



VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

*Análisis mutacional de TP53 en la  
Leucemia Aguda Linfoblástica – B  
mediante Secuenciación Masiva*

---

Facultad de Medicina

Grado en Medicina

Autora: Sandra Castaño Díez

Tutora: Carmen Guerrero Arroyo

[Trabajo de fin de Grado y Máster, 2016]

*A mi padre, a mi madre y a mi hermano, por vuestro abrazo.*

*A Maribel, por tus enseñanzas.*

*A todos los que me apoyaron en el camino.*

*A todos los que se perdieron.*

## Índice

<b>Resumen</b> .....	6
<b>Introducción</b> .....	7
<i>Definición y epidemiología de la LAL-B</i> .....	7
<i>Patogenia y genética de LAL-B</i> .....	7
<i>El gen TP53 y sus alteraciones en la LAL-B</i> .....	8
<i>TP53 como marcador pronóstico en la LAL-B</i> .....	9
<i>Tratamiento de la LAL-B y nuevas estrategias terapéuticas para contrarrestar las alteraciones en TP53</i> .....	11
<i>Secuenciación masiva. 454-GS Junior</i> .....	12
<b>Objetivo</b> .....	14
<b>Materiales y métodos</b> .....	15
<i>Pacientes</i> .....	15
<i>Secuenciación</i> .....	15
<i>Preparación y purificación de la librería de amplicones</i> .....	15
<i>PCR de emulsión (emPCR)</i> .....	17
<i>Secuenciación 454-GS Junior</i> .....	18
<i>Procesamiento de los datos y análisis</i> .....	19
<i>Validación de las mutaciones somáticas</i> .....	19
<i>Análisis estadístico</i> .....	20
<b>Resultados</b> .....	21
<i>Características de los pacientes</i> .....	21
<i>Características de la secuenciación</i> .....	21
<i>Frecuencia y caracterización de las mutaciones somáticas en TP53 en la serie de estudio</i> .....	21
<i>Asociación de las mutaciones de TP53 con parámetros clínicos</i> .....	22
<i>Asociación de las mutaciones de TP53 con la supervivencia</i> .....	22
<b>Discusión</b> .....	27
<i>El porcentaje de mutación de TP53 es similar al observado en otros estudios</i> ....	27
<i>Las mutaciones de TP53 se asocian con refractariedad y supervivencia más corta</i> .....	27
<b>Conclusiones</b> .....	29

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Factores pronósticos de LAL-B.....	10
<b>Tabla 2.</b> Placa para preparar la librería de amplicones.....	16
<b>Tabla 3.</b> Análisis multivariante de los factores de riesgo en relación con la SG, SLR y SLE en la serie global de pacientes con LAL-B mediante Regresión Cox (N=100) .....	26

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Patogenia y genética de LAL-B al diagnóstico y recaída (Modificado de Inaba et al., 2013). .....	8
<b>Figura 2.</b> Vía biológica de <i>TP53</i> (Modificado de Whibley et al., 2009).....	9
<b>Figura 3.</b> Alteraciones en <i>TP53</i> y las deleciones de <i>IKZF1</i> como marcadores moleculares de importante impacto pronóstico en las LAL (Modificado de Krentz et al., Leuk 2013).....	11
<b>Figura 4.</b> Estrategias terapéuticas con <i>TP53</i> como diana en LAL-B .....	12
<b>Figura 5.</b> Diseño del amplicón (A) y del cebador o primer (B) .....	16
<b>Figura 6.</b> Purificación de la librería de amplicones con bolas magnéticas AMPure....	17
<b>Figura 7.</b> PCR de emulsión.....	17
<b>Figura 8.</b> Proceso de enriquecimiento de las bolas magnéticas con cebadores de biotina y bolas magnéticas cubiertas de estreptavidina. ....	18
<b>Figura 9.</b> Depósito de las bolas con ADN amplificado en la placa PTP.....	18
<b>Figura 10.</b> Reacción de pirosecuenciación .....	19
<b>Figura 11.</b> Curvas Kaplan - Meier de SG, SLR y SLE de la serie global de pacientes con LAL-B en relación a mutaciones en el gen <i>TP53</i> (N=100).....	24
<b>Figura 12.</b> Curvas Kaplan - Meier de SG, SLR y SLE de niños (A, B y C) y adultos (D, E y F) con LAL-B en relación a mutaciones en el gen <i>TP53</i> .....	25

## Índice de figuras suplementarias

<b>Figura suplementaria 1.</b> Características de los pacientes con LAL-B incluidos en el grupo de estudio (N=100).....	37
<b>Figura suplementaria 2.</b> Mutaciones somáticas en <i>TP53</i> al momento del diagnóstico en pacientes con LAL-B (N=100). .....	39
<b>Figura suplementaria 3.</b> Asociación de mutaciones de <i>TP53</i> con parámetros clínicos LAL-B en la serie global (N=100). .....	40
<b>Figura suplementaria 4.</b> Supervivencia asociada a las mutaciones de <i>TP53</i> en la serie global (N=100). .....	42
<b>Figura suplementaria 5.</b> Mutaciones en <i>TP53</i> identificadas con Next – generation deep sequencing (NGS) en pacientes con LAL-B .....	44
<b>Figura suplementaria 6.</b> Validación de las mutaciones en <i>TP53</i> identificadas mediante NGS, mediante Sanger o carrera independiente de PCR.....	49

## Resumen

**Introducción.** La leucemia aguda linfoblástica B (LAL-B) constituye la neoplasia más común en la infancia además de una importante causa de morbimortalidad en adultos. A pesar del tratamiento adaptado al riesgo empleado, la supervivencia de los pacientes que recaen mucho más corta. **Objetivo.** Determinar la frecuencia y patrones mutacionales del gen *TP53* que influyen la respuesta al tratamiento, progresión y supervivencia de los pacientes con LAL-B. **Métodos.** Se estudió la presencia de mutaciones en el gen *TP53* (exones 4 a 11) en 100 pacientes (50 niños y 50 adultos) mediante secuenciación masiva de amplicones con el sistema GS Junior 454. **Resultados.** El 11% de los pacientes con LAL-B presentaron mutación en el gen *TP53*. En la serie global de enfermos, las mutaciones de *TP53* se asociaron con menor supervivencia global ( $p=0,002$ ), supervivencia libre de recaída ( $p=0,001$ ) y supervivencia libre de evento ( $p=0,008$ ). La mutación del gen *TP53* se seleccionó como un factor pronóstico independiente respecto a la supervivencia global (HR 3,0; IC 95% 1,1-8,4,  $p=0,031$ ) y a la supervivencia libre de recaída (HR 7,5; IC 95% 1,3-44,4,  $p=0,026$ ). **Conclusión.** Las mutaciones del gen *TP53* podrían ser consideradas un nuevo biomarcador asociado con mal pronóstico en los pacientes con LAL-B.

## **Introducción**

### ***Definición y epidemiología de la LAL-B***

Las leucemias agudas son un conjunto de enfermedades neoplásicas originadas por una proliferación incontrolada de células progenitoras linfoides que invaden la médula ósea alterando la hematopoyesis fisiológica (1,2,3,4).

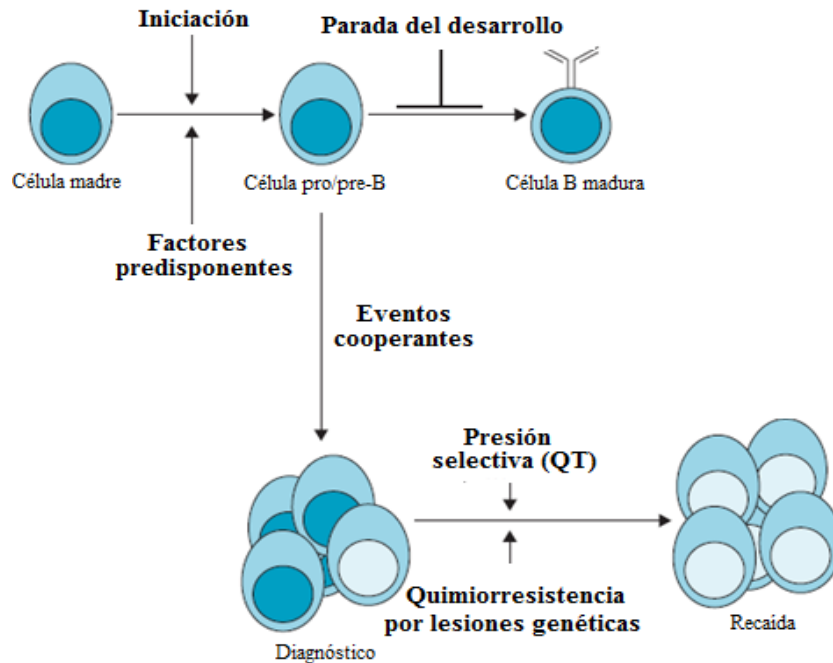
La LAL constituye la neoplasia hematológica más común en la infancia, representando en torno a un 80% del total de leucemias en este grupo y el 25% de los cánceres infantiles (5, 6), así como el 20% de leucemias en los adultos (7). Su incidencia tiene una distribución bimodal, con un pico de edad temprano a los 4 a 5 años con una incidencia cercana al 4 por 100.000, seguido de otro incremento en torno a los 50 años con una incidencia de 2 por 100.000 (8,9,10,11).

### ***Patogenia y genética de LAL-B***

La maduración de la serie linfocítica B es un proceso estrechamente controlado por una activación jerárquica de factores de transcripción y selección de las señales de traducción (7).

Mullighan (2013) (12) planteó un posible modelo de patogenia según el cual la célula linfocítica adquiere una serie de reordenamientos cromosómicos en fases iniciales, asociados con alteraciones genéticas submicroscópicas (13) y cambios epigenéticos (5) (Figura 1). Estas lesiones alteran el normal desarrollo linfocítico resultando en una “parada” de la maduración. Las recientes tecnologías genómicas de alta resolución (microarrays y secuenciación masiva) han hecho posible identificar una gran constelación de lesiones secundarias en las LAL como ganancias, pérdidas de material genético y mutaciones somáticas que pueden afectar a un número considerable de genes e intervienen en múltiples cascadas celulares como la encargada del desarrollo linfocítico (*RUNX1*, *ETV6*, *PAX5*, *IKZF1*, *EBF1*), de la regulación del ciclo celular y supresión tumoral (*CDKN2A/B*, *TP53*, *RB*), tirosina quinasa (*ABL1*), de la transcripción (*JAK*, *RAS*, *ERG*) y modificación de la cromatina (*CREBBP*, *NRC1*) (2,14).



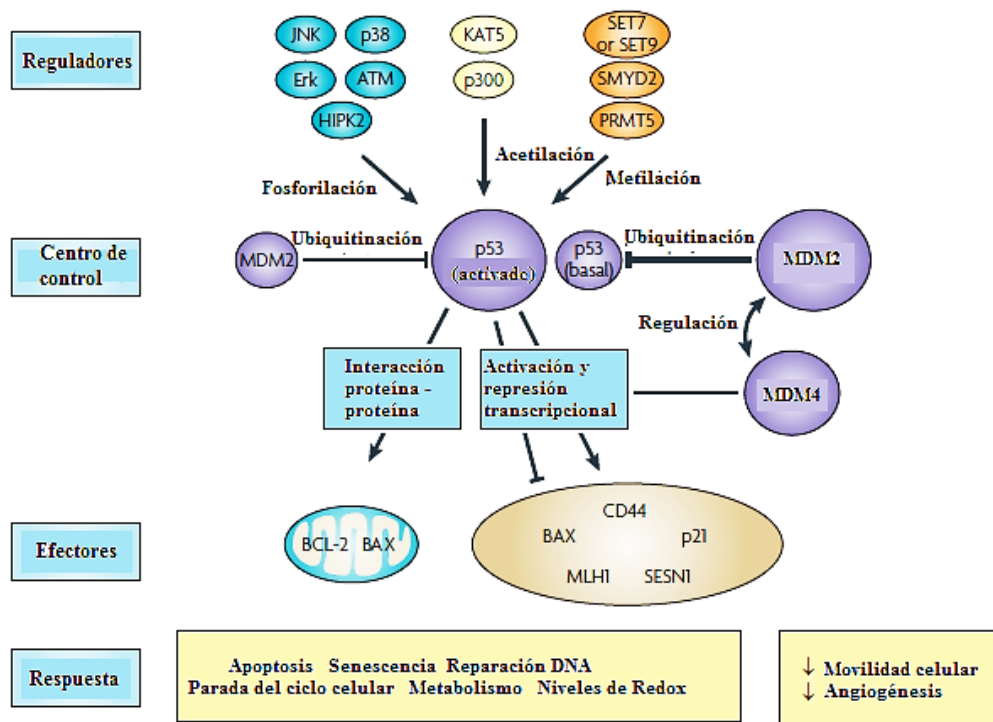


**Figura 1.** Patogénesis y genética de LAL-B al diagnóstico y recaída (Modificado de Inaba et al., 2013). Abreviaturas: QT: quimioterapia.

### ***El gen TP53 y sus alteraciones en la LAL-B***

Uno de los genes alterados en la vía de la regulación del ciclo celular y supresión tumoral es *TP53*, conocido como el guardián del genoma (15,16). Una vez activado, en respuesta al daño del ADN, detiene el ciclo celular, induce apoptosis e interviene en otros procesos como la reparación del ADN de doble cadena, la estabilidad genómica, la diferenciación celular, la senescencia y la inhibición de la angiogénesis (Figura 2) (17). Recientemente se ha documentado su posible participación en la generación de células pluripotentes inducidas (*iPSC*) (18,19) y en la supresión de la recombinación homóloga (16).

El efecto ejercido por la familia *p53* (*TP53*, *TP63* y *TP73*) está regulado por los genes *MDM2*, *MDM4* y *ARF*. Las interacciones proteína–proteína (familia *Bcl-2*, *BAX*) constituyen el segundo mecanismo regulador de la acción de *TP53* (20).



