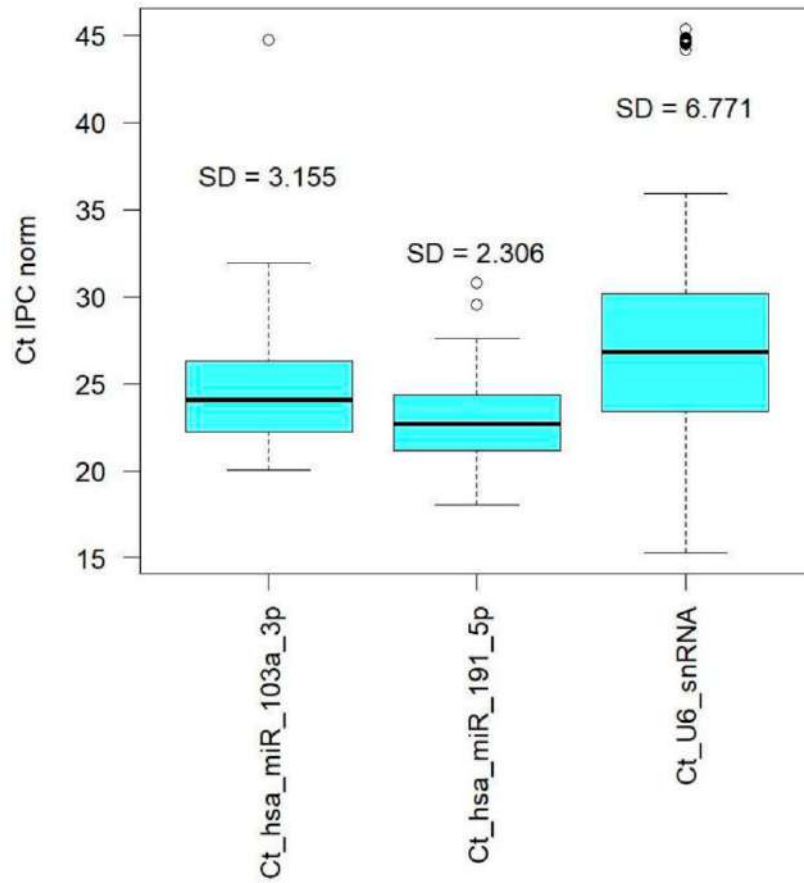
C-index estimate individually for each variable				
	EFS		OS	
	<i>C-index</i>	<i>S.E.</i>	<i>C-index</i>	<i>S.E.</i>
MRD+ ($\geq 0.1\%$)	0.560	0.052	0.541	0.058
Genetics	0.717	0.055	0.703	0.063
pLSC6 score (≥ 4.08)	0.730	0.049	0.701	0.060
24-miRNA signature	0.646	0.053	0.653	0.056
C-index estimate combining two variables				
	EFS		OS	
	<i>C-index</i>	<i>S.E.</i>	<i>C-index</i>	<i>S.E.</i>
MRD+ ($\geq 0.1\%$) + Genetics	0.727	0.060	0.709	0.067
MRD+ ($\geq 0.1\%$) + pLSC6 score (≥ 4.08)	0.732	0.057	0.698	0.068
MRD+ ($\geq 0.1\%$) + 24-miRNA signature	0.677	0.056	0.673	0.055
Genetics + pLSC6 score (≥ 4.08)	0.790	0.049	0.752	0.061
Genetics + 24-miRNA signature	0.732	0.051	0.731	0.057
pLSC6 score (≥ 4.08) + 24-miRNA signature	0.733	0.056	0.711	0.057
C-index estimate combining three variables				
	EFS		OS	
	<i>C-index</i>	<i>S.E.</i>	<i>C-index</i>	<i>S.E.</i>
MRD+ ($\geq 0.1\%$) + Genetics + pLSC6 score (≥ 4.08)	0.792	0.050	0.755	0.063
MRD+ ($\geq 0.1\%$) + Genetics + 24-miRNA signature	0.740	0.051	0.734	0.057
MRD+ ($\geq 0.1\%$) + pLSC6 score (≥ 4.08) + 24-miRNA signature	0.767	0.053	0.733	0.057
Genetics + pLSC6 score (≥ 4.08) + 24-miRNA signature	0.795	0.047	0.769	0.054
C-index estimate combining four variables				
	EFS		OS	
	<i>C-index</i>	<i>S.E.</i>	<i>C-index</i>	<i>S.E.</i>
MRD+ ($\geq 0.1\%$) + Genetics + pLSC6 score (≥ 4.08) + 24-miRNA signature	0.793	0.048	0.769	0.055

MRD+: measurable residual disease at the end of induction. pLSC6: paediatric leukaemic stem cell score. SE: standard error.

