

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

SITUACIÓN ACTUAL DE LA LEUCEMIA AGUDA DE LINAJE AMBIGUO:
UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Trabajo final de investigación aplicada sometido a la consideración de la Comisión del
Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología para optar al grado y título de
Especialidad en Hematología

CARLOS ROBERTO VARELA BRICEÑO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2021

*A mi mamá, doña Judith,
por enseñarme el don del servicio y del amor.*

*A mi papá, don Carlos,
por enseñarme a luchar y trabajar por lo que se quiere.*

*A mis padres,
por el apoyo y el esfuerzo en mi educación y trabajo.*

*A mis hermanos,
por ser fuerte de motivación académica y laboral.*

*A mis amigos, mejores amigos
por la paciencia y el apoyo en estos años.*

*A mis compañeros de especialidad,
por las memorias y los muy buenos momentos que construimos juntos.*



**SISTEMA DE ESTUDIOS EN POSGRADO
PROGRAMA DE POSGRADO EN ESPECIALIDADES EN MICROBIOLOGÍA**

ACTA-59-2021

Acta presentación de Requisito Final de Graduación Trabajo de Investigación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el martes 27 de julio de 2021 con el objeto de recibir el informe oral del estudiante **Carlos Roberto Varela Briceño** carné # **A96460**, quien se acoge al Reglamento General del Sistema de Estudios de Posgrado para presentar el Trabajo Final de Graduación, para optar por el grado académico de **Especialista en Hematología**. Están presentes los siguientes miembros del Tribunal Examinador: Melissa Granados Zamora MSc. tutora y quien preside, lectores Walter Cartin Sánchez Esp. y Jorge López Villegas Esp.

ARTICULO 1

Quien preside solicita al postulante realizar la presentación oral de su Trabajo de Investigación titulado: **"Situación Actual de Leucemia Aguda de Linaje Ambiguo: una revisión sistemática"**.

ARTICULO 2

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan al postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

ARTICULO 3

El Tribunal Examinador declara el Trabajo Final de Graduación:

Aprobado

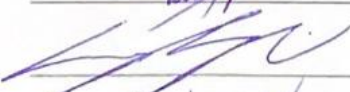
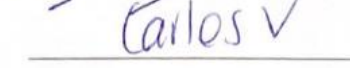


Reprobado



ARTICULO 4

Se da lectura al acta que firman los miembros del Tribunal Examinador y el Postulante, a las 17:52 horas.

Nombre	Firma	No. Cédula
Melissa Granados Zamora, MSc. Quien preside		<u>1-1206-0870</u>
Walter Cartin Sánchez, Esp.		<u>106910930</u>
Jorge López Villegas, Esp.		<u>1-1266-0645</u>
Carlos Roberto Varela Briceño Estudiante	<u>Carlos V</u>	<u>304560817</u>

Observaciones: _____

Nota: Solamente firmarán el acta los responsables de la actividad descrita

Si el trabajo es merecedor de mención de honor anotar en observaciones



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Carlos Roberto Varela Briceño, con cédula de identidad 304560817, en mi condición de autor del TFG titulado Situación Actual de la Leucemia Aguda de Linaje Ambiguo: una revisión sistemática.

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI ☒ NO * ☐

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

Carlos V

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	8
SUMMARY	9
LISTA DE CUADROS	10
LISTA DE FIGURAS	11
INTRODUCCIÓN.....	12
OBJETIVOS.....	14
Objetivo General:	14
Objetivos Específicos:	14
JUSTIFICACION	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
ANTECEDENTES	19
CAPÍTULO 1: ETIOLOGÍA DE LA LEUCEMIA AGUDA DE LINAJE AMBIGUO.	19
Epidemiología de la leucemia aguda de linaje ambiguo.	24
CAPÍTULO 2: HISTORIA NATURAL DE LA LEUCEMIA AGUDA DE LINAJE AMBIGUO.....	26
Origen celular clonal de la ALAL	26
Hallazgos citogenéticos y moleculares en MPAL.....	28
Cambios moleculares detectados en pacientes con Leucemia Aguda Indiferenciada....	33
CAPÍTULO 3: DIAGNOSTICO CLÍNICO Y DE LABORATORIO DE LA LEUCEMIA AGUDA DE LINAJE AMBIGUO.	35
Diagnóstico Clínico	35
Diagnóstico de Laboratorio	35
Caracterización morfológica	35
Caracterización y hallazgos inmunofenotípicos	36