**Figura 2.** Vía biológica de TP53 (Modificado de Whibley et al., 2009). La vía celular de TP53 es compleja. Al menos 50 enzimas diferentes pueden modificar covalentemente su estabilidad, localización celular o actividad. Algunos de los activadores más estudiados, reguladores y efectores de p53 se muestran en la figura. Abreviaturas: ATM, ataxia-telangiectasia mutated; BAX, BCL-2-associated X; HIPK2, homeodomain-interacting protein kinase 2; JNK, Jun N-terminal kinase; KAT5, K (lysine) acetyltransferase 5; MLH1, MutL protein homologue 1; PRMT5, protein arginine methyltransferase 5; SESN1, sestrin 1; SMYD2, SET and MYND domain-containing 2.

La alteración de esta vía biológica se considera un marcador que afecta tanto a neoplasias sólidas como hematológicas (21). De hecho, el gen *TP53* es el gen supresor tumoral más frecuentemente mutado en cáncer (22,23), variando la prevalencia de las mutaciones y deleciones en función del tipo de neoplasia (24-29).

En el caso de la LAL-B, las lesiones más frecuentemente observadas al momento del diagnóstico en *TP53* son pérdidas y mutaciones somáticas, principalmente tipo pérdida de sentido (*missense*). La frecuencia de estas mutaciones en niños se observa entre un 1-2% (32) y en adultos, en un 6,4-11% (27,31,32). En series globales de enfermos con LAL, diversos autores han descrito una tasa mutacional entre el 8,8% a 12,4% (15,30) y una frecuencia de deleciones alrededor del 7,5%. Okamoto et al. detectaron en la serie global de casos un 10% de lesiones: en niños 1% (hiperdiploide) - 2% (no hiperdiploide) y en adultos, 11% (33,34,35).

### ***TP53 como marcador pronóstico en la LAL-B***

La mejora a lo largo de los últimos treinta años en el pronóstico de la LAL-B tanto en la edad pediátrica (con tasas de cura del 80%) como en la adulta (40-50%) se asocia al desarrollo de la terapia adaptada a la escala de riesgo (2,36). Aquellos enfermos con

pronóstico favorable son tratados con protocolos menos tóxicos, mientras que aquellos regímenes más agresivos son reservados para aquellos con una enfermedad de mayor riesgo (37).

Dentro de los factores pronósticos se destacan las características clínicas, hematológicas y genéticas, como son la edad, leucocitosis, porcentaje de blastos en sangre periférica, inmunofenotipo, afectación del sistema nervioso central, presencia o ausencia de tumor mediastínico, alteraciones citogenéticas y moleculares y enfermedad mínima residual (EMR) en diferentes estadios del tratamiento (5,30,38-40) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Factores pronósticos de LAL-B. Abreviaturas: SNC: sistema nervioso central, iAMP21 (amplificación intracromosomal del cromosoma 21),

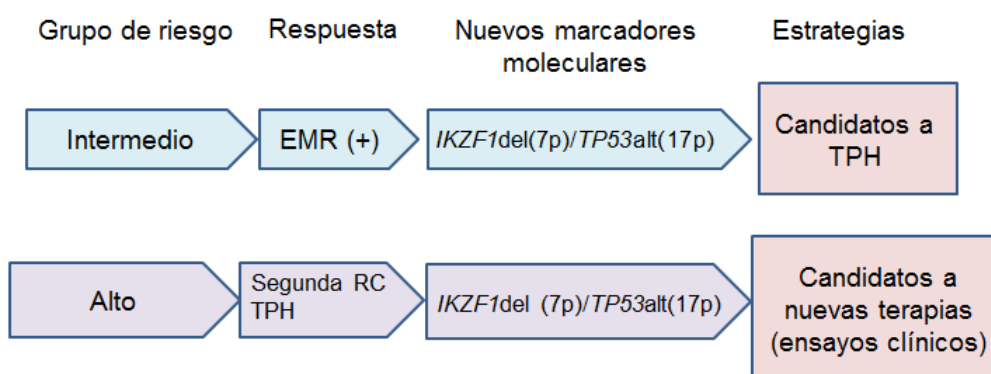
Buen pronóstico	Mal pronóstico
Edad 1 – 10 años	Edad <1 año y >10 años
Leucocitos <30x10 <sup>9</sup> /L	Leucocitos >30x10 <sup>9</sup> /L
Ausencia de compromiso SNC	Fenotipo pro-B
Ausencia de compromiso testicular	Compromiso SNC y testículos (38).
Hiperdiploidía y t(12;21)	t(9;22), reordenamiento de KMT2A(MLL) (11q23) e iAMP21

La EMR, definida como la presencia de 0,01% de células LAL-B, es considerada el predictor independiente más importante de recaída en la LAL-B (41), siendo el riesgo de la misma proporcional al nivel de EMR. Su prevalencia durante la terapia inicial varía dependiendo del subtipo de LAL-B (42,43).

Con base a estos factores pronósticos, se diferencian tres categorías de riesgo en los niños: bajo riesgo (40% de casos, con supervivencia global del 90%), intermedio (45 – 50 %, SG de 70 – 80 %) y alto riesgo (10 – 15%, 50% de SG) (44); y dos en los adultos: riesgo intermedio (20 – 25% de casos con un 60% de SG) y alto (75 – 80%, 30 % de SG) (2,44-46).

Las alteraciones en el gen *TP53* se han designado como un importante marcador de mal pronóstico en las LAL-B tras una primera recaída, principalmente en niños (14,35), asociándose a resistencia al tratamiento de inducción, recaída, corta supervivencia global y libre de evento (27,31,47,48). Por ello debería ser considerado en la re-estratificación del riesgo (18). Aquellos pacientes con riesgo intermedio portadores de alteraciones en *TP53* son propuestos como candidatos a trasplante y aquellos con alto

riesgo son incluidos en ensayos clínicos por el alto riesgo que tienen de sufrir una segunda recaída (Figura 3).



**Figura 3.** Alteraciones en TP53 y las deleciones de IKZF1 como marcadores moleculares de importante impacto pronóstico en las LAL (Modificado de Krentz et al., Leuk 2013). Abreviaturas: EMR, Enfermedad Mínima Residual; TPH, Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos; RC, Remisión Completa.

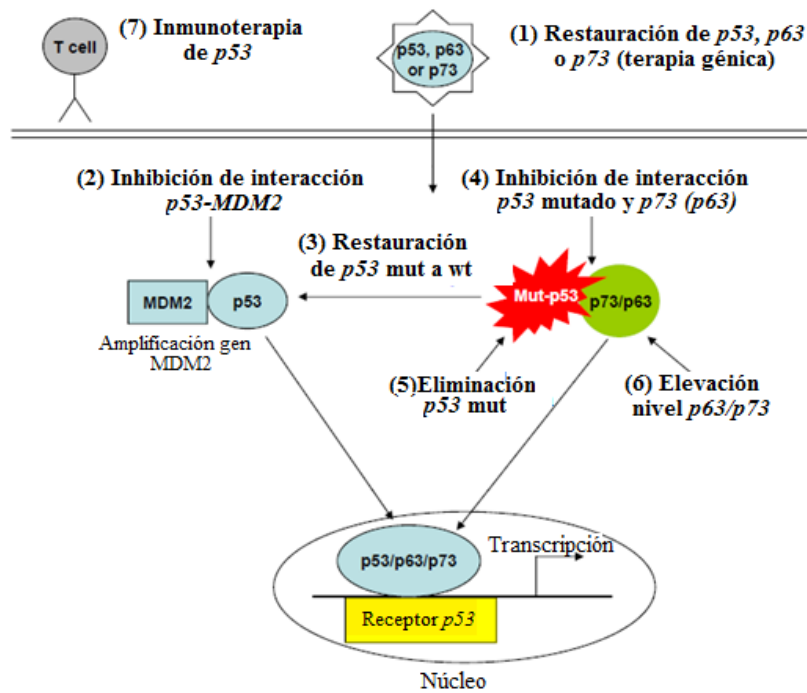
### ***Tratamiento de la LAL-B y nuevas estrategias terapéuticas para contrarrestar las alteraciones en TP53***

En nuestro país los regímenes quimioterápicos para el tratamiento de la LAL-B están basados en los protocolos de la SEHOP (Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica) y PETHEMA (Programa Español de Tratamientos en Hematología) (2,47-49). De manera general, son tres las fases en que se divide el tratamiento de la LAL-B: inducción de la remisión, consolidación (o intensificación) y mantenimiento (38,44,49,50).

Los bloques y dosis de quimioterápicos varían en función de los rasgos biológicos de la célula leucémica, grupo de riesgo (38,51,52), respuesta al tratamiento (EMR), farmacodinámica y farmacogenómica del paciente (12).

Un creciente número de técnicas y agentes terapéuticos está siendo desarrollado para todos los tipos de cáncer, incluyendo la LAL-B (52-55). De todos ellos sólo está aprobado para su uso por la EMA y la FDA el anticuerpo monoclonal BiTE®, Blinatumomab.

Debido al papel esencial que *TP53* juega en la tumorigénesis y resistencia al tratamiento, se han desarrollado diversas técnicas que se muestran en la Figura 4 (17,22). En concreto, dos moléculas antagonistas del regulador *MDM2* llamadas RG7112 (56-58) y nutlin-3 (59), han demostrado eficacia en fases iniciales de estudio en pacientes con LAL-B con *TP53* mutado.



**Figura 4.** Estrategias terapéuticas con TP53 como diana en LAL-B. Abreviaturas: MDM2/HDM2: murine/human double minute 2. Mut: mutado. WT: "wild type". (Modificado de Hong et al. 2014).

### **Secuenciación masiva. 454-GS Junior**

A pesar de los avances logrados gracias a la técnica de secuenciación de "primera generación" Sanger (63), sus limitaciones han hecho necesario el desarrollo de nuevas técnicas de "segunda generación" (*Next Generation Sequencing, NGS*). Éstas permiten el estudio del ADN, ARN y miARN mediante la secuenciación de todo el genoma, del exoma y de fragmentos diana del ADN. Su mayor avance es la capacidad de producir una gran cantidad de datos a un precio reducido.

Particularmente, la plataforma Roche GS-FLX 454 empleada en este trabajo, consigue una longitud de lecturas parecida a la de Sanger (500 pb de longitud), con mayor sensibilidad y rapidez, detectando mutaciones hasta en el 1% de células. El principal inconveniente es la tasa de error a la hora de la lectura de zonas con repeticiones de homopolímeros (2,60-62).

## Justificación

La LAL-B es una neoplasia de gran prevalencia y heterogeneidad, lo que hace necesaria su caracterización a nivel clínico-biológico (etiopatogenia, recaída y motivo de la resistencia al tratamiento). Las alteraciones a nivel del gen *TP53* en pacientes con esta hemopatía se asocian con hipodiploidía, mayor riesgo de recaída, progresión y, por lo tanto, con pronóstico desfavorable.

Las técnicas empleadas para abordar esta patología han sido los arrays, la secuenciación tradicional o Sanger y la secuenciación masiva. Esta última ha probado ser un método eficaz y sensible que consigue mayor sensibilidad en la detección de mutaciones incluso aquellas que se encuentren en bajo porcentaje en las células tumorales.

A pesar del tratamiento adaptado al riesgo, la supervivencia de los enfermos (especialmente niños) que recaen es más reducida que aquella de pacientes que no recaen. Esto hace pensar en la existencia de un factor que explique esta diferencia pronóstica. Krentz (35) afirma que tanto las mutaciones del gen *IKZF1* como de *TP53* representan factores pronósticos moleculares que deberían ser considerados en una clasificación del riesgo de niños con recaída de LAL-B. Estos pacientes deberían, por lo tanto, recibir una intensificación del tratamiento o una intervención.

El análisis del perfil genético del paciente, demostrando la presencia de estas mutaciones, es importante o esencial para incluir a los pacientes en un nuevo grupo de riesgo, individualizando la intensidad del protocolo terapéutico y mejorar así su progresión y supervivencia. Por todo ello, este trabajo pretende analizar mediante secuenciación masiva, las mutaciones del gen *TP53* en pacientes con LAL-B (tanto al diagnóstico como a la recaída) con el fin de relacionar estas alteraciones con parámetros clínicos, supervivencia y respuesta al tratamiento.

## **Objetivo**

Determinar la frecuencia y las mutaciones del gen *TP53* que puedan influenciar la respuesta al tratamiento, progresión y supervivencia de pacientes con LAL-B.

## **Materiales y métodos**

### ***Pacientes***

Se estudiaron 100 pacientes con LAL-B de 18 centros de España remitidos para estudios genéticos al servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca, desde febrero de 1996 hasta febrero de 2014. La mitad eran niños (<18 años).

El diagnóstico de LAL-B se basó en la morfología, el inmunofenotipo y los criterios genéticos (11) para lo que las células de la médula ósea se analizaron con citogenética convencional e hibridación in situ (FISH).

Se registraron la información demográfica, clínica, criterios de riesgo, protocolo de tratamiento, respuesta a la terapia y supervivencia. Los pacientes fueron tratados con protocolos adaptados al riesgo propuestos por las asociaciones PETHEMA y SEHOP (49).

El “Comité Ético de Investigación Clínica, Hospital Universitario de Salamanca” aprobó el estudio, obteniéndose de cada paciente o de sus representantes legales el consentimiento informado antes de ser incluidos (2).