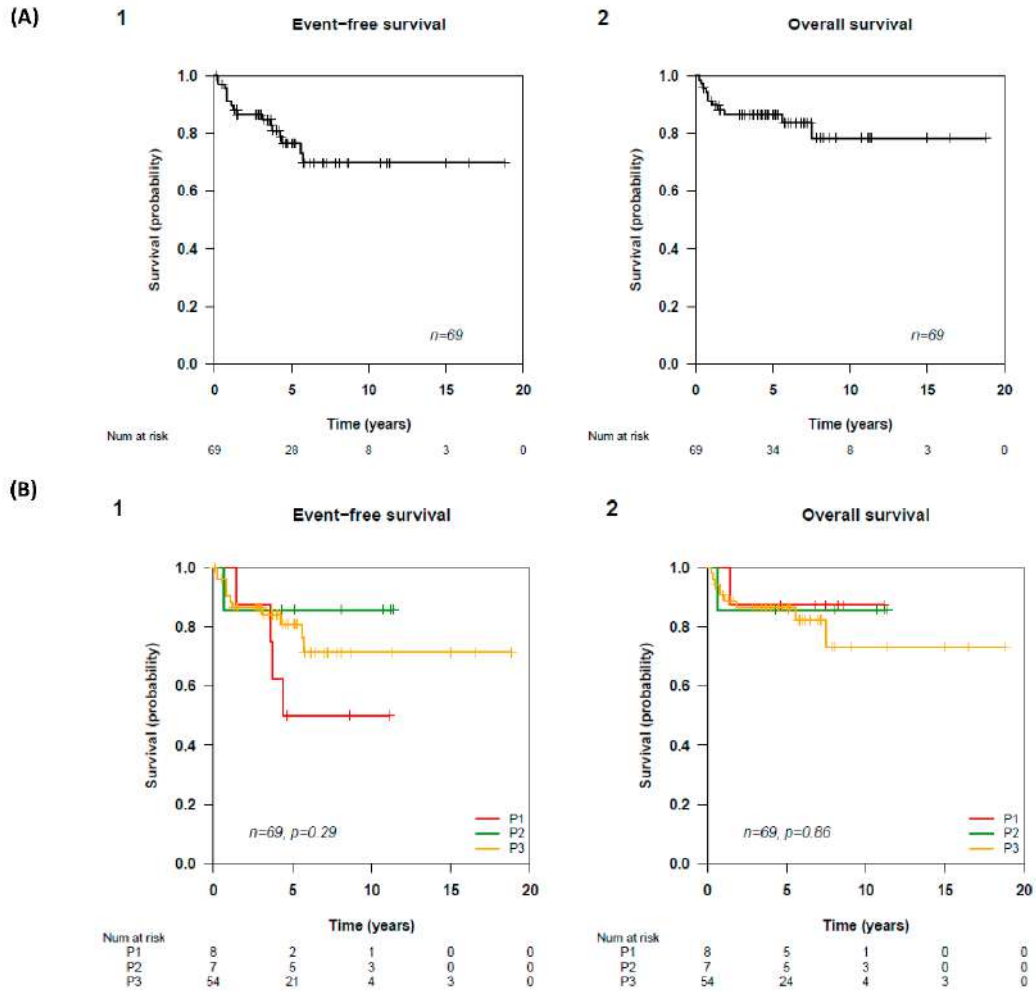
Supplementary Figure 1. miRNA panel design.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	hsa-let-7a-5p	hsa-let-7b-5p	hsa-let-7c-5p	hsa-let-7d-5p	hsa-miR-140-5p	hsa-miR-545-3p	hsa-let-7g-5p	hsa-let-7i-5p	hsa-miR-187c-5p	hsa-miR-100-5p	hsa-let-7f-5p	UniSp3 IPC
B	hsa-miR-193a-3p	hsa-miR-342-3p	hsa-miR-132-3p	hsa-miR-222-3p	hsa-miR-222-5p	hsa-miR-542-5p	hsa-miR-194-5p	hsa-miR-125b-5p	hsa-miR-126-3p	hsa-miR-141-3p	hsa-miR-193b-3p	UniSp6 CP
C	hsa-miR-10b-5p	hsa-miR-128-3p	hsa-miR-449a	hsa-miR-371a-3p	hsa-miR-151a-5p	hsa-miR-16-5p	hsa-miR-28a-5p	hsa-miR-150-5p	hsa-miR-155-5p	hsa-miR-15a-5p	hsa-miR-15b-5p	UniSp3 IPC
D	hsa-miR-196b-5p	hsa-miR-17-5p	hsa-miR-181a-5p	hsa-miR-181b-5p	hsa-miR-372-3p	hsa-miR-133a-3p	hsa-miR-373-3p	hsa-miR-199b-5p	hsa-miR-18a-5p	hsa-miR-191-5p	hsa-miR-708-5p	U6 snRNA
E	hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-195-5p	hsa-miR-196a-5p	hsa-miR-19a-3p	hsa-miR-19b-3p	hsa-miR-20a-5p	hsa-miR-200b-3p	hsa-miR-200c-3p	hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-10a-5p	hsa-miR-17-3p	hsa-miR-425-5p
F	hsa-miR-1290	hsa-miR-20b-5p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-451a	hsa-miR-126-5p	hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-92a-3p	hsa-miR-425-3p	hsa-miR-221-3p	hsa-miR-139-5p	hsa-miR-223-3p	hsa-miR-449b-5p
G	hsa-miR-203a	hsa-miR-24-3p	hsa-miR-10a-3p	hsa-miR-34c-5p	hsa-miR-331-5p	hsa-miR-30b-5p	hsa-miR-183-5p	hsa-miR-29a-3p	hsa-miR-29b-3p	hsa-miR-29c-3p	hsa-miR-22-3p	hsa-miR-34b-5p
H	hsa-miR-190a-5p	hsa-miR-34a-5p	hsa-miR-450a-5p	hsa-miR-142-3p	hsa-miR-9-5p	hsa-let-7e-5p	hsa-miR-92b-3p	hsa-miR-424-5p	hsa-miR-99a-5p	hsa-miR-192-5p	hsa-miR-103a-3p	hsa-miR-103a-3p