CAPÍTULO 4. PROTOCOLOS TERAPEUTICOS EN EL TRATAMIENTO DE LA LEUCEMIA AGUDA DE LINAJE AMBIGUO.	44
CONCLUSIONES.....	55
BIBLIOGRAFIA	57

RESUMEN

La leucemia aguda es un cáncer hematopoyético en la cual prolifera una población de células malignas llamadas blastos, que comprometen más del 20% del componente celular de la médula ósea. La gran mayoría de estas pueden ser clasificadas en LLA o LMA, sin embargo, existe un grupo de leucemias, cuya expresión de marcadores inmunofenotípicos no permite una clasificación en un solo linaje. A este grupo de leucemias, se le conoce como Leucemias Agudas de Linaje Ambiguo.

En el 2017, la OMS la subclasifica en 5 entidades separadas: leucemia aguda indiferenciada, MPAL con t(9;22)(q34.1;q11.2), MPAL con t(v;11q23.3), MPAL B/mieloide, NOS y MPAL T/mieloide, NOS, tomando en consideración la presencia de traslocaciones como el Cromosoma Philadelphia, los rearrreglos en MLL, así como la expresión simultánea de linaje celular B, T o mieloide, en una o en dos poblaciones de células tumorales. Estas leucemias son de incidencia muy baja y difícil de determinar por los cambios en la clasificación realizados, no obstante, representan menos de un 5% de las leucemias agudas y el subtipo más común es el Mieloide/B.

Su origen clonal no está del todo establecido. La coexpresión de factores de transcripción linaje específicos, así como las aberraciones cromosómicas y mutacionales pueden ser responsables de la presentación neoplásica. A la fecha, no se han encontrado alteraciones genéticas o moleculares específicas de esta entidad. Esto hace que el diagnóstico tenga su mayor peso en la caracterización inmunofenotípica.

La citometría de flujo provee la información de expresión de marcadores celulares en la población de blastos. Actualmente mediante los criterios de la Organización Mundial de la Salud y la expresión inequívoca de marcadores específicos como Mieloperoxidasa (línea mieloide), CD19 (línea linfocitoide B) y CD3 (línea linfocitoide T), se pueden caracterizar el componente mieloide y linfocitoide de las células tumorales.

El pronóstico de esta leucemia es malo. Los pacientes con esta neoplasia tienen dentro de su esquema de tratamiento el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, dentro del protocolo de tratamiento contra enfermedad linfoblástica. Este régimen de tratamiento contra leucemia linfoblástica supera al esquema mieloide en tasas de sobrevivencia global, supervivencia libre de evento y remisión completa.

SUMMARY

Acute Leukaemia is a hematological cancer in which malignant cells, called blasts, increase rapidly over 20% of total cellularity of bone marrow. Most of leukemias are classified in Acute Myeloblastic Leukaemia or Acute Lymphoblastic Leukaemia, nevertheless, there are a group of leukemias in which expression of immunophenotypic markers does not allow to classify them under one Lineage. This group is known as Acute Leukaemia of Ambiguous Lineage.

In 2017, WHO subclassify them in 5 separated entities: acute undifferentiated Leukaemia, MPAL with t(9;22)(q34.1;q11.2), MPAL with t(v;11q23.3), MPAL B/myeloid, NOS y MPAL T/myeloid, NOS, by criteria as Philadelphia Chromosome translocation, MLL rearrangements, and the simultaneous expression of B or T or Myeloid Lineage in one or more tumor cells populations. The incidence of these is very low and difficult to estimate due to changes in classification systems, however, represent less than 5% of acute Leukemias and the most common subtype is MPAL B/myeloid.

Their clonal origin is not established yet. The expression of transcription factors of specific Lineage, such as chromosome aberrancies and mutations might be responsible of neoplastic presentation. To date, there are no Genetic alterations or specific mutations related to this entity. Due this, the diagnosis relies on immunophenotypic Characterization.

Flow cytometry provides information of cellular markers in the blast populations. The characterization of lymphoid and myeloid components of tumor cells are given by specific markers such as myeloperoxidase (myeloid), CD19 (B cell) and CD3 (T cell), according to WHO criteria.