### ***Secuenciación***

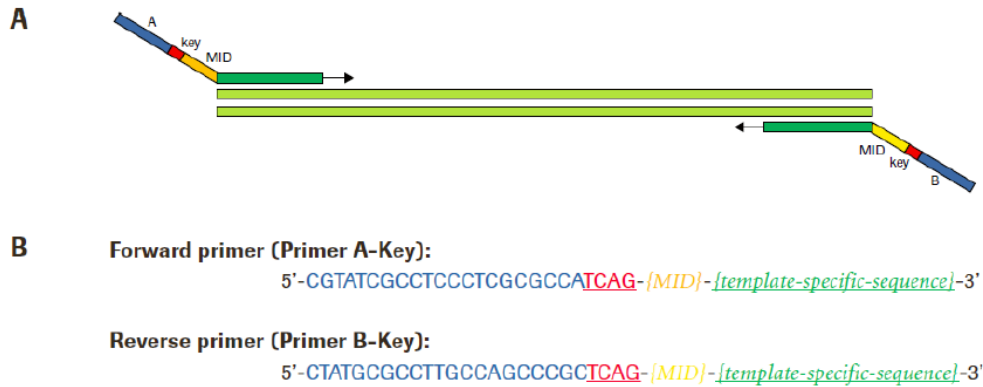
La secuenciación se realizó sobre ADN extraído de células fijadas que habían sido empleadas para el análisis de las alteraciones citogenéticas al momento del diagnóstico, mediante cariotipo y/o FISH.

Para el análisis mutacional del gen *TP53* en pacientes con LAL-B se utilizó la secuenciación masiva de amplicones con el sistema GS Junior 454 (454 Life Sciences, Brandford, CT, USA). Se seleccionaron los exones 4 a 11, transcrito ENST00000269305, debido a que incluyen los codones más frecuentemente mutados en LAL-B (30). Las etapas fueron: preparación y purificación de la librería de amplicones, PCR de emulsión, secuenciación, procesamiento de los datos y análisis, validación de las mutaciones somáticas y análisis estadístico (2,60,61,63).

### ***Preparación y purificación de la librería de amplicones***

Se diseñaron cebadores específicos de cada secuencia con secuencias adaptadoras A o B que permitieron su unión a las bolas magnéticas durante la PCR de emulsión; secuencias clave para conocer el inicio de lectura; MIDs específicos de cada paciente; y secuencias específicas de cada fragmento de ADN diana (Figura 5).





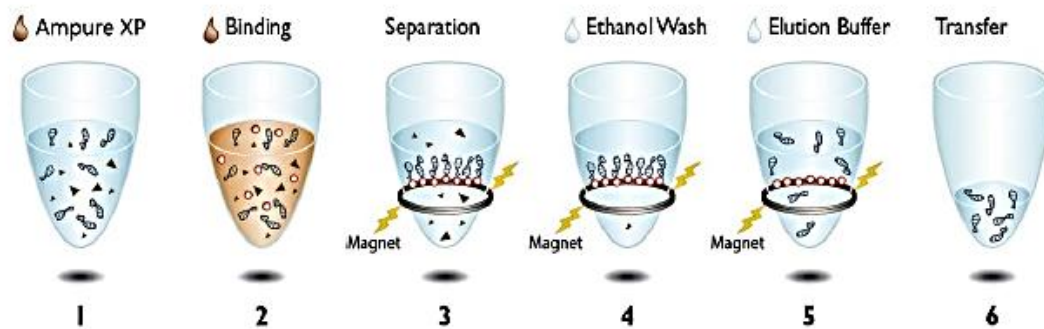
**Figura 5.** Diseño del amplicón (A) y del cebador o primer (B). El cebador contiene una secuencia adaptadora A o B (“forward primer-A” y “reverse primer-B”) (azul), una secuencia clave o “key squence” (rojo), una secuencia MID o “Multiplex Identifiers” (amarillo) y una secuencia específica del fragmento diana (verde).

Se empleó una placa con 96 pocillos, cada uno de los cuales contiene la pareja de cebadores necesarios para la amplificación de un fragmento específico (amplicón). La placa contenía muestras de 11 pacientes, con 11 MID diferentes, uno por cada columna (Tabla 2).

**Tabla 2.** Placa para preparar la librería de amplicones. Cada columna corresponde a un MID distinto, siendo la columna 12 aquella usada como control negativo. Abreviaturas: Pac.: paciente; control: control negativo.

	Paciente	Pac.1	Pac.2	Pac.3	Pac.4	Pac.5	Pac.6	Pac.7	Pac.8	Pac.9	Pac.10	Pac.11	Control
	MID	MID 1	MID 2	MID 3	MID 4	MID 5	MID 6	MID 7	MID 8	MID 9	MID 10	MID 11	MID 12
	Amplicón	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Amplicón 1	TP53_E04	TP53_E04	TP53_E04	TP53_E04	TP53_E04	TP53_E04	TP53_E04	TP53_E04	TP53_E04	TP53_E04	TP53_E04	Control
B	Amplicón 2	TP53_E05	TP53_E05	TP53_E05	TP53_E05	TP53_E05	TP53_E05	TP53_E05	TP53_E05	TP53_E05	TP53_E05	TP53_E05	Control
C	Amplicón 3	TP53_E06	TP53_E06	TP53_E06	TP53_E06	TP53_E06	TP53_E06	TP53_E06	TP53_E06	TP53_E06	TP53_E06	TP53_E06	Control
D	Amplicón 4	TP53_E07	TP53_E07	TP53_E07	TP53_E07	TP53_E07	TP53_E07	TP53_E07	TP53_E07	TP53_E07	TP53_E07	TP53_E07	Control
E	Amplicón 5	TP53_E08	TP53_E08	TP53_E08	TP53_E08	TP53_E08	TP53_E08	TP53_E08	TP53_E08	TP53_E08	TP53_E08	TP53_E08	Control
F	Amplicón 6	TP53_E09	TP53_E09	TP53_E09	TP53_E09	TP53_E09	TP53_E09	TP53_E09	TP53_E09	TP53_E09	TP53_E09	TP53_E09	Control
G	Amplicón 7	TP53_E10	TP53_E10	TP53_E10	TP53_E10	TP53_E10	TP53_E10	TP53_E10	TP53_E10	TP53_E10	TP53_E10	TP53_E10	Control
H	Amplicón 8	TP53_E11	TP53_E11	TP53_E11	TP53_E11	TP53_E11	TP53_E11	TP53_E11	TP53_E11	TP53_E11	TP53_E11	TP53_E11	Control

Los amplicones se purificaron con bolas magnéticas (Beckman Coulter, Krefeld, Germany), eliminando los de tamaño <100 pb y seleccionando sólo aquellos con un tamaño adecuado para la secuenciación (Figura 6).

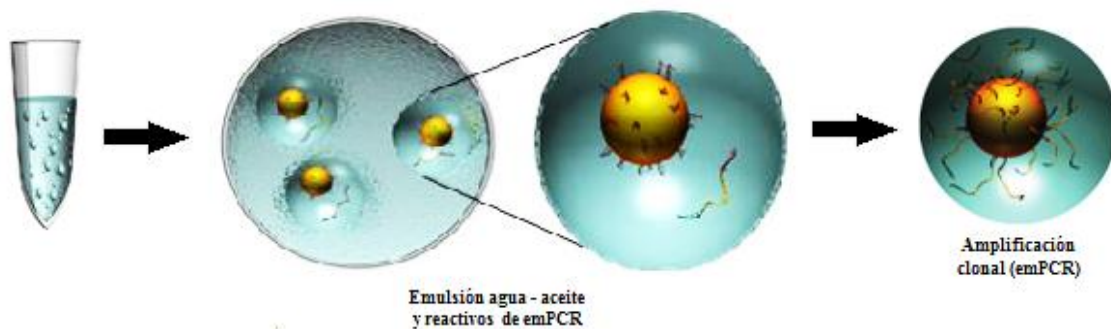


**Figura 6.** Purificación de la librería de amplicones con bolas magnéticas AMPure.

La librería de amplicones purificada se cuantificó con el Kit dsDNA HS Qubit® Fluorometric Quantitation Assay (Life Technologies) y su calidad se evaluó con el sistema “2100 Bioanalyzer” (Agilent, Palo Alto, CA, EEUU).

**PCR de emulsión (emPCR)**

La librería de amplicones se diluyó a una concentración de  $2 \times 10^6$  moléculas por cada  $\mu\text{l}$  y se sometió a una PCR de emulsión usando el kit Gs Junior titanium emPCR (Lib-A) (Roche Applied Science). Se generó una emulsión agua-aceite de millones de gotas y se inmovilizó un único fragmento DNA en cada una de las gotas, donde se llevó a cabo una reacción de amplificación individual. Tras la PCR, en cada gota de la emulsión hubo una bola con 10 millones de fragmentos amplificados (Figura 7).



**Figura 7.** PCR de emulsión.

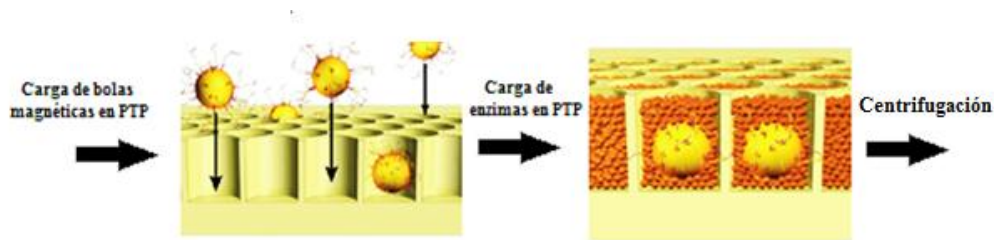
Para recuperar las bolas después de la emPCR, se rompieron las emulsiones de aceite. A continuación se seleccionaron aquellas con el ADN amplificado, separándose de aquellas en que no se había producido amplificación. Para ello se usó una solución de NaOH para desnaturalizar el DNA, se añadieron los cebadores biotinilados que se unirían al DNA y, por último, se añadieron unas bolas magnéticas con estreptavidina, un compuesto altamente afín a la biotina. Con la ayuda de un imán se realizó la separación (Figura 8).



**Figura 8.** Proceso de enriquecimiento de las bolas magnéticas con cebadores de biotina y bolas magnéticas cubiertas de estreptavidina.

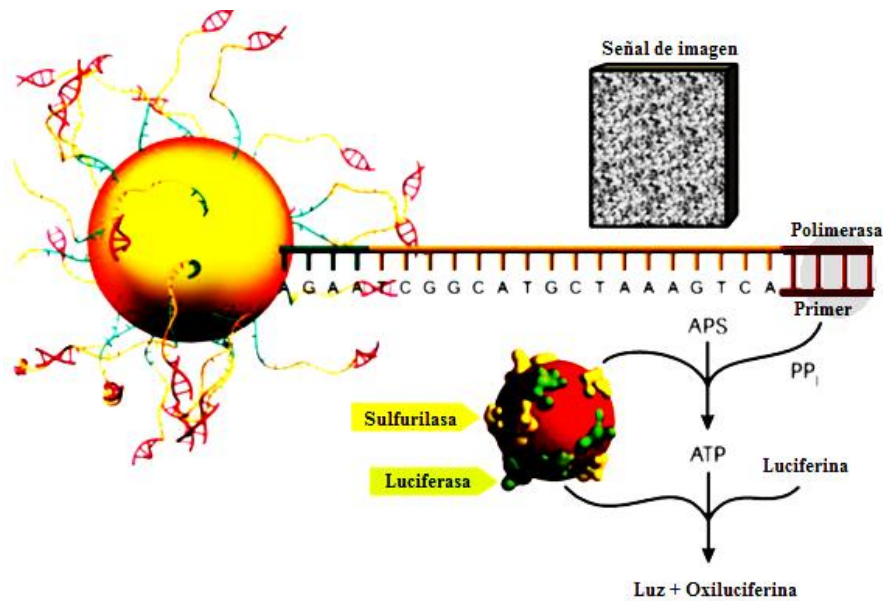
### ***Secuenciación 454-GS Junior***

Las bolas que contenían los fragmentos amplificados se introdujeron en la placa PicoTiterPlate (PTP), formada por una lámina de fibra óptica que contiene millones de pocillos y que está en contacto con un dispositivo de imagen unido a su vez a otro que captura de la base de cada pocillo los fotones de forma individual. El diámetro de cada uno de ellos (44  $\mu\text{m}$ ) permitió el depósito de una única bola junto a las enzimas necesarias para la pirosecuenciación (polimerasa, sulfurilasa, luciferasa y apirasa). Una vez añadidas las capas de bolas y enzimas, se centrifugó para conseguir el depósito de las bolas en cada uno de los pocillos (Figura 9).



**Figura 9.** Depósito de las bolas con ADN amplificado en la placa PTP.

Durante la pirosecuenciación (Figura 10), los nucleótidos se añadieron de forma secuencial y en un orden específico. Cuando uno de los nucleótidos era complementario al de la secuencia de ADN, se generaba una molécula de pirofosfato (PPi) que era transformada por la sulfurilasa en ATP. Este ATP era empleado por la luciferasa para oxidar a la luciferina, produciendo la luz que era capturada por el dispositivo de la base de cada pocillo. La cantidad de luz emitida era proporcional a la de nucleótidos incorporados. La aspirasa eliminó los nucleótidos que no se habían incorporado a la secuencia.



**Figura 10.** Reacción de pirosecuenciación. Abreviaturas: PPi, molécula de pirofosfato.

### ***Procesamiento de los datos y análisis***

Los datos obtenidos de la carrera de secuenciación de 454 GS Junior se procesaron con el software “GS Variant Analyzer Software 2.5.3 (454 Life Sciences, Roche Applied Science)” y “Sequence Pilot Software for Genetic Analysis, version 3.4.2 (JSI Medical Systems, Kippenheim, Germany)”.

El control de calidad se incluyó para alcanzar más de 140 lecturas de cada amplicón (70 lecturas como mínimo en cada dirección, “forward and reverse”). El punto de corte de mutación correspondió a variantes que estuvieran presentes en  $\geq 2\%$  de células tumorales.

Todas las mutaciones somáticas se buscaron en la base de datos COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) e IARC TP53 (<http://p53.iarc.fr/p53Sequences.aspx>) (23). Los polimorfismos (incluidos en la base de datos dbSNP build 138) fueron excluidos (2).