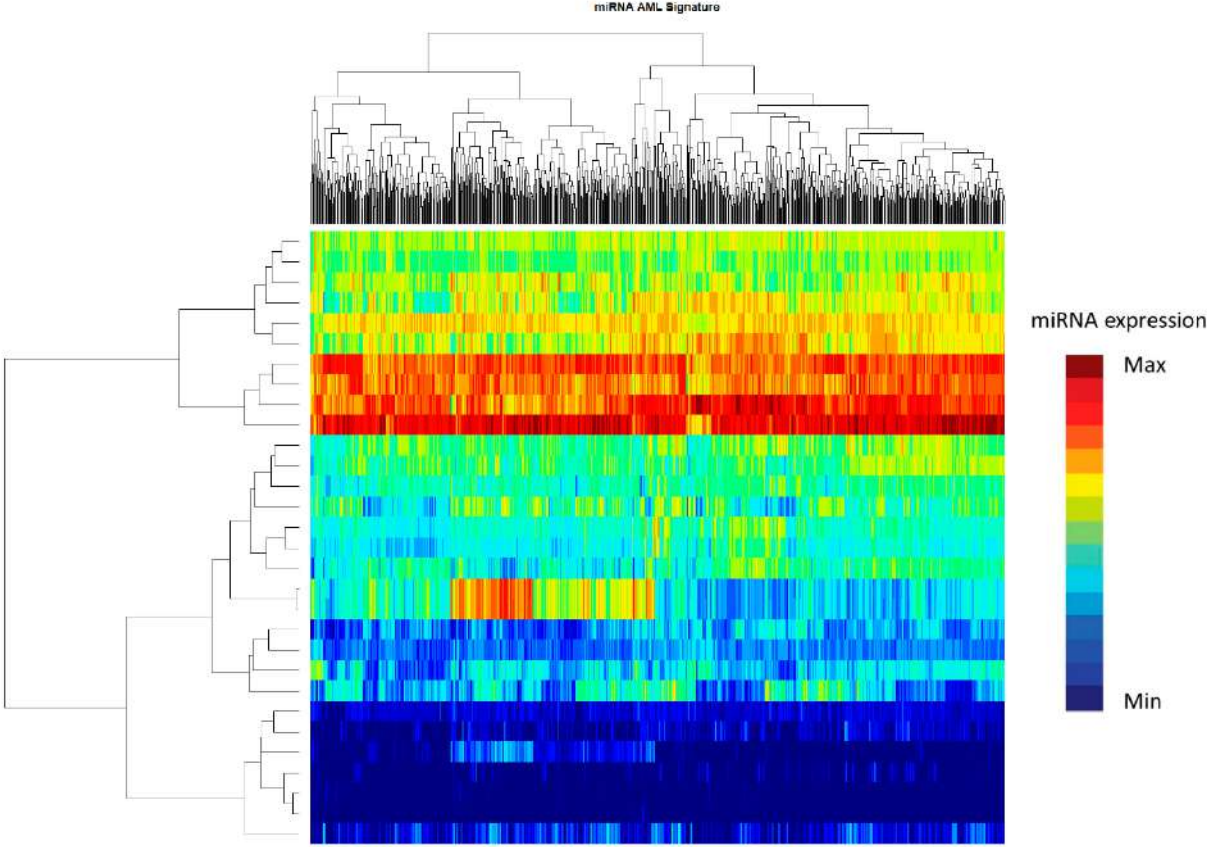
Supplementary Figure 2. Standard deviation (SD) analysis of potential reference endogenous controls.