The prognosis of this Leukaemia is dismal. Patients with this neoplasia have the allogeneic stem cell transplant as treatment on their Lymphoblastic protocol. The Lymphoblastic protocol gives more overall survival, event-free survival, and complete remission than myeloblastic protocol.

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Genes mutados frecuentemente encontrados en pacientes con ALAL según su función celular.....	20
Cuadro 2. Sistema de puntuación propuesto por Catovsky y colaboradores para la leucemia aguda bifenotípica.....	26
Cuadro 3. Sistema de puntaje revisado EGIL para la leucemia aguda bifenotípica.....	27
Cuadro 4. Clasificación de las Leucemias Agudas de Linaje Ambiguo acorde la clasificación OMS 2017.....	29

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Leucemia aguda de fenotipo mixto, T/mieloide.....	9
Figura 2. Leucemia aguda de fenotipo mixto, B/mieloide.....	10
Figura 3: Clasificación de la Organización Mundial de la Salud sobre la Leucemia aguda de linaje ambiguo.....	11
Figura 4: Diferenciación de la Célula Madre Hematopoyética.....	16
Figura 5: Frotis de sangre periférica donde se muestran blastos pertenecientes a una Leucemia Aguda de Linaje Ambiguo.....	25
Figura 6: Sobrevida Global y Sobrevida Libre de Evento a 5 años de pacientes con MPAL tratados con régimen de inducción dirigido a LLA comparado con LMA.....	36
Figura 7: Sobrevida Global y Sobrevida Libre de Evento a 5 años de pacientes con MPAL que fueron sometidos o no a Trasplante de Progenitores Hematológicos.....	38
Figura 8: Sobrevida Global y Sobrevida Libre de Evento a 5 años de pacientes con MPAL que fueron sometidos o no a Trasplante de Progenitores Hematológicos.....	39
Figura 9: Algoritmo de tratamiento propuesto para la leucemia aguda de fenotipo mixto.....	41
Figura 10: Algoritmo de tratamiento recomendado en pacientes con ALAL.	43

INTRODUCCIÓN

La gran mayoría de las leucemias agudas pueden clasificarse inequívocamente en línea mieloide o linfoide. Sin embargo, en el abordaje inicial de la enfermedad, el uso de los marcadores inmunológicos típicamente utilizados puede definir a un grupo de leucemias cuyo diagnóstico involucra la utilización de criterios que no definen a un solo linaje celular. Actualmente estas leucemias corresponden a la categoría de Leucemias Agudas de Linaje Ambiguo (ALAL) en la más reciente clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (1,2). Las leucemias que caen en esta categoría se han llamado de múltiples formas, incluyendo leucemias agudas de linaje mixto, leucemias agudas bifenotípicas, leucemias híbridas, leucemias agudas indiferenciadas y más recientemente, leucemias agudas de linaje ambiguo donde se contempla la leucemia aguda de fenotipo mixto y la leucemia aguda bilineal (3).

La leucemia aguda se cree que surge de una expansión clonal después de la transformación maligna y al arresto de la diferenciación normal en estadios de precursores hematopoyéticos, generalmente de una sola línea de diferenciación o linaje hematopoyético, sin embargo, en algunos casos, las células tumorales o blastos pueden presentar características mieloides y linfoides a la vez (4). La diferenciación normal de las células progenitoras a línea específica es resultado de una regulación sucesiva multinivel de la expresión de factores de transcripción. La Leucemia aguda de linaje ambiguo, surge producto de una desregulación de mecanismos que determinan la especificidad de línea de las células hematopoyéticas (5). Esta heterogeneidad en la diferenciación celular puede resultar de una “promiscuidad de línea”, implicando la transformación maligna de precursores capaces de diferenciarse, o con capacidad de expresar características de más de un linaje, conocido como “infidelidad de línea” (4).