### ***Validación de las mutaciones somáticas***

Una vez descartada la presencia de polimorfismos (SNP), las variantes encontradas en la secuenciación se validaron de forma independiente mediante la secuenciación convencional Sanger de una nueva PCR del ADN no amplificado y/o mediante una nueva carrera de resecuenciación (2) debido a la baja carga mutacional de alguna de ellas (<10%).

### *Análisis estadístico*

Los resultados obtenidos de la secuenciación se analizaron mediante test estadísticos para confirmar la asociación o diferencias significativas entre las mutaciones del gen *TP53* y la clínica y supervivencia de los pacientes.

Las variables cuantitativas se describieron con la mediana y el rango, mientras que las categóricas, con la frecuencia y el porcentaje de cada sujeto. La asociación de dos variables cualitativas se analizó con las pruebas de “Chi – cuadrado” o test de Fisher, mientras que las continuas, con el test no paramétrico de U de Mann – Whitney o el paramétrico de la “T de Student”. Se consideró como umbral de significación  $p$  valor  $<0,05$ . El análisis de Kaplan – Meier se empleó para mostrar la relación entre las mutaciones y la supervivencia global (SG), libre de recaída (SLR) y libre de evento (SLE), siendo validados los resultados con el test de “log-rank”, con una  $p$  valor  $<0,05$ . La SG se definió desde el diagnóstico hasta el fallecimiento (los pacientes vivos fueron considerados como “censurados” para el análisis). La SLR se midió desde la remisión completa a la recaída, considerando a los muertos o vivos “censurados”. La SLE se definió desde el diagnóstico al primer evento, incluyendo la muerte durante la terapia de inducción, el fallo de la remisión, recaída, muerte durante la remisión o el desarrollo de una neoplasia maligna secundaria. Las observaciones sobre los pacientes sin eventos se censuraron en la fecha del último contacto (2).

Se utilizó el modelo de regresión Cox para estimar el “hazard ratio” (HR) y el intervalo de confianza del 95% de los factores de riesgo en el análisis multivariante.

Los análisis fueron llevados a cabo empleando la versión 22.0 de SPSS (IBM®).

## Resultados

### *Características de los pacientes*

La Figura suplementaria 1 muestra los datos clínicos de los pacientes incluidos en este estudio. La mediana de edad al diagnóstico fue de 19 años (rango 0-84), 4 años en niños (rango 0-16) y 35 años en los adultos (rango 19-84). Los pacientes de sexo masculino se asociaron con la edad adulta (36% vs.66%,  $p=0.03$ ).

La serie de pacientes reproduce las características comúnmente conocidas en los pacientes con LAL-B. El 69% de los pacientes fueron de fenotipo LAL pre-B o común. El porcentaje medio de blastos presentes en médula ósea fue de 84% (rango 35-97). El 26% de los pacientes presentaban una citogenética normal. La presencia de alteraciones de mal pronóstico como  $t(9;22)$  (Ph+),  $t(v; 11q23)$  o reordenamiento *KMT2A (MLL)* e hipodiploidía fueron más infrecuentes en los niños que en los adultos (16%, vs. 70%  $p<0,0001$ ). Todos los pacientes con fusión *ETV6-RUNX1* fueron niños (20% vs. 0%,  $p=0,01$ ). La alteración *BCR-ABL1* era más frecuente en adultos (4% vs. 48%,  $p<0,0001$ ).

Los niños tuvieron mayor supervivencia global (SG 5 años: 84% vs. 41%,  $p<0,0001$ ), supervivencia libre de evento (SLE 5 años: 78% vs. 32%,  $p<0,0001$ ) y supervivencia sin recaída (SLR 5 años: 90% vs. 61%,  $p=0,001$ ) con respecto a los adultos.

### *Características de la secuenciación*

Se generaron 880 amplicones para la caracterización mediante secuenciación masiva. Para cada amplicón se obtuvo una mediana de 771,5 lecturas bidireccionales (rango extremos 107-5278), lo que permitió una cobertura suficiente para detectar de forma sensible las variantes con un límite de detección de un 2%. Este estudio permitió evaluar el rango de carga mutacional de los pacientes con LAL-B. Así, la mediana de carga mutacional fue de 49,75% (rango: 3,5-86%). Es importante resaltar que 3/12 (25%) variaciones tuvieron una carga mutacional  $\leq 10\%$ , por lo que no habrían sido detectadas mediante la secuenciación Sanger.

### *Frecuencia y caracterización de las mutaciones somáticas en TP53 en la serie de estudio*

Once de los 100 enfermos (11%) (3 niños y 8 adultos) tenían 12 mutaciones al momento del diagnóstico (Figura S2 y S5). Todas estas mutaciones fueron validadas

mediante Sanger y/o una carrera de secuenciación independiente particularmente para aquellas mutaciones con carga mutacional menor del 12% (Figura S6). La presencia de mutaciones de *TP53* fue mayor en adultos que en niños (n=3, 6% vs. n=8, 16%;  $p=0,110$ ). Es de destacar que un adulto tuvo dos mutaciones en *TP53* con distinta carga mutacional (p.Y220C: 5% células tumorales y p.T125R: 73,5% de células tumorales). El 75% de los pacientes mutados se incluyeron en grupos de alto riesgo. Sólo una mutación no estaba descrita en la base de datos COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) y/o en la base de datos IARC *TP53* (<http://p53.iarc.fr/p53Sequences.aspx>) (23). Las mutaciones de *TP53* incluyeron 9 sin sentido (*missense*), 1 delección-inserción (in/del) y 2 mutaciones que afectaban al *splicing*.

Las alteraciones citogenéticas de los pacientes con mutación de *TP53* fueron: hiperdiploidía (n=4), hipodiploidía (n=1), traslocación *TCF3(E2A)-PBX1* (n=1), *KMT2A(MLL)-R* (n=1), y otras alteraciones tales como una traslocación t(7;15) (n=1) y 47,XY,+4,-6,i(6)(p10),add(11)(q23),+mar[8]/46,XY[12] (n=1). Dos pacientes tenían citogenética normal.

#### ***Asociación de las mutaciones de TP53 con parámetros clínicos***

Las mutaciones se asociaron con subtipos genéticos, criterios clínicos y factores de riesgo usados para estratificar a los pacientes con LAL-B (Figura S3). Todos los pacientes de la serie global con LAL-B que presentaban mutación eran *ETV6/RUNX1* y *BCR/ABL1* negativos. Las mutaciones en *TP53* se asociaron con citogenéticas de mal pronóstico ( $p=0,011$ ), una edad  $\geq 55$  años ( $p=0,023$ ) y recaída ( $p=0,01$ ).

#### ***Asociación de las mutaciones de TP53 con la supervivencia***

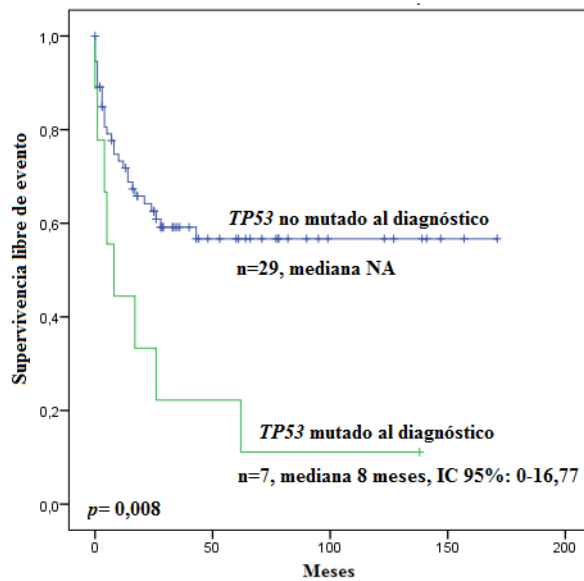
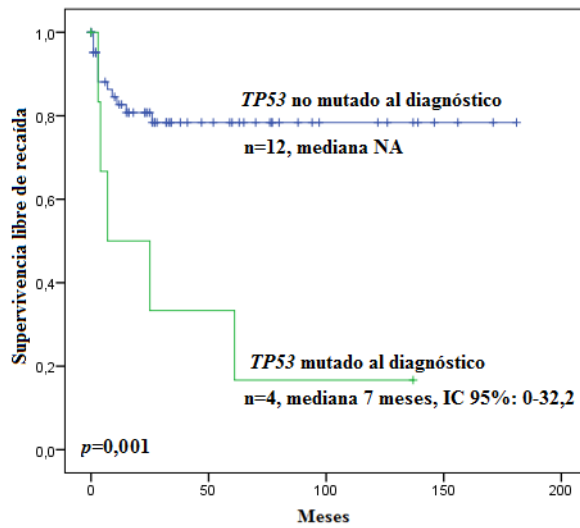
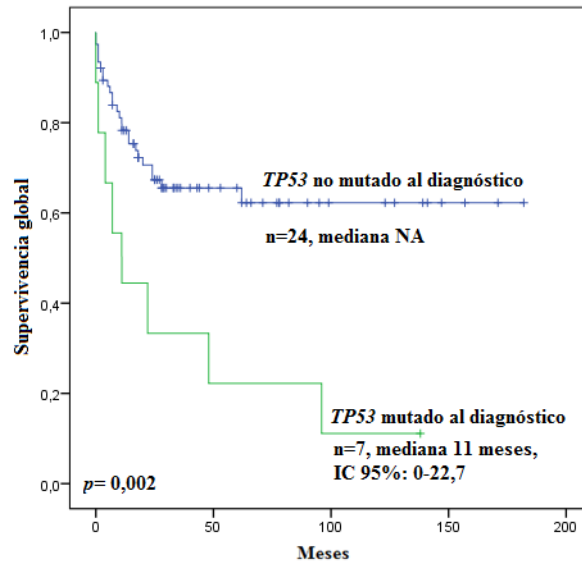
En la serie global de pacientes, la mutación en *TP53* se asoció con menores tasas de supervivencia: SG 5 años (22% vs. 68%,  $p=0,002$ ), SLR 5 años (43% vs. 82%,  $p=0,001$ ) y SLE 5 años (22% vs. 61%,  $p=0,008$ ) (Figura 11). En lo que respecta al análisis de supervivencia de los niños, la mutación del gen *TP53* se asoció a una corta SLR (SLR a los 5 años, 67% vs. 92%,  $p=0,01$ ) (Figura 12). En cuanto a la cohorte de adultos, todos aquellos con mutación de *TP53* fallecieron antes de los 5 años (SG, 0% vs. 49%,  $p=0,032$ ) (Figura 12).

Las categorías clínicas asociadas a una SG más corta fueron el grupo de alto riesgo (36% vs. 81%,  $p<0,0001$ ), la mala respuesta al tratamiento inicial, debida a refractariedad o recaída (17% vs. 59%,  $p<0,0001$ ), la recaída temprana (18% vs. 0%,  $p=0,027$ ) y la edad de los niños de 1-10 años (89% vs. 25%,  $p=0,001$ ).

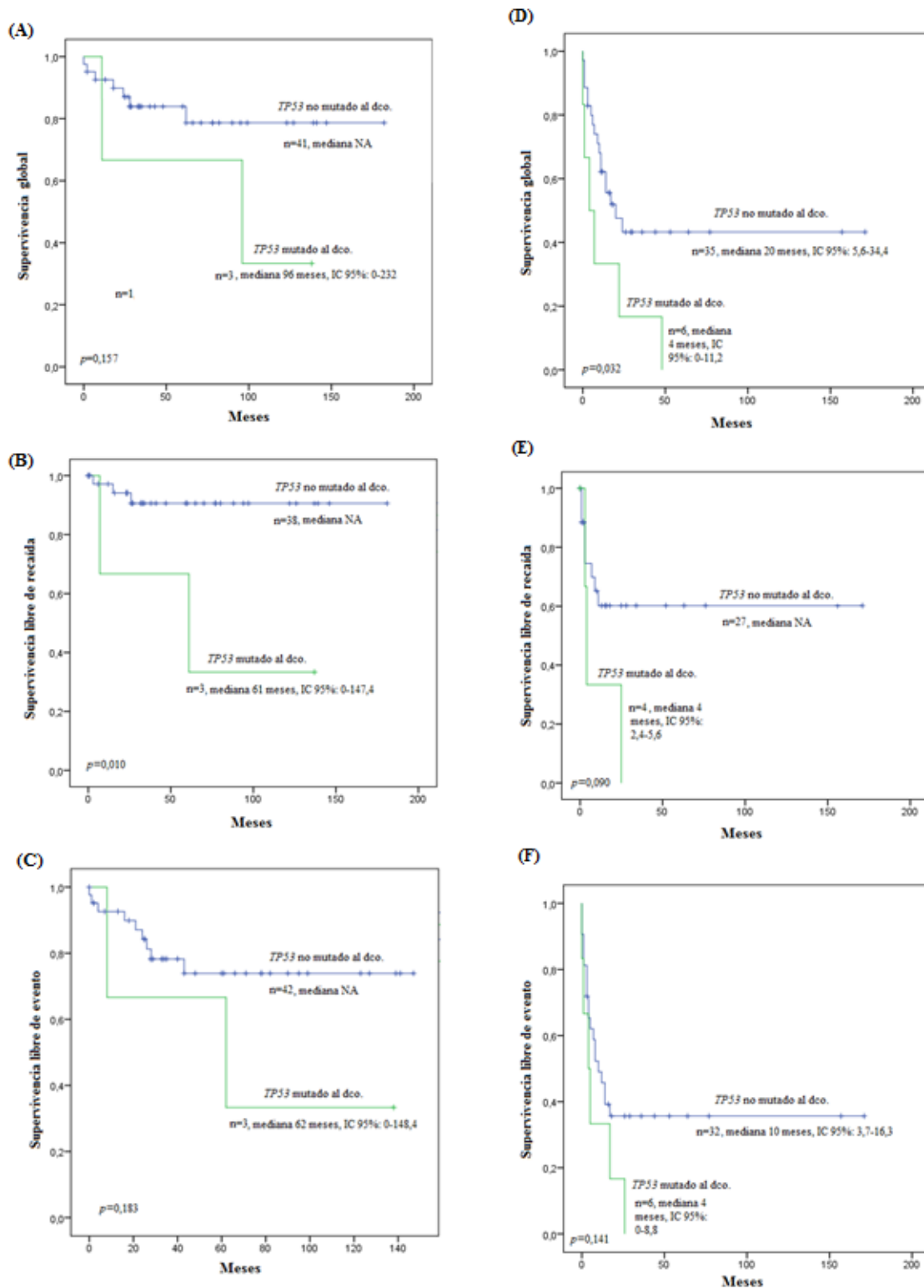
Las características asociadas con una corta SLR fueron: pertenecer al grupo de alto riesgo (56% vs. 90%,  $p<0,0001$ ), la mala respuesta al tratamiento inicial (0% vs. 73%,  $p<0,0001$ ), la  $EMR \geq 0,01\%$  tras inducción (43% vs. 85%,  $p=0,001$ ), la menor duración de la primera RC (0% vs. 25%,  $p=0,001$ ) y la edad en niños de 1-10 años (33% vs. 50%,  $p<0,0001$ ).