Supplementary Figure 3. Event-free survival (EFS) and overall survival (OS) of ALL patients: entire ALL cohort and separated by groups according to the unsupervised analysis.



Supplementary Figure 4. Unsupervised hierarchical clustering analysis based on the miRNA expression of 447 patients of the TARGET cohort.



Supplementary Figure 5. Correlation analysis between the 24 miRNAs from the signature and the genes in pLSC6 and LSC17 score. Genes coloured in blue are common to both scores.

miRNA	pLSC6 score												LSC17 score											
	SOCS2	CD44	ADGRE1	DMRT3B	FAM3A	SPINK2	SOCS2	CD63	CD44	EM1	LATM4B	DPYSL3	ADGRE1	NMFIN	ANKK3	SMN2	CYP11	FAM3A	MAM1	ANKK2	ZBTB46	DMRT3B		
hsa-miR-20b							0.255*	0.367**																
hsa-miR-223							-0.239*	0.248*					-0.271*											
hsa-miR-193a							0.254*	0.236*																
hsa-miR-24-3p							0.343**	0.251*																
hsa-miR-128-5p							-0.240*	0.264*																
hsa-miR-17																								
hsa-miR-199b								0.278*																
hsa-miR-181c								0.409**																
hsa-miR-181a-5p								0.356**																
hsa-miR-181b-2								0.330**																
hsa-miR-21																								
hsa-miR-222																								
hsa-miR-331																								
hsa-miR-373																								
hsa-miR-708																								
hsa-miR-34b																								
hsa-miR-195																								
hsa-miR-151a																								
hsa-miR-30b																								
hsa-miR-22																								
hsa-let-7f-5p																								
hsa-let-7i																								
hsa-miR-1290																								
hsa-miR-9-5p																								

1	p<0.01**
	p>0.01 & p<0.05*
0	p>0.05
	no correlation
	p>0.05
	p>0.01 & p<0.05*
-1	p<0.01**