El primer reporte de leucemias agudas de linaje ambiguo ocurrió en los años 80s, cuando anticuerpos monoclonales empezaron a ser utilizados para la caracterización inmunofenotípica de las células leucémicas. El Grupo Europeo de Inmunotipificación de la Leucemia, fue el primero en definir un consenso de clasificación de linaje de las leucemias de linaje ambiguo, asignando puntajes a la expresión de los marcadores asociados a linaje linfoide o mieloide (6). Una de las primeras publicaciones acerca de este tema describió la expresión del marcador mieloperoxidasa y el deoxinucleotidil transferasa (TdT) en las células malignas de una leucemia mieloide aguda, sugiriendo la existencia de células madre capaces de diferenciarse en células mieloides y linfoides y

cuya respuesta clínica a la terapia fue heterogénea ante los protocolos de Leucemia Linfoblástica (LLA) o Mieloblástica (LMA) (3). Del 2% al 5% de los casos de Leucemias Agudas cumplen con la definición de Leucemia Aguda de Linaje Mixto, con cuatro tipos de ambigüedad de línea descritos (7):

1. Una sola población leucémica de fenotipo mixto (MPAL, por sus siglas en inglés, *Mixed Phenotype Acute Leukemia*), que comparte características inmunofenotípicas linfoblásticas y mieloblásticas).
2. Leucemias Agudas Bilineales (BAL, por sus siglas en inglés, *Bilineal Acute Leukemia*), en donde dos clones leucémicos de diferentes linajes coexisten.
3. Leucemias Agudas indiferenciadas (UAL, por sus siglas en inglés de *Undifferentiated Acute Leukemia*), en donde el criterio de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) o Leucemia Mieloblástica (LMA) no se puede aplicar de forma concluyente por la falta de positividad de marcadores para estas dos enfermedades.
4. Leucemias agudas con cambio temprano a diferente línea, en donde el fenotipo leucémico cambia a otro linaje durante el tratamiento, usualmente en fases tempranas.

El manejo clínico de la Leucemia Aguda de Linaje Ambiguo es problemático y los protocolos específicos de tratamiento para pacientes con MPAL permanecen poco claros (3,8). En general, el pronóstico y la sobrevida de estos pacientes es pobre, con respecto a la LLA y LMA, tanto en adultos como en niños (9). La falta de información mutacional de esta enfermedad genera duda si la clasificación actual de esta enfermedad refleja verdaderamente el linaje subyacente de la patogénesis del grupo de enfermedades. Esto reafirma la relevancia del uso adecuado de las herramientas diagnósticas para así brindar información biológica importante, de manera que la correcta clasificación de esta entidad pueda mejorar el pronóstico e impactar sobre la terapia en los pacientes afectados (3,9).

Por tanto, este trabajo pretende estudiar el comportamiento de esta patología desde perspectivas moleculares, epidemiológicas, inmunofenotípicas y clínicas, de manera que se pueda caracterizar la misma mediante evidencia internacional. Esto para ser un andamio a estudios posteriores en los cuales se pueda caracterizar la misma a nivel de país, y así poder generar oportunidades de mejora en el pronóstico y tratamiento de estos pacientes.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Caracterizar la situación actual de las Leucemias Agudas de Linaje Ambiguo en el contexto mundial, abarcando su epidemiología, etiología y diagnóstico mediante una revisión sistemática de los últimos 15 años.

Objetivos Específicos:

1. Analizar la descripción etiológica y epidemiológica de la Leucemia Aguda de linaje ambiguo.
2. Explicar el posible origen clonal de la Leucemia Aguda de Linaje Ambiguo.
3. Detallar aspectos del diagnóstico clínico y de laboratorio del grupo de Leucemias Agudas de Linaje Ambiguo.
4. Mencionar protocolos terapéuticos para el tratamiento de este grupo de leucemias.

JUSTIFICACION

Cuando esta enfermedad fue descrita en 1984 por Pui y colaboradores, llamaron Leucemia Aguda de Fenotipo Mixto (MPAL) a lo que actualmente conocemos como Leucemia Aguda de Linaje Ambiguo (ALAL). Esta entidad se definió más precisamente por Catovsky y colaboradores en 1991, por el Grupo Europeo de Caracterización Inmunológica de Leucemias en 1995 mediante un sistema de puntaje basado en marcadores específicos de línea celular. En el año 2008, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en un intento de homogenizar criterios y contemplar el estudio clínico, citogenético y clínico de la enfermedad introdujo la clasificación mediante la expresión de antígenos en la superficie celular. En la revisión más actual, realizada por la OMS e el 2016, se enfatiza que el diagnóstico se puede realizar sin la necesidad de marcadores específicos, sino con el compromiso de la línea de las células patológicas, ya sea linfoide B o T o mieloide (8).