Por último, los parámetros asociados a una SLE más corta fueron el grupo de alto riesgo (28% vs. 70%,  $p<0,0001$ ), la  $EMR \geq 0,01\%$  tras la inducción (29% vs. 62%,  $p=0,012$ ), la menor duración de la primera RC (0% vs. 25%,  $p=0,001$ ), tiempo de recaída (0% vs. 50%,  $p=0,011$ ) y la edad de los niños de 1-10 años (80% vs. 20%,  $p<0,0001$ ) (Figura S4).





**Figura 11.** Curvas Kaplan - Meier de SG, SLR y SLE de la serie global de pacientes con LAL-B en relación a mutaciones en el gen *TP53* (N=100). Abreviaturas: SG: supervivencia global; SLR: supervivencia libre de recaída; SLE: supervivencia libre de evento.



**Figura 12.** Curvas Kaplan - Meier de SG, SLR y SLE de niños (A, B y C) y adultos (D, E y F) con LAL-B en relación a mutaciones en el gen *TP53*. Abreviaturas: SG: supervivencia global; SLR: supervivencia libre de recaída; SLE: supervivencia libre de evento.

El análisis multivariante reveló que la presencia de mutaciones en el gen *TP53* era un factor de mal pronóstico independiente con respecto a la supervivencia global y supervivencia libre de recaída. Cabe mencionar que el grupo de riesgo afectó

negativamente a la supervivencia global, libre de recaída y libre de evento (Tabla 3), seleccionándose como factor pronóstico independiente respecto a las dos primeras.

Las mutaciones de *TP53* al diagnóstico se asociaron con menor supervivencia global y ésta a su vez se seleccionó como factor pronóstico independiente (HR 3,0; IC 1,1-8,4;  $p=0,031$ ). Se asoció a menor supervivencia libre de recaída, que también fue seleccionada como factor pronóstico independiente (HR 7,5; IC 1,3-44,4;  $p=0,026$ ). Es de notar, que aunque las mutaciones de *TP53* afectaron a una supervivencia libre de evento más corta, esto no fue seleccionado como un factor pronóstico independiente (HR 2,3; IC 0,8-6,3;  $p=0,115$ ).

**Tabla 3.** Análisis multivariante de los factores de riesgo en relación con la SG, SLR y SLE en la serie global de pacientes con LAL-B mediante Regresión Cox (N=100). Abreviaturas: HR (Hazard Ratio); IC (Intervalo de confianza); SG: supervivencia global; SLR: supervivencia libre de recaída; SLE: supervivencia libre de evento.

Variable	Categoría	Análisis univariante	Análisis multivariante		
			HR	IC (95%)	p
<b>SG</b>					
<i>TP53 al diagnóstico</i>	<i>Mutado</i>	<b>0,002</b>	3,0	1,1-8,4	<b>0,031</b>
<i>Grupo de riesgo</i>	<i>Alto riesgo</i>	<b>&lt;0,0001</b>	0,1	0,0-0,3	<b>&lt;0,0001</b>
<i>EMR día +33</i>	$\geq 0.01\%$	0,158	1,6	0,7-3,9	0,281
<b>SLR</b>					
<i>TP53 al diagnóstico</i>	<i>Mutado</i>	<b>0,001</b>	7,5	1,3-44,4	<b>0,026</b>
<i>Grupo de riesgo</i>	<i>Alto riesgo</i>	<b>&lt;0,0001</b>	0,1	0,0-0,6	<b>0,010</b>
<i>EMR día +33</i>	$\geq 0.01\%$	<b>0,001</b>	5,9	1,6-20,8	<b>0,006</b>
<i>Leucocitos en sangre periférica</i>	$>30 \times 10^9/L$	0,074	0,2	0,6-16,5	0,155
<b>SLE</b>					
<i>TP53 al diagnóstico</i>	<i>Mutado</i>	<b>0,008</b>	2,3	0,8-6,3	0,115
<i>Grupo de riesgo</i>	<i>Alto riesgo</i>	<b>&lt;0,0001</b>	0,1	0,1-0,4	<b>&lt;0,0001</b>
<i>EMR día +33</i>	$\geq 0.01\%$	<b>0,012</b>	2,4	1,1-5,6	<b>0,039</b>

## Discusión

### ***El porcentaje de mutación de TP53 es similar al observado en otros estudios***

La presencia de mutaciones en el gen *TP53* en las LAL ha sido ampliamente estudiada, pero pocos han incluido cohortes de adultos y niños simultáneamente. En nuestro estudio se evaluaron 100 pacientes (50 niños y 50 adultos) con el objetivo de determinar la influencia de estas aberraciones genéticas en la respuesta al tratamiento, progresión y supervivencia de pacientes con LAL-B.

Mediante secuenciación masiva se identificó que el 11% de los pacientes presentaba mutación en *TP53* al momento del diagnóstico y 4% en la recaída, lo cual se corresponde con la frecuencia mutacional publicada en cohortes de LAL-B (30, 64). Otros estudios propusieron un mayor porcentaje de alteraciones de *TP53* en LAL-B, puesto que no sólo centraron su atención en las mutaciones y deleciones, sino que incluyeron la hipermetilación del promotor (18,27,35,64).

### ***Las mutaciones de TP53 se asocian con refractariedad y supervivencia más corta***

De entre las mutaciones detectadas, 9 fueron sin sentido (*missense*), una in/del, mientras que dos afectaban a los mecanismos de *splicing*. Cuatro enfermos tenían un cariotipo hiperdiploide, uno al grupo de baja hipodiploidía, otro al *TCF3(E2A)-PBX1* y reordenamiento *KMT2A (MLL)* (18). Todas se describieron en bases de datos (COSMIC y *TP53* website <http://p53.fr>) y estudios (64) excepto la mutación c.817\_821 delinsGACCC. Ninguna de las aberraciones de la recaída estaban descritas, excepto la c.818G>C (23).

Estudios previos afirman que las mutaciones del gen *TP53* suponen refractariedad, mayor probabilidad de recaída y reducción de la supervivencia global así como de la libre de evento (18,30,65,66,68,69). La alta frecuencia mutacional en los pacientes adultos ( $\geq 55$  años) podría ser la razón del mal pronóstico de los mismos (64). Por ello, la mutación del gen *TP53* debería ser considerado un marcador pronóstico relevante en la estratificación del riesgo, de gran importancia en la estadificación de la LAL-B a la recaída en la infancia (18,30,35). En nuestro estudio se corroboran estas afirmaciones.

La realización de un screening mutacional del gen *TP53* en pacientes con LAL-B permitiría su inclusión en un grupo de riesgo e individualización del tratamiento. Más

investigación será necesaria para caracterizar esta alteración en los pacientes al diagnóstico, durante el tratamiento y evolución (12,18,27,38,47,50,54,70,71).

Nuestro estudio muestra cómo la secuenciación de segunda generación es un método rápido, sensible y eficaz en la detección de alteraciones genéticas (72,73,74): 3/12 (25%) variaciones al diagnóstico tuvieron una carga mutacional  $\leq 10\%$  por lo que no habrían sido detectadas mediante la secuenciación Sanger.

## Conclusiones

1. El 11% de los pacientes con LAL-B presentaba mutación en *TP53* al momento del diagnóstico. Todas ellas fueron más frecuentes en adultos (de  $\geq 55$  años) que en niños y se asociaron con peor pronóstico y recaídas más frecuentes.
2. La presencia de mutaciones en *TP53* se asoció con una supervivencia global, supervivencia libre de recaída y supervivencia libre de evento acortadas.
3. La secuenciación permitió identificar la mutación del gen *TP53* como un factor pronóstico independiente de la LAL-B respecto a la supervivencia global y a la supervivencia libre de recaída. Debe ser considerado como un importante biomarcador en la estratificación del riesgo del paciente y en la aplicación de protocolos terapéuticos más agresivos e individualizados.
4. La secuenciación masiva (NGS) es un método sensible, eficaz y rápido en la detección de estas alteraciones genéticas: el 25% de las variaciones al diagnóstico de este estudio tuvieron una carga mutacional  $\leq 10\%$  por lo que no habrían sido observadas mediante la secuenciación Sanger.

## **Bibliografía**

1. Roberts KG, Mullighan CG. Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: insights and treatment implications. *Nat Rev Clin Oncol.* 2015;12:344-57.
2. Forero RM, Hernández M. and Hernández Rivas J.M. Genetics of acute lymphoblastic leukemia. In: Guenova M. Balatzenko G. *InTech.* 2013:1-37.
3. San Miguel JF S-GF. *Hematología. manual básico razonado.* Tercera ed. Barcelona: Elsevier. 2009.
4. Graux C. Biology of acute lymphoblastic leukemia (ALL): clinical and therapeutic relevance. *Transfus Apher Sci.* 2011;44:183-9.
5. Bhojwani D, Yang JJ, Pui CH. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am.* 2015;62:47-60.
6. Rodríguez-Abreu D, Bordoni A, Zucca E. Epidemiology of hematological malignancies. *Ann Oncol.* 2007;18 Suppl 1:i3-i8.
7. Zuckerman T, Rowe JM. Pathogenesis and prognostication in acute lymphoblastic leukemia. *Prime Rep.* 2014;6:59.
8. Golub TR. Genomics: global views of leukaemia. *Nature reviews Clinical oncology.* 2007;446:739-40.
9. Hunger SP, & Mullighan, C. G. . Redefining ALL classification: toward detecting high-risk ALL and implementing precision medicine. 2015; 125:3977-88
10. Bennett JM, Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. a, Gralnick, H. R., & Sultan, C. . Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *British Journal of Haematology.* 976;33: 451-8.
11. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009;114:937-51.
12. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet.* 2013;381:1943-55.
13. Zhou Y, You MJ, Young KH, Lin P, Lu G, Medeiros LJ, et al. Advances in the molecular pathobiology of B-lymphoblastic leukemia. *Hum Pathol.* 2012;43(9):1347-62.
14. Mullighan CG. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest.* 2012;122:3407-15.

15. Agirre X, Novo, F. J., Calasanz, M. J., Larráyo, M. J., Lahortiga, I., Valgañón, M., Vizmanos, J. L. TP53 Is Frequently Altered by Methylation, Mutation, and/or Deletion in Acute Lymphoblastic Leukaemia. . *Molecular Carcinogenesis*. 2003;38: 201–8.
16. Shlien A. Genomic DNA Copy Number Variations and Cancer: Studies of Li-Fraumeni Syndrome and its Variants by Genomic DNA Copy Number Variations and Cancer. *Genome Med*. 2009; 1: 62.
17. Hong B, van den Heuvel, a P. J., Prabhu, V. V, Zhang, S., & El-Deiry, W. S. Targeting Tumor Suppressor p53 for Cancer Therapy: Strategies, Challenges and Opportunities. *Current Drug Targets*. 2014;15:80–9.
18. Hof J, Krentz, S., Van Schewick, C., Körner, G., Shalapur, S., Rhein, P.,Kirschner-Schwabe, R. Mutations and deletions of the TP53 gene predict nonresponse to treatment and poor outcome in first relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29:3185-93.
19. Ognjanovic S, Martel, G., Manivel, C., Olivier, M., Langer, E., & Hainaut, P. Low prevalence of TP53 mutations and MDM2 amplifications in pediatric rhabdomyosarcoma. *Sarcoma*. 2012;7.
20. Whibley C, Pharoah, P. D. P., & Hollstein, M. P53 Polymorphisms: Cancer Implications. *Nature Reviews Cancer*. 2009;9:95–107.
21. Perim A, et al. CXCL12 and TP53 genetic polymorphisms as markers of susceptibility in a Brazilian children population with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Mol Biol Rep*. 2013;40:4591-6
22. Morris LGT, & Chan, T. A. Therapeutic Targeting of Tumor Suppressor Genes *HHS Public Access*. 2015;121:1357–68.
23. Leroy B, Anderson M, Soussi T. TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade. *Hum Mutat*. 2014;35:672-88.
24. Gump J, Mcgavran, L., Wei, Q., & Hunger, S. P. Acute Lymphoblastic Leukemia. 2001;23.
25. Holmfeldt L *et al.*, The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. 2014;45:242–52.
26. Mullighan CG. Genomic characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*. 2013;50:314-24.