References

1. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. MiRBase: From microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press; 2018/11/13;47(D1):D155–62.
2. Kozomara A, Griffiths-Jones S. MiRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2013/11/25;42(D1):68–73.
3. Kozomara A, Griffiths-Jones S. MiRBase: Integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2010/10/30;39(SUPPL. 1):152–7.
4. Griffiths-Jones S, Saini HK, Van Dongen S, Enright AJ. miRBase: Tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* 2007/11/08;36(SUPPL. 1):154–8.
5. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:140–4.
6. Griffiths-Jones S. The microRNA registry. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:109–11.
7. Meyers BC, Axtell MJ, Bartel B, Bartel DP, Baulcombe D, Bowman JL, et al. Criteria for annotation of plant microRNAs. *Plant Cell.* 2008/12;20(12):3186–90.
8. Phipson B, Lee S, Majewski IJ, Alexander WS, Smyth G. Robust Hyperparameter Estimation Protects. *Ann Appl Stat.* 2016/06;10(2):946–63.
9. Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Karagkouni D, Vergoulis T, et al. DIANA-miRPath v3.0: Deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res.* 2015/05/04;43(W1):W460–6.
10. McGeary SE, Lin KS, Shi CY, Pham TM, Bisaria N, Kelley GM, et al. The biochemical basis of microRNA targeting efficacy. *Science.* 2019/12/20;366(6472):1-30.
11. Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife.* 2015/08/12;4:1–38.
12. Elsayed AH, Rafiee R, Cao X, Downing JR, Ribeiro R, Fan Y, et al. A 6-gene leukemic stem cell score identifies high risk pediatric acute myeloid leukemia. *Leukaemia;* 2020/04/23;34(3):735–45.
13. Kaplan E, Meier P. Non parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc.* 1958;(53):457–81.
14. John D. Kalbfleisch RLP. *The Statistical Analysis of Failure Time Data, Second Edition* [Internet]. John Wiley & Sons, editor. 2002. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118032985>
15. Cox DR. Regression Models and Life-Tables. *J R Stat Soc Ser B.* 1972/03/08;34(2):187–202.
16. Heinze G, Schemper M. A solution to the problem of monotone likelihood in Cox regression. *Biometrics.* 2001;57(1):114–9.
17. Harrell FE, Califf RM, Pryor DB, Lee KL, Rosati RA. Evaluating the Yield of Medical Tests. *JAMA J Am Med Assoc.* 1982;247(18):2543–6.
18. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. [Internet]. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2022. Available from: <https://www.r-project.org/>.
19. Schotte D, Menezes RX De, Moqadam FA, Khankahdani LM, Lange-Turenhout E, Chen C, et al. Original Articles MicroRNA characterize genetic diversity and drug resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia. 2011/01/12;96(5):703–11.
20. Vlachos IS, Kostoulas N, Vergoulis T, Georgakilas G, Reczko M, Maragkakis M, et al. DIANA miRPath v.2.0: Investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways. *Nucleic Acids Res.* 2012/05/30;40(W1):498–504.

21. Mi S, Lu J, Sun M, Li Z, Zhang H, Neilly MB, et al. MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007/12/11;104(50):19971–6.
22. Zhou R, Mo W, Wang S, Zhou W, Chen X, Pan S. miR-141-3p and TRAF5 Network Contributes to the Progression of T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cell Transplant*. 2019;28(15):59–65.
23. Agirre X, Martínez-Climent JÁ, Odero MD, Prósper F. Epigenetic regulation of miRNA genes in acute leukemia. *Leukemia*. 2012/12/06;26(3):395–403.
24. Ghodousi ES, Rahgozar S. MicroRNA-326 and microRNA-200c: Two novel biomarkers for diagnosis and prognosis of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Cell Biochem*. 2018/02/21;119(7):6024–32.
25. Chuang MK, Chiu YC, Chou WC, Hou HA, Chuang EY, Tien HF. A 3-microRNA scoring system for prognostication in de novo acute myeloid leukemia patients [Internet]. Vol. 29, *Leukemia*. Nature Publishing Group; 2015. 1051-1059 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2014.333>
26. Emmrich S, Katsman-Kuipers JE, Henke K, Khatib ME, Jammal R, Engeland F, et al. MiR-9 is a tumor suppressor in pediatric AML with t(8;21). *Leukemia* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014;28(5):1022–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2013.357>
27. Chen P, Price C, Li Z, Li Y, Cao D, Wiley A, et al. miR-9 is an essential oncogenic microRNA specifically overexpressed in mixed lineage leukemia-rearranged leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013/07/9;110(28):11511–6.
28. Tian C, You MJ, Yu Y, Zhu L, Zheng G, Zhang Y. MicroRNA-9 promotes proliferation of leukemia cells in adult CD34-positive acute myeloid leukemia with normal karyotype by downregulation of Hes1. *Tumor Biol*. 2015/12/176;37(6):7461–71.
29. Violaine Havelange, Stauffer N, Volinia CCEHS, Michael Andreeff5 GM, Carlo M. Croce A, Garzon R. Functional implications of microRNAs in acute myeloid leukemia by integrating microRNA and mRNA expression profiling. *Cancer*. 2011/10/15;117(20):4696–706.
30. Chen S, Chen Y, Zhu Z, Tan H, Lu J, Qin P, et al. Identification of the key genes and micrnas in adult acute myeloid leukemia with FLT3 mutation by bioinformatics analysis. *Int J Med Sci*. 2020/05/18;17(9):1269–80.
31. Zhang H, Luo X, Zhang P, Huang L, Zheng Y, Wu J, et al. MicroRNA Patterns Associated with Clinical Prognostic Parameters and CNS Relapse Prediction in Pediatric Acute Leukemia. 2009/11/13;4(11):1-10.
32. Vandewalle V, Essaghir A, Bollaert E, Lenglez S, Graux C, Schoemans H, et al. miR-15a-5p and miR-21-5p contribute to chemoresistance in cytogenetically normal acute myeloid leukaemia by targeting PDCD4, ARL2 and BTG2. *J Cell Mol Med*. 2021/10/26;25(1):575–85.
33. Lovat F, Fassan M, Sacchi D, Ranganathan P, Palamarchuk A, Bill M, et al. Knockout of both miR-15/16 loci induces acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018/12/18;115(51):13069–74.
34. Hong Z, Zhang R, Qi H. Diagnostic and prognostic relevance of serum miR-195 in pediatric acute myeloid leukemia. *Cancer Biomark*. 2018;21(2):269–75.
35. Mi S, Li Z, Chen P, He C, Cao D, Elkhouloun A, et al. Aberrant overexpression and function of the miR-17-92 cluster in MLL-rearranged acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2010;107(8):3710–5. Available from:

- <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0914900107>
36. He Z, Liao Z, Chen S, Li B, Yu Z, Luo G, et al. Downregulated miR-17, miR-29c, miR-92a and miR-214 may be related to BCL11B overexpression in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2018/03/23;14(5):e259–65.
 37. Mosakhani N, Missiry M El, Vakkila E, Knuutila S, Vakkila J. Low expression of miR-18a as a characteristic of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2017/11;39(8):585–8.
 38. Sanghvi VR, Mavrakis KJ, Van Der Meulen J, Boice M, Wolfe AL, Carty M, et al. Characterization of a set of tumor suppressor microRNAs in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Signal*. 2014;7(352):1–23.
 39. Cheng Z, Dai Y, Huang W, Zhong Q, Zhu P, Zhang W, et al. Prognostic Value of MicroRNA-20b in Acute Myeloid Leukemia. *Front Oncol*. 2021/02/18;10(February):1–9.
 40. Papageorgiou SG, Kontos CK, Tsiakanikas P, Stavroulaki G, Bouchla A, Vasilatou D, et al. Elevated miR-20b-5p expression in peripheral blood mononuclear cells: A novel, independent molecular biomarker of favorable prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* [Internet]. Elsevier Ltd; 2018;70:1–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2018.04.014>
 41. Zhang T Juan, Lin J, Zhou J dong, Li X xi, Zhang W, Guo H, et al. High bone marrow miR-19b level predicts poor prognosis and disease recurrence in de novo acute myeloid leukemia. *Gene*. 2017/10/12;640:79–85.
 42. Junker F, Chabloz A, Koch U, Radtke F. Dicer1 imparts essential survival cues in Notch-driven T-ALL via miR-21-mediated tumor suppressor Pcdcd4 repression. *Blood*. 2015/08/20;126(8):993–1004.
 43. Song SJ, Poliseno L, Song MS, Ala U, Webster K, Ng C, et al. MicroRNA-Antagonism Regulates Breast Cancer Stemness and Metastasis via. *Cell* [Internet]. 2013/07/18;2(2):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.026>
 44. Yin JY, Tang Q, Qian W, Qian J, Lin J, Wen XM, et al. Increased expression of miR-24 is associated with acute myeloid leukemia with t(8;21). *Int J Clin Exp Pathol*. 2014/11/01;7(11):8032–8.
 45. Huang S, Yang H, Li Y, Feng C, Gao L, Chen GF, et al. Prognostic Significance of Mixed-Lineage Leukemia (MLL) Gene Detected by Real-Time Fluorescence Quantitative PCR Assay in Acute Myeloid Leukemia. *Med Sci Monit*. 2016;22:3009–17.
 46. Xu L, Xu Y, Jing Z, Wang X, Zha X, Zeng C, et al. Altered expression pattern of miR-29a, miR-29b and the target genes in myeloid leukemia. *Exp Hematol Oncol*. 2014;3(1):1–7.
 47. Ngankeu A, Ranganathan P, Havelange V, Nicolet D, Volinia S, Powell BL, et al. Discovery and functional implications of a miR-29b-1/miR-29a cluster polymorphism in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2017/12/12;9(4):4354–65.
 48. Tang LJ, Sun GK, Zhang TJ, Wu DH, Zhou JD, Ma BB, et al. Down-regulation of miR-29c is a prognostic biomarker in acute myeloid leukemia and can reduce the sensitivity of leukemic cells to decitabine. *Cancer Cell Int* [Internet]. BioMed Central; 2019;19(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0894-y>
 49. Ortega M, Bhatnagar H, Lin AP, Wang L, Aster JC, Sill H, et al. A microRNA-mediated regulatory loop modulates NOTCH and MYC oncogenic signals in B- and T-cell malignancies. *Leukemia* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015;29(4):968–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2014.302>