27. Chiaretti S, Gianfelici V, Ceglie G, Foa R. Genomic characterization of acute leukemias. *Med Princ Pract.* 2014;23:487-506.
28. Woo JS, Alberti, M. O., & Tirado, C. A. Childhood B-acute lymphoblastic leukemia: a genetic update. 2014;3:1–14.
29. Olivier M, Hollstein, M., & Hainaut, P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 2010;2(1).
30. Iacobucci I, Papayannidis C, Lonetti A, Ferrari A, Baccarani M, Martinelli G. Cytogenetic and molecular predictors of outcome in acute lymphocytic leukemia: recent developments. *Curr Hematol Malig Rep.* 2012;7:133-43.
31. Freier K, Knoepfle, K., Flechtenmacher, C., Pungs, S., Devens, F., Toedt, G, Radlwimmer, B. Recurrent copy number gain of transcription factor SOX2 and corresponding high protein expression in oral squamous cell carcinoma. *Genes, Chromosomes & Cancer.* 2010;49:9-16.
32. Chiaretti S, Brugnoletti, F., Tavolaro, S., Bonina, S., Paoloni, F., Marinelli, M, Foà, R. TP53 mutations are frequent in adult acute lymphoblastic leukemia cases negative for recurrent fusion genes and correlate with poor response to induction therapy. *Haematologica.* 2013;98:59–61.
33. Okamoto R, Ogawa, S., Nowak, D., Kawamata, N., Akagi, T., Kato, M., ... Phillip Koeffler, H. Genomic profiling of adult acute lymphoblastic leukemia by single nucleotide polymorphism oligonucleotide microarray and comparison to pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2010;95:1481–8.
34. Hof J, Krentz, S., Van Schewick, C., Körner, G., Shalapour, S., Rhein, P, Kirschner-Schwabe, R. Mutations and deletions of the TP53 gene predict nonresponse to treatment and poor outcome in first relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2011;29:3185–93.
35. Krentz S1, Hof J, Mendioroz A, Vaggopoulou R, Dörge P, Lottaz C, Engelmann JC, Groeneveld TW, Körner G, Seeger K, Hagemeyer C, Henze G, Eckert C, von Stackelberg A, Kirschner-Schwabe R. Prognostic value of genetic alterations in children with first bone marrow relapse of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2013;27:295-304
36. Usvasalo A, Elonen, E., Saarinen-pihkala, U. M., Rätty, R., Harila-saari, A., Koistinen, P., Hollmén, J. . Prognostic classification of patients with acute

lymphoblastic leukemia by using gene copy number profiles identified from array-based comparative genomic hybridization data. *Leukemia Research*. 2010;34:1476–82.

37. Hamerschlak N. Leukemia: genetics and prognostic factors. *Jornal de Pediatria*. 2008;0.

38. Cooper SL, Brown PA. Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am*. 2015;62:61-73.

39. Vrooman LM, Silverman LB. Childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors. *Curr Opin Pediatr*. 2009;21:1-8.

40. Bokemeyer A, Eckert, C., Meyr, F., Koerner, G., Stackelberg, A. Von, & Ullmann, R. . Copy number genome alterations are associated with treatment response and outcome in relapsed childhood ETV6/RUNX1-positive acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2013;99.

41. Izraeli S. Application of genomics for risk stratification of childhood acute lymphoblastic leukaemia: from bench to bedside. *Br J Haematol*. 2010 Oct;151:119-31.

42. Campana D. Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010;2010:7-12.

43. Harrison C. New genetics and diagnosis of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Rep*. 2011;3 Suppl 2:e4.

44. Pui C, Campana, D., & Evans, W. E. Reviews Childhood acute lymphoblastic leukaemia – current status and future perspectives. *Lancet Oncol*. 2001 Oct;2:597-607.

45. Pui C-H, Carroll, W. L., Meshinchi, S., & Arceci, R. J. . Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011; 29:551–65.

46. Bhojwani D, & Pui, C.-H. Relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet Oncology*. 2013;14:205–17.

47. Ribera J, Ribera, J., & Genescà, E. Treatment of Adolescent and Young Adults with Acute Lymphoblastic Leukemia. 2014. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2014; 6: e2014052.

48. Of O. Comparison of the Results of the Treatment of Adolescents and Young Adults With Standard-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia With the Programa Español de Tratamiento en Hematología Pediatric-Based Protocol ALL-96 2008;26:1843–9.

49. Serra IB, Pedi, U., Creu, S., Pau, S., Antoni, S., & Claret, M. Tratamiento de la Leucemia Aguda Linfoblástica de Nuevo Diagnóstico. 2014: 1–261.

50. Gökbuget N, & Hoelzer, D. Treatment of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. 2006;49:133-41.
51. Harrison CJ. Targeting signaling pathways in acute lymphoblastic leukemia: new insights. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2013:118-25.
52. Kebriaei P, & Poon, M. L. Future of Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL)—Potential Role of Immune-Based Therapies. Current Hematologic Malignancy Reports. Current hematologic malignancy reports. 2015: 76-85.
53. Douer D. Will novel agents for ALL finally change the natural history? . Best Practice & Research Clinical Haematology. 2014;27:247–58.
54. Annesley CE, & Brown, P. Novel agents for the treatment of childhood acute leukemia. Therapeutic Advances in Hematology. 2015;6:61–79.
55. Gowda C, Dovat S. Genetic targets in pediatric acute lymphoblastic leukemia. Adv Exp Med Biol. 2013;779:327-40.
56. Dennis MK, Field, A. S., Burai, R., Ramesh, C., Whitney, K., Bologna, C. G, Prossnitz, E. R. Initial Testing of the MDM2 Inhibitor RG7112 by the Pediatric Preclinical Testing Program. NIH Public Access. 2012;127:358–66.
57. Vu B, Wovkulich, P., Pizzolato, G., Lovey, A., Ding, Q., Jiang, N. Graves, B. Discovery of RG7112: A small-molecule MDM2 inhibitor in clinical development. ACS Medicinal Chemistry Letters. 2013;4:466–9.
58. Iancu-Rubin C, Mosoyan, G., Glenn, K., Gordon, R. E., Nichols, G. L., & Hoffman, R. Activation of p53 by the MDM2 inhibitor RG7112 impairs thrombopoiesis. Experimental Hematology. 2014;42:137–45.
59. L. Gu. *et al.* MDM2 antagonist nutlin-3 is a potent inducer of apoptosis in pediatric acute lymphoblastic leukemia cells with wild-type p53 and overexpression of MDM2. NIH Public Access. 2012;29:997–1003.
60. Tucker T, Marra M, Friedman JM. Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine. Am J Hum Genet. 2009;85:142-54.
61. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. Nat Rev Genet. 2010;11:31-46.
62. Bohlander SK. ABC of genomics. Hematology. 2013;1:316-23.
63. Ledbetter DH. Cytogenetic Technology — Genotype and Phenotype. N Engl J Med. 2008;359:1728-30.

64. Stengel A, Schnittger, S., Weissmann, S., Kuznia, S., & Kern, W. TP53 mutations occur in 15.7% of ALL and are associated with MYC-rearrangement, low hypodiploidy and a poor prognosis. 2014;124:251–9.
65. Zhang L, Rossi MR, Fisher KE. Section II: hematolymphoid malignancies. *Curr Probl Cancer*. 2014;38:159-74.
66. Roberts KG, C.G. Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: insights and treatment implications. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2015: 344–357.
67. Forero-Castro M RC, Lumbreras E, Benito R, Hernández-Sánchez JM, Hernández-Sánchez M, García JL, Corchete-Sánchez LA, Tormo M, Barba P, Menárguez J, Ribera J, Grande C, Escoda L, Olivier C, Carrillo E, García de Coca A, Ribera JM, Hernández-Rivas JM. The presence of genomic imbalances is associated with poor outcome in patients with burkitt lymphoma treated with dose-intensive chemotherapy including rituximab *British Journal of Haematology*. 2016;172:428-38.
68. Forero-Castro M RC, Benito R, Abáigar M, África Martín A, Arefi M, Fuster JL, de Las Heras N, Rodríguez JN, Quintero J, Riesco S, Hermosín L, de la Fuente I, Recio I, Ribera J, Labrador J, Alonso JM, Olivier C, Sierra M, Megido M, Corchete-Sánchez LA, Ciudad Pizarro J, García JL, Ribera JM, Hernández-Rivas JM. Genome-Wide DNA Copy Number Analysis of Acute Lymphoblastic Leukemia Identifies New Genetic Markers Associated with Clinical Outcome. *PLoS One*. 2016 11.
69. Salmoiraghi S GMM, Ubiali G, Tosi M, Peruta B, Zanghi' P, Oldani E, Boschini C, Kohlmann A, Bungaro S, Intermesoli T, Terruzzi E, Angelucci E, Cavattoni I, Ciceri F, Bassan R, Rambaldi A, Spinelli O. Mutations of TP53 in adult acute lymphoblastic leukemia at diagnosis do not affect the achievement of hematologic response but correlate with early relapse and very poor survival. *Haematologica*. 2016
70. Mullighan CG, Phillips, L. A., Su, X., Ma, J., Miller, C. B., Shurtleff, S. A., & Downing, J. R. . Genomic analysis of the clonal origins of relapsed. 2009; 322:1377-80.
71. Roberts KG, Mullighan CG. How new advances in genetic analysis are influencing the understanding and treatment of childhood acute leukemia. *Curr Opin Pediatr*. 2011;23:34-40.
72. Bernard V, Gebauer, N., Dinh, T., Stegemann, J., Feller, A. C., & Merz, H. Applicability of next-generation sequencing to decalcified formalin-fixed and paraffin-embedded chronic myelomonocytic leukaemia samples. 2014;7:1667–76.
73. Mardis ER. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2008;9:387-402

74. Jan M, & Majeti, R. Clonal evolution of acute leukemia genomes. 2012;32:135–40.

## Anexos

**Figura suplementaria 1.** Características de los pacientes con LAL-B incluidos en el grupo de estudio (N=100).

Características	Toda la población		Niño (<18 años)		Adulto (≥18 años)		p
	N	%	N	%	N	%	
<b>Todos los pacientes</b>	100	100	50	50	50	50	NA
Edad al diagnóstico (años), mediana (rango)	19	(0-84)	4	(0-16)	35	(19-84)	NA
<b>Sexo</b>							<b>0,03</b>
Masculino, n (%)	51	51	18	36	33	66	
Femenino, n (%)	49	49	32	64	17	34	
<b>Fenotipo</b>							0,956
Pro B LAL-B/LAL-B de células maduras (Burkitt), n (%)	18	18	9	20,9	9	20,5	
Pre LAL-B / LAL común, n (%)	69	69	34	79,1	35	79,5	
<b>Valores sangre periférica</b>							
Leucos en sangre periférica (x10 <sup>9</sup> /L), mediana (rango)	27,30	(1-457)	14,45	(1,45-284)	34	(1-457)	0,061
Leucos en sangre periférica ≥30x10 <sup>9</sup> /L (%)	41	48,8	18	41,9	23	56,1	0,192
Hb (g/L), mediana (rango)	87	(35-160)	73,5	(35-128)	109,5	(40-160)	<b>&lt;0,0001</b>
Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L), mediana (rango)	48,5	(6-580)	48,5	(6-301)	47	(7-580)	0,967
LDH elevado (U/L), n (%)	64	64	34	85	30	90,9	0,499
<b>Blastos en médula ósea<sup>1</sup>, mediana (rango)</b>	84	(35-97)	80	(35-97)	85	(40-97)	0,751
<b>ECOG score ≥ 2, n (%)</b>	6	6	1	2	5	10	1,000
<b>Síndrome de Down, n (%)</b>	2	2	2	4	0	0	0,495
<b>Alteraciones citogenéticas en pacientes con LAL-B</b>							
Normal, n (%)	26	26	19	38	7	14	<b>&lt;0,0001</b>
Alterado, n (%)	74	74	31	62	43	86	
Alta hiperdiploidía (>50 cromosomas), n (%)	12	12	8	16	4	8	0,317
Baja hiperdiploidía (47 – 50 cromosomas), n (%)	1	1	1	2	0	0	0,221
Alta Hipodiploidía (44 – 45 cromosomas), n (%)	1	1	0	0	1	2	0,317
Baja Hipodiploidía (<44 cromosomas), n (%)	3	3	0	0	3	6	0,080
<i>ETV6-RUNX1</i> , n (%)	10	10	10	20	0	0	<b>0,01</b>
<i>TCF3 (E2A)-PBX1</i> , n (%)	6	6	3	6	3	6	1,000
<i>KMT2A (MLL)</i> -rearrangement, n (%)	13	13	6	12	7	14	0,766
<i>BCR-ABLI</i> , n (%)	26	26	2	4	24	48	<b>&lt;0,0001</b>
Otros	2	2	1	2	1	2	1,000
<b>Citogenética</b>							1,000
Mal pronóstico <sup>2</sup> , n (%)	2	2	1	2	1	2	
Otros, n (%)	98	98	49	98	49	98	
<b>Grupo de riesgo<sup>3</sup></b>							

Bajo riesgo, n (%)	22	22	22	44	0	0	<b>&lt;0,0001</b>
Riesgo estándar (intermedio), n (%)	21	21	14	28	7	14	
Alto riesgo, n (%)	57	57	14	28	43	86	
<b>EMR<sup>4</sup> al final de la inducción (día +33)</b>							
EMR<0,01%, n (%)	49	70	31	75,6	18	62,1	0,223
EMR≥0,01%, n (%)	21	30	10	24,4	11	37,9	
<b>Duración de primera RC<sup>5</sup>, en meses (rango)</b>							
<1 año, n (%)	13	13	2	40	11	91,7	0,053
≥1 año, n (%)	4	4	3	60	1	8,3	
<b>TPH<sup>6</sup>, n (%)</b>							
TPH en la primera RC, n (%)	31	39,2	12	27,3	19	54,3	<b>0,015</b>
	25	25	10	20	15	30	1,000
<b>Recaída, n (%)</b>							
	19	25	6	14	13	39,4	<b>0,011</b>
<b>Tiempo de la primera recaída</b>							
Muy temprana, n (%)	15	78,9	3	50	12	92,3	0,052
Temprana, n (%)	2	10,5	1	16,7	1	7,7	
Tardía, n (%)	2	10,5	2	33,3	0	0	
<b>Muertes (toda la cohorte), n (%)</b>							
	37	40,2	9	20	28	59,6	<b>&lt;0,0001</b>
Mediana de seguimiento (rango), meses	38	(0-180)	48	(2-182)	29	(3-171)	0,101
<b>SG a los 5 años</b>							
Probabilidad SG a los 5 años (mediana, 95% IC)	64% (NA)		84% (NA)		41% (17,5 <sup>867</sup> -28 <sup>133</sup> )		<b>&lt;0,0001</b>
<b>SLE a los 5 años</b>							
Probabilidad SLE a los 5 años (mediana, 95 % IC)	55% (62,NC)		78% (NA)		32% (8,0 <sup>000</sup> -16,238)		<b>&lt;0,0001</b>
<b>SLR a los 5 años</b>							
Probabilidad SLR a los 5 años (mediana, % IC)	78% (NA)		90% (NA)		61% (NA)		<b>0,001</b>

**Abreviaturas:**

Los blastos en médula ósea fueron estimados mediante citometría de flujo.

<sup>2</sup> Incluye a los pacientes LAL-B con t(9;22), t(11q23) e hipodiploidía.

<sup>3</sup> La estratificación del grupo de riesgo fue establecida según el protocolo PETHEMA.

<sup>4</sup> Enfermedad mínima residual estimada mediante citometría de flujo.

<sup>5</sup> RC: remisión completa. La duración de la primera remisión completa fue aplicada para pacientes que sufrieron recaída.

<sup>6</sup> TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos.

SG: supervivencia global. SLE: supervivencia libre de evento. SLR: supervivencia libre de recaída. IC: intervalo de confianza.

NA: no alcanzado. NC: no completado.

**Figura suplementaria 2.** Mutaciones somáticas en *TP53* al momento del diagnóstico en pacientes con LAL-B (N=100).

Paciente	Grupo citogenético	Grupo riesgo	Mutación	Cambio aminoácido	% lecturas global	Base de datos
Niño (N=50)	<i>TCF3(E2A)-PBX1</i>	AR	c.817_821 delinsGACCC	p.R273_V274 delinsDP	53%	No descrita
	46,XX,t(7;15)(p13;q12)[3]/46,XX[7]	AR	c.832C>T	p.P278S	12,5%	COSM10939/ <i>TP53</i> website <a href="http://p53.fr">http://p53.fr</a>
	Normal	BR	c.332T->C	p.L111P	9%	COSM437627/ <i>TP53</i> website <a href="http://p53.fr">http://p53.fr</a>
Adulto	<i>KMT2A(MLL)-R</i>	AR	c.818G>C	p.R273P	3,5%	COSM165077/ <i>TP53</i> website <a href="http://p53.fr">http://p53.fr</a>
	Baja Hipodiploidía	AR	c.560-1G>A (splicing Intron 5 SA)	Splice_Intron 5 SA	41%	COSM43753/ <i>TP53</i> website <a href="http://p53.fr">http://p53.fr</a>
	Alta Hiperdiploidía	AR	c.535C>G	p.H179D	82%	COSM44776 / <i>TP53</i> website <a href="http://p53.fr">http://p53.fr</a>
	Alta Hiperdiploidía	AR	c.613T->G	p.Y205D	59,5%	COSM43844/ <i>TP53</i> website <a href="http://p53.fr">http://p53.fr</a>
	Alta Hiperdiploidía	RI	c.403T>C	p.C135R	58,5%	COSM10684/ <i>TP53</i> website <a href="http://p53.fr">http://p53.fr</a>
	Alta Hiperdiploidía	RI	c.993+1G>A (splicing Intron 9 SD)	Splice_Intron 9 SD	77%	COSM44295 / <i>TP53</i> website <a href="http://p53.fr">http://p53.fr</a>
	47,XY,+4,-6,i(6)(p10),add(11)(q23),+mar[8]/46,XY[12]	AR	c.824G>T	p.C275F	28%	COSM99932 / <i>TP53</i> website <a href="http://p53.fr">http://p53.fr</a>
	Normal	AR	c.659A>G	p.Y220C	5%	COSM99720/ <i>TP53</i> website <a href="http://p53.fr">http://p53.fr</a>
	c.374C->G		p.T125R	73,5%	COSM45243/ <i>TP53</i> website <a href="http://p53.fr">http://p53.fr</a>	
AR: alto riesgo. RI: riesgo intermedio. BR: bajo riesgo.						



**Figura suplementaria 3.** Asociación de mutaciones de *TP53* con parámetros clínicos LAL-B en la serie global (N=100).

Parámetro y categoría	<i>TP53 mut</i> <sup>1</sup>	<i>TP53 wt</i> <sup>1</sup>	p valor
	n (%)	n (%)	
<b>Grupo de riesgo</b> <sup>2</sup>			0,753
Alto riesgo	7 (63,63)	50 (56,18)	
Bajo riesgo/riesgo intermedio	4 (36,36)	39 (43,82)	
n total	11 (100)	89 (100)	
<b>Respuesta al tratamiento de primera línea</b> <sup>3</sup>			0,312
Mal pronóstico	2 (20)	8 (10,12)	
Buen pronóstico	8 (80)	71 (89,87)	
n total	10 (100)	79 (100)	
<b>Respuesta (EMR) tras inducción</b>			0,062
Mala respuesta (EMR $\geq$ 0,01%)	4 (66,67)	17 (26,56)	
Buena respuesta (EMR $\leq$ 0,01%)	2 (33,33)	47 (73,44)	
n total	6 (100)	64 (100)	
<b>Leucocitos en sangre periférica</b>			0,015
Leucocitos en sangre periférica $<30 \times 10^9/L$ (%)	9 (90)	34 (45,95)	
Leucocitos en sangre periférica $\geq 30 \times 10^9/L$ (%)	1 (10)	40 (54,05)	
n total	10 (100)	74 (100)	
<b>Niveles de LDH</b>			1,000
Nivel LDH elevado (U/L), (%)	8 (88,89)	56 (87,5)	
Nivel LDH normal (U/L), (%)	1 (11,11)	8 (12,5)	
n total	9 (100)	64 (100)	
<b>Citogenética</b>			0,011
Mal pronóstico <sup>4</sup> , n (%)	2 (18,18)	0 (0)	
Buen pronóstico, n (%)	9 (81,81)	89 (100)	
n total	11 (100)	89 (100)	
<b>Duración de la primera RC</b> <sup>5</sup>			0,538
<1 año	3 (60)	10 (83,33)	
$\geq 1$ año	2 (40)	2 (16,67)	
n total	5 (100)	12 (100)	
<b>Tiempo de recaída</b> <sup>6</sup>			

Muy temprano/temprano	5 (83,33)	12 (92,31)	1,000
Tardío	1 (16,67)	1 (7,69)	
n total	6 (100)	13 (100)	
<b>Grupo citogenético</b>			
<i>ETV6/RUNX1</i> positivo	0 (0)	5 (5,62)	0,513
<i>ETV6/RUNX1</i> negativo	11 (100)	84 (94,38)	
n total	11 (100)	89 (100)	
<b>Grupo citogenético</b>			
<i>BCR/ABL1</i> positivo	0 (0)	10 (11,24)	1,000
<i>BCR/ABL1</i> negativo	11 (100)	79 (88,76)	
n total	11 (100)	89 (100)	
<b>Edad del paciente</b>			
Niño	3 (27,27)	47 (52,81)	0,110
Adulto	8 (72,73)	42 (47,19)	
n total	11 (100)	89 (100)	
<b>Edad en niños</b>			
1-10 años	1 (33,33)	35 (87,5)	0,064
>10 años	2 (66,67)	5 (12,5)	
n total	3 (100)	40 (100)	
<b>Edad en adultos</b>			
<55 años	3 (37,5)	33 (80,49)	0,023
≥55 años	5 (62,5)	8 (19,51)	
n total	8 (100)	41 (100)	
<b>Fenotipo</b>			
Pro LAL-B/ LAL-B	2 (20)	16 (20,78)	1,000
Pre LAL-B/ LAL-B común	8 (80)	61 (79,22)	
n total	10 (100)	77 (100)	
<b>Escala ECOG</b>			
ECOG≥2, (%)	2 (100)	4 (25)	0,098
ECOG<2, (%)	0 (0)	12 (75)	
n total	2 (100)	16 (100)	
<b>Recaída</b>			

Recaída	6 (85,71)	13 (18,84)	<b>0,01</b>
No recaída	1 (14,29)	56 (81,16)	
n total	7 (100)	69 (100)	
<b>TPH (en primera RC)</b>			
Sí TPH	1 (33,33)	24 (85,71)	0,088
No TPH	2 (66,67)	4 (14,29)	
n total	3 (100)	28 (100)	
<b>Abreviaturas:</b> <sup>1</sup> mut: mutado; wt: "wild type". <sup>2</sup> La estratificación del grupo de riesgo fue establecida de acuerdo a los protocolos de PETHEMA. <sup>3</sup> El mal pronóstico tras la terapia de primera línea se debe a refractariedad o recaída. <sup>4</sup> La citogenética de "mal pronóstico" incluye t(9;22), t(v;11q23) e hipodiploidía. <sup>5</sup> La duración de la primera remisión se aplica a los pacientes que sufren recaída. <sup>6</sup> Criterios de tiempo de recaída: muy temprano: antes de 18 meses tras el diagnóstico y antes de 6 meses después del fin del tratamiento inicial; pronto: después de 18 meses tras del diagnóstico inicial, pero antes de 6 meses después del fin del tratamiento inicial; tardío: después de 6 meses tras finalizar el tratamiento inicial. LDH: lactato deshidrogenasa; ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group; EMR: enfermedad mínima residual; RC: remisión completa.			

**Figura suplementaria 4.** Supervivencia asociada a las mutaciones de *TP53* en la serie global (N=100).

Parámetro y categoría	SG			SLR			SLE		
	Pacientes	Muerte	<i>p</i>	Pacientes	Evento	<i>p</i>	Pacientes	Evento	<i>p</i>
	n	n	<i>Log rank</i>	n	n	<i>Log rank</i>	n	n	<i>Log rank</i>
<i>TP53</i> mut <sup>1</sup>	9	7	<b>0,002</b>	7	4	<b>0,001</b>	9	7	<b>0,008</b>
<i>TP53</i> wt <sup>1</sup>	76	24		65	12		74	29	
n total	85	31		72	16		83	36	
<b>Grupo de riesgo<sup>2</sup></b>			<b>&lt;0,0001</b>			<b>&lt;0,0001</b>			<b>&lt;0,0001</b>
Alto riesgo	42	27		32	14		40	29	
Bajo riesgo /riesgo intermedio	21	4		20	2		23	7	
n total	63	31		52	16		63	36	
<b>Respuesta al tratamiento inicial</b>			<b>&lt;0,0001</b>			<b>&lt;0,0001</b>			<b>&lt;0,0001</b>
Refractariedad/recaída	6	5		3	3		6	6	
Buena respuesta	51	21		49	13		53	26	
n total	57	26		52	16		59	32	
<b>Respuesta (EMR) tras inducción</b>			0,158			<b>0,001</b>			<b>0,012</b>

Mala respuesta (EMR $\geq$ 0,01%)	15	8		14	8		14	10	
Buena respuesta (EMR $\leq$ 0,01%)	34	12		33	5		34	13	
n total	49	20		47	13		38	23	
<b>Escala ECOG</b>									
ECOG $\geq$ 2, (%)	2	1	0,692	2	1	0,985	5	1	0,677
ECOG $<$ 2, (%)	10	4		9	4		10	7	
n total	12	5		11	5		15	8	
<b>Leucocitos en sangre periférica</b>									
Leucocitos en sangre periférica $<30 \times 10^9/L$ (%)	24	13	0,555	20	14	0,074	24	13	0,123
Leucocitos en sangre periférica $\geq 30 \times 10^9/L$ (%)	30	14		26	10		29	17	
n total	54	27		46	24		53	30	
<b>Niveles de LDH</b>									
LDH elevado (U/L), (%)	39	21	0,821	36	13	0,450	41	24	0,391
LDH normal (U/L), (%)	6	3		4	1		5	2	
n total	45	24		40	14		46	26	
<b>Citogenética<sup>3</sup></b>									
Mal pronóstico <sup>4</sup> , n (%)	1	1	0,653	1	1	0,260	1	1	0,692
Buen pronóstico, n (%)	63	31		52	16		63	36	
n total	64	32		53	17		64	37	
<b>Duración de la primera RC<sup>5</sup></b>									
$<1$ año	13	10	0,077	13	13	0,001	13	13	0,001
$\geq 1$ año	3	3		4	3		4	3	
n total	16	13		17	16		17	16	
<b>Tiempo de recaída<sup>6</sup></b>									
Muy temprano/temprano	17	14	0,027	16	16	0,065	17	17	0,011
Tardío	1	1		1	1		2	1	

n total	18	15		17	17		19	19	
<b>Grupo citogenético</b>									
<i>ETV6/RUNX1</i> positivo	5	1	0,342	1	1	0,896	2	1	0,364
<i>ETV6/RUNX1</i> negativo	60	30		51	15		61	35	
n total	63	31		52	16		63	36	
<b>Edad en niños</b>									
1-10 años	18	2	0,001	18	12	<0,0001	20	4	0,001
>10 años	4	3		4	2		5	4	
n total	22	5		22	14		25	8	
<b>Edad en adultos</b>									
<55 años	28	4	0,171	21	9	0,887	26	19	0,528
≥55 años	9	7		6	3		7	6	
n total	37	11		27	12		33	25	
<b>Fenotipo</b>									
Pro LAL-B/ LAL-B	13	7	0,814	11	3	0,705	13	8	0,833
Pre LAL-B/ LAL-B común	42	21		38	13		46	26	
n total	55	28		49	16		59	34	
<p><b>Abreviaturas:</b>  <sup>1</sup>mut: mutado; wt: “wild type”.  <sup>2</sup>La estratificación del grupo de riesgo fue establecida de acuerdo a los protocolos de PETHEMA.  <sup>3</sup>El mal pronóstico tras la terapia de primera línea se debe a refractariedad o recaída.  <sup>4</sup>La citogenética de “mal pronóstico” incluye t(9;22), t(v;11q23) e hipodiploidía.  <sup>5</sup>La duración de la primera remisión se aplica a los pacientes que sufren recaída.  <sup>6</sup>Criterios de tiempo de recaída: muy temprano: antes de 18 meses tras el diagnóstico y antes de 6 meses después del fin del tratamiento inicial; pronto: después de 18 meses tras del diagnóstico inicial, pero antes de 6 meses después del fin del tratamiento inicial; tardío: después de 6 meses tras finalizar el tratamiento inicial.  LDH: lactato deshidrogenasa; ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group; EMR: enfermedad mínima residual; RC: remisión completa.</p>									

**Figura suplementaria 5.** Mutaciones en TP53 identificadas con Next – generation deep sequencing (NGS) en pacientes con LAL-B. Las variaciones en la secuencia detectadas con NGS fueron validadas con la secuenciación convencional Sanger o resecuenciadas en una « carrera » independiente de PCR.