50. Ultimo S, Martelli AM, Zauli G, Vitale M, Calin GA, Neri LM. Roles and clinical implications of microRNAs in acute lymphoblastic leukemia. *J Cell Physiol.* 2017/11/14;233(8):5642–54.
51. Swierczynski S, Klieser E, Illig R, Alinger-Scharinger B, Kiesslich T, Neureiter D. Histone deacetylation meets miRNA: epigenetics and post-transcriptional regulation in cancer and chronic diseases. *Expert Opin Biol Ther* [Internet]. 2015;15(5):651–64. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14712598.2015.1025047>
52. Nemes K, Csóka M, Nagy N, Márk Á, Váradi Z, Dankó T, et al. Expression of Certain Leukemia/Lymphoma Related microRNAs and its Correlation with Prognosis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pathol Oncol Res.* 20114/11/12;21(3):597–604.
53. Zheng ZZ, Ma YP, Wu RH, Rong G, Li C, Li GX, et al. Serum miR-133 as a novel biomarker for predicting treatment response and survival in acute myeloid leukemia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020;24(2):777–82.
54. Yamamoto H, Lu J, Oba S, Kawamata T, Yoshimi A, Kurosaki N, et al. MiR-133 regulates Evi1 expression in AML cells as a potential therapeutic target. *Sci Rep* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016/01/12;6(December 2015):1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep19204>
55. Qin L, Deng HY, Chen SJ, Wei W, Zhang YT. miR-139 acts as a tumor suppressor in T-cell acute lymphoblastic leukemia by targeting CX chemokine receptor 4. *Am J Transl Res.* 2017/09/30;9(9):4059–70.
56. Emmrich S, Engeland F, El-Khatib M, Henke K, Obulkasim A, Schöning J, et al. MIR-139-5p controls translation in myeloid leukemia through EIF4G2. *Oncogene.* 2015/05/22;35(14):1822–31.
57. Correia NC, Melão A, Póvoa V, Sarmiento L, De Cedron MG, Malumbres M, et al. microRNAs regulate TAL1 expression in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget.* 2016/01/23;7(7):8268–81.
58. Dahlhaus M, Roof C, Ruck S, Lange S, Freund M, Junghanss C. Expression and prognostic significance of hsa-miR-142-3p in acute leukemias. *Neoplasma.* 2013;60(5):607–16.
59. Ghisi M, Corradin A, Basso K, Frasson C, Serafin V, Mukherjee S, et al. Modulation of microRNA expression in human T-cell development: Targeting of NOTCH3 by miR-150. *Blood.* 2011/05/06;117(26):7053–62.
60. Bousquet M, Zhuang G, Meng C, Ying W, Cheruku PS, Shie AT, et al. MiR-150 blocks MLL-AF9-associated leukemia through oncogene repression. *Mol Cancer Res.* 2013/08;11(8):912–22.
61. Salemi D, Cammarata G, Agueli C, Augugliaro L, Corrado C, Bica MG, et al. MiR-155 regulative network in FLT3 mutated acute myeloid leukemia. *Leuk Res* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015/04/23;39(8):883–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2015.04.017>
62. Weng H, Lal K, Yang FF, Chen J. The pathological role and prognostic impact of miR-181 in acute myeloid leukemia Hengyou. *Cancer Genet.* 2015/05;208(5):225–9.
63. Zheng Z, Zheng X, Zhu Y, Gu X, Gu W, Xie X, et al. miR-183-5p Inhibits Occurrence and Progression of Acute Myeloid Leukemia via Targeting Erbin. *Mol Ther* [Internet]. Elsevier Ltd.; 2019/03;27(3):542–58. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.01.016>
64. Ramani R, Megason G, Schallheim J, Karlson C, Vijayakumar V, Vijayakumar S, et al.

- Integrative analysis of microRNA-mediated gene signatures and pathways modulating white blood cell count in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Biomark Insights*. 2017/03/06;12:1-12.
65. Tian C, Zhang L, Li X, Zhang Y, Li J, Chen L. Low miR-192 expression predicts poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia. *Cancer Biomarkers*. 2018;22(2):209–15.
 66. Sayadi M, Ajdary S, Nadali F, Rostami S, Fahtabad ME. Tumor suppressive function of microRNA-192 in acute lymphoblastic leukemia. *Bosn J Basic Med Sci*. 2017/03/15;17(3):248–54.
 67. Bhayadia R, Krowiorz K, Haetscher N, Jammal R, Emmrich S, Obulkasim A, et al. Endogenous tumor suppressor microRNA-193b: Therapeutic and prognostic value in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2018;36(10):1007–16.
 68. Dell'Aversana C, Giorgio C, D'Amato L, Lania G, Matarese F, Saeed S, et al. MiR-194-5p/BCLAF1 deregulation in AML tumorigenesis. *Leukemia*. 2017/02/20;31(11):2315–25.
 69. Li Y, Zhang G, Wu B, Yang W, Liu Z. MiR-199a-5p Represses Protective Autophagy and Overcomes Chemoresistance by Directly Targeting DRAM1 in Acute Myeloid Leukemia. *J Oncol*.; 2019/09/15;2019:1-16.
 70. Favreau AJ, McGlaufflin RE, Duarte CW, Sathyanarayana P. miR-199b, a novel tumor suppressor miRNA in acute myeloid leukemia with prognostic implications. *Exp Hematol Oncol*. *BioMed Central*; 2016;5(1):1–11.
 71. Lee YG, Kim I, Oh S, Shin DY, Koh Y, Lee KW. Small rna sequencing profiles of mir-181 and mir-221, the most relevant micrnas in acute myeloid leukemia. *Korean J Intern Med*. 2019/05/31;34(1):178–83.
 72. Coskun E, Neumann M, Schlee C, Liebertz F, Heesch S, Goekbuget N, et al. MicroRNA profiling reveals aberrant microRNA expression in adult ETP-ALL and functional studies implicate a role for miR-222 in acute leukemia. *Leuk Res [Internet]*. Elsevier Ltd; 2013/03/20;37(6):647–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2013.02.019>
 73. Garzon R, Volinia S, Liu CG, Fernandez-Cymering C, Palumbo T, Pichiorri F, et al. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008/01/10;111(6):3183–9.
 74. Butrym A, Rybka J, Baczyńska D, Tukiendorf A, Kuliczkowski K, Mazur G. Expression of microRNA-331 can be used as a predictor for response to therapy and survival in acute myeloid leukemia patients. *Biomark Med*. 2015;9(5):453–60.
 75. Elhamamsy AR, Sharkawy MS El, Zanaty AF, Mahrous MA, Mohamed AE, Abushaaban EA. Circulating miR-92a, miR-143 and miR-342 in Plasma are Novel Potential Biomarkers for Acute Myeloid Leukemia. *Int J Mol Cell Med*. 2017/05/31;6(2):77–86.
 76. Ju X, Li D, Shi Q, Hou H, Sun N, Shen B. Differential microRNA expression in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol*. 2008/03/18;26(1):1–10.
 77. Li X, Sanda T, Thomas Look A, Novina CD, von Boehmer H. Repression of tumor suppressor miR-451 is essential for NOTCH1-induced oncogenesis in T-ALL. *J Exp Med*. 2011;208(4):663–75.
 78. Avigad S, Verly IR, Lebel A, Kordi O, Shichrur K, Ohali A, et al. miR expression profiling at diagnosis predicts relapse in pediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes, Chromosom Cancer [Internet]*. John Wiley & Sons, Ltd; 2016 Apr 1 [cited 2022 Oct

14];55(4):328–39.

Available

from:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/gcc.22334>



UNIVERSITAT DE
BARCELONA