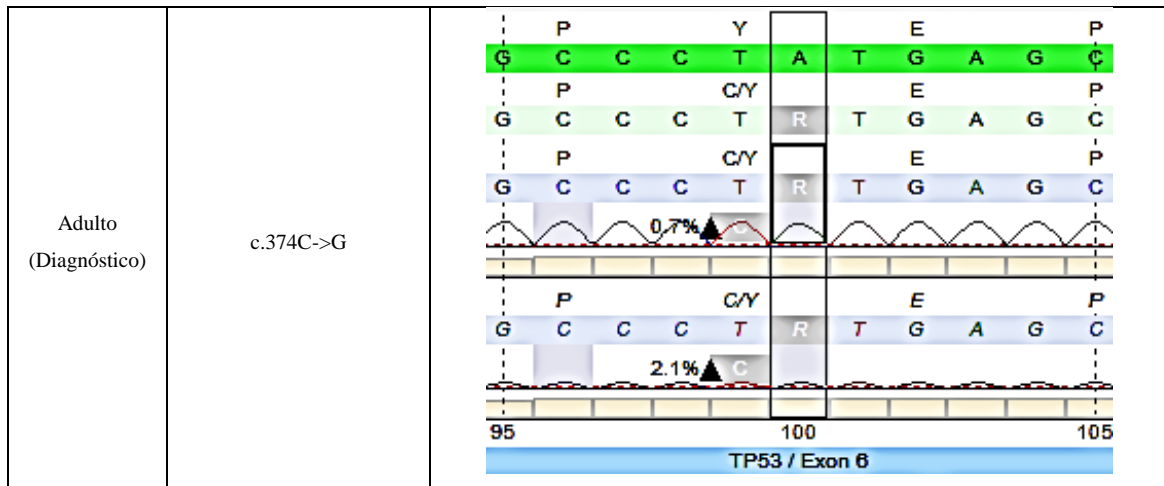


Niño (sólo a la recaída)	c.829_842delins14	
Adulto (Diagnóstico)	c.818G>C	
Adulto (Recaída)	c.818G>C	
Adulto (Recaída sólo)	c.-8_4del12	

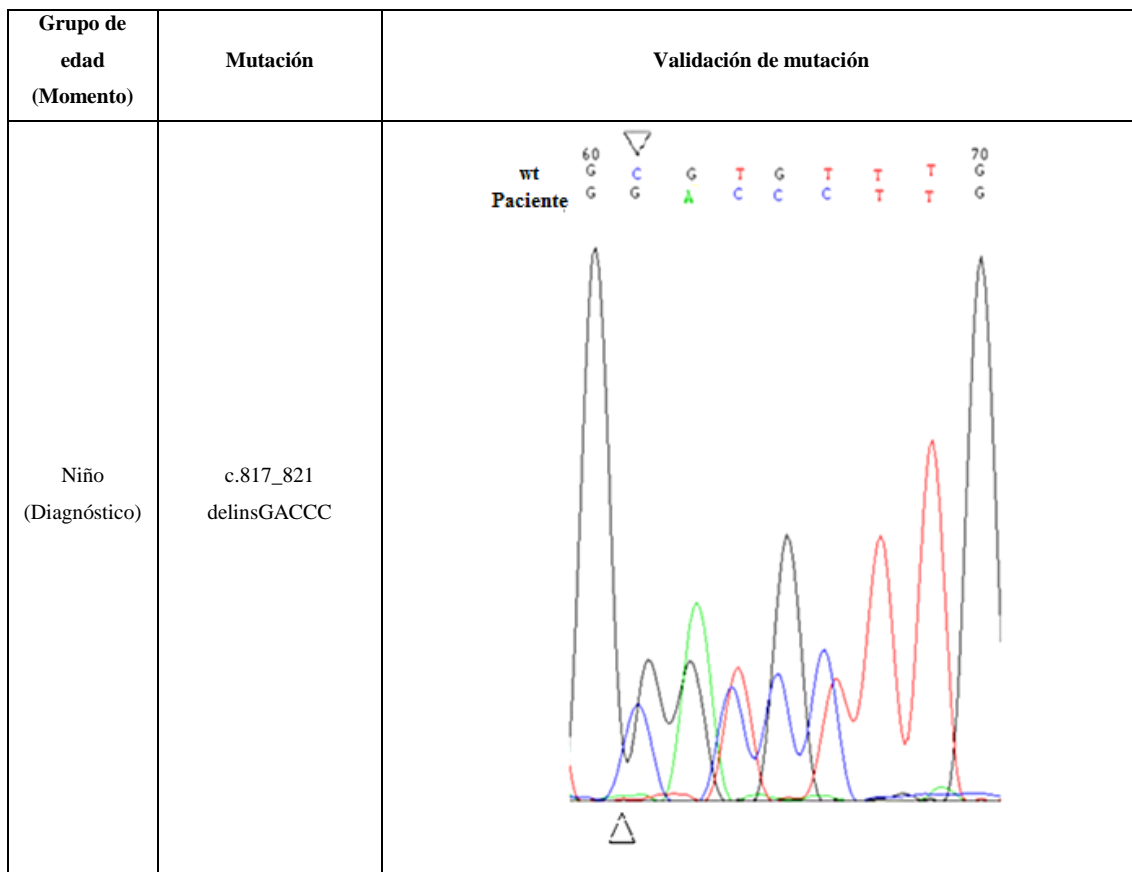
<p>Adulto (Diagnóstico)</p>	<p>c.535C&gt;G</p>	
<p>Adulto (Diagnóstico)</p>	<p>c.613T-&gt;G</p>	
<p>Adulto (Diagnóstico)</p>	<p>c.332T-&gt;C</p>	
<p>Adulto (Diagnóstico)</p>	<p>c.560-1G&gt;A (splicing Intron 5 SA)</p>	

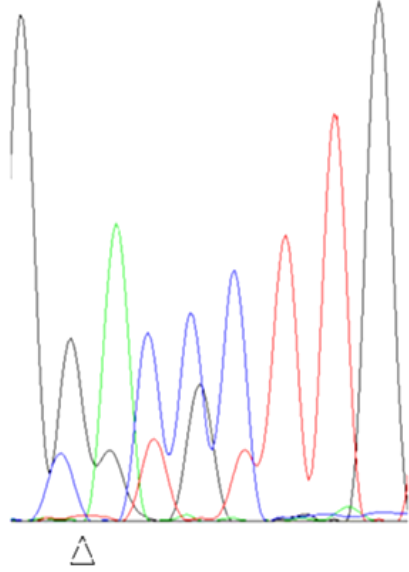
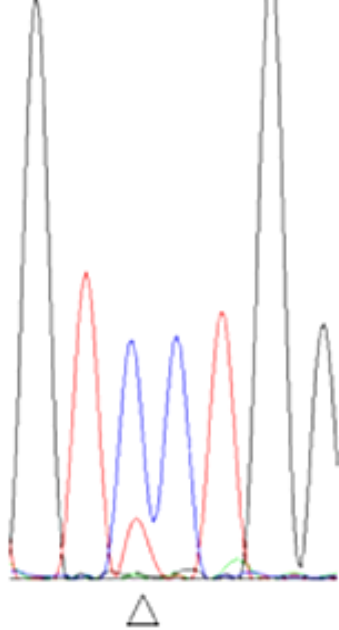


<p>Adulto (Diagnóstico)</p>	<p>c.403T&gt;C</p>	
<p>Adulto (Diagnóstico)</p>	<p>c.993+1G&gt;A (splicing Intron 9 SD)</p>	
<p>Adulto (Diagnóstico)</p>	<p>c.824G&gt;T</p>	
<p>Adulto (Diagnóstico)</p>	<p>c.659A&gt;G</p>	

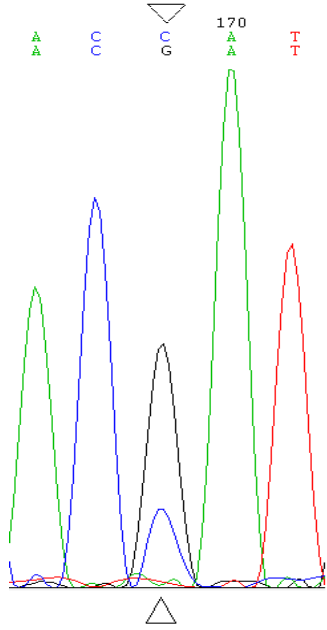
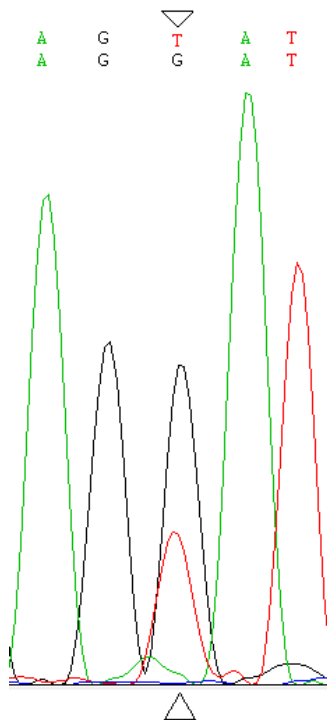


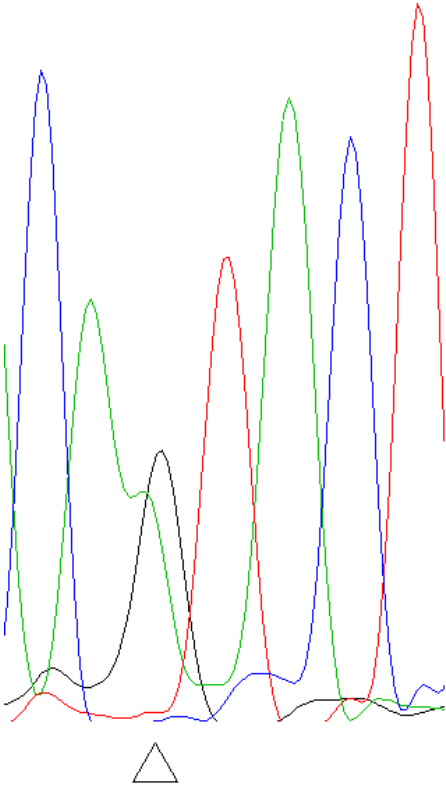
**Figura suplementaria 6.** Validación de las mutaciones en *TP53* identificadas mediante NGS, mediante Sanger o carrera independiente de PCR.

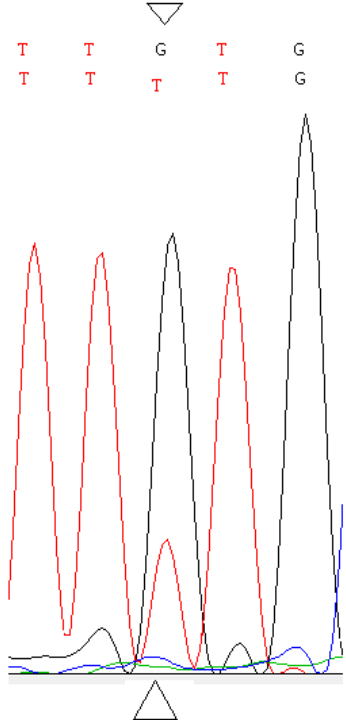


<p>Niño (Recaída)</p>	<p>c.817_821delinsGAC CC</p>	<p>wt 60 G C G T G T T T 70 G  Paciente G G A C C C T T G</p> 
<p>Niño (Diagnóstico)</p>	<p>c.832C&gt;T</p>	<p>wt G T C C T G GG  Paciente G T T C T T G G</p> 
<p>Niño (Recaída)</p>	<p>c.832C&gt;T</p>	

Niño (sólo a la recaída)	c.829_842delins14	
Adulto (Diagnóstico)	c.818G>C	3,5%
Adulto (Recaída)	c.818G>C	26%
Adulto (Recaída sólo)	c.-8_4del12	15%

<p>Adulto (Diagnóstico)</p>	<p>c.535C&gt;G</p>	
<p>Adulto (Diagnóstico)</p>	<p>c.613T-&gt;G</p>	
<p>Adulto (Diagnóstico)</p>	<p>c.332T-&gt;C</p>	<p>9%</p>

<p>Adulto (Diagnóstico)</p>	<p>c.560-1G&gt;A (splicing Intron 5 SA)</p>	<div style="text-align: center;"> <p>C A G T A C 50 C A A T A C T</p>  </div>
<p>Adulto (Diagnóstico)</p>	<p>c.403T&gt;C</p>	<p>58,5%</p>
<p>Adulto (Diagnóstico)</p>	<p>c.993+1G&gt;A (splicing Intron 9 SD)</p>	<p>77%</p>

<p>Adulto (Diagnóstico)</p>	<p>c.824G&gt;T</p>	
<p>Adulto (Diagnóstico)</p>	<p>c.659A&gt;G</p>	<p>5%</p>
<p>Adulto (Diagnóstico)</p>	<p>c.374C-&gt;G</p>	<p>73,5%</p>