Estas patologías son heterogéneas: la expresión de los marcadores antigénicos, tanto de línea linfoide y mieloide, hacen que sea difícil de asignar a las categorías estipuladas para leucemia en la clasificación de la OMS. Esto demuestra los posibles factores limitantes en el set de marcadores inmunofenotípicos diagnósticos, sino que realza la necesidad de un diagnóstico integral con la colaboración de los marcadores inmunohistoquímicos y además, del constante descubrimiento de marcadores moleculares mutados, cuya expresión pueda guiar el diagnóstico de esta entidad (10).

Aunque la identificación de una Leucemia Aguda de Linaje Ambiguo no es tema de debate, el tratamiento óptimo para esta enfermedad lo es. Históricamente, estos casos han sido excluidos de casos clínicos o de estudios de terapias para esta enfermedad a razón de no ser clasificadas correctamente, o al tener un desenlace lúgubre por un tratamiento no acorde a su patología. Entre las versiones de clasificación de la OMS (2008 y 2016) no se ha notado diferencia entre la supervivencia de pacientes diagnosticados con leucemia aguda de linaje ambiguo, sin embargo, entre las dos últimas versiones hay una diferencia en el número de casos, teniendo una menor cantidad de casos cuando se clasifican mediante los criterios actuales. Esto, en términos del tratamiento, aunque se tiene buenos resultados con el régimen contra la leucemia linfoblástica, el hecho que haya cambios constantes en la clasificación de la enfermedad ha provocado que la implementación de un esquema de tratamiento no se haya establecido de manera concreta a lo largo del tiempo (11).

Por tanto, se pretende exponer la situación actual de esta enfermedad con el fin de recopilar información que permita un diagnóstico y clasificación más certeros que se traduzca en una mejor sobrevida para los pacientes afectados por esta patología. Este conocimiento permitiría a evaluar nivel nacional, mediante hallazgos en la literatura, el mejor acercamiento en el abordaje de esta entidad. Así mismo, este estudio pretende servir de base para futuras investigaciones que permitan dilucidar cual protocolo de tratamiento tiene los mejores resultados acorde a la clasificación y hallazgos moleculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una revisión bibliográfica sobre la Leucemia Aguda de Linaje Ambiguo. Esta búsqueda bibliográfica fue realizada con el objetivo de analizar los hallazgos de los estudios desarrollados a nivel mundial que comprendían aspectos importantes de la enfermedad, como lo son la etiología, la epidemiología, la clasificación, los hallazgos moleculares, inmunofenotípicos, sobrevida y tratamiento.

Los estudios fueron identificados mediante búsqueda en bases de datos electrónicas, explorando las listas de referencias incluídas en los artículos y mediante sugerencias de los gestores de base de datos. En la búsqueda bibliográfica no fueron aplicados criterios como el lenguaje, o la procedencia internacional de los artículos. Para llevar a cabo esta recopilación se buscó artículos originales y de revisión bibliográfica sobre el tema en bases de datos como PubMed (NCBI), Elsevier y páginas web de revistas digitales como *Blood*, *Haematologica*, *Annals of Hematology*, *Leukemia & Lymphoma*, *Cancer*, *Nature*, *European Journal of Haematology*, entre otros. Se utilizaron palabras clave como: “Acute Leukemia of Ambiguous Lineage”, “MPAL”, “Acute Undifferentiated Leukemia”, “Mixed Phenotype Acute Leukemia”, “Biphenotypic Leukemia”.

Los artículos encontrados fueron previamente escogidos utilizando los siguientes criterios de selección:

1. Su fecha de publicación no es superior a los 15 años, es decir, se tomarán en cuenta las publicaciones entre los años 2006 al 2021.
2. La publicación pertenece a las categorías original, revisión bibliográfica o reporte de casos clínicos, ya sea de manera individual o de manera colectiva. En el caso de estudios que reportan los hallazgos clínico-biológicos de un grupo de casos de pacientes con la Leucemia Aguda de Linaje Ambiguo, se selecciona los estudios con descripción epidemiológica del grupo de participantes en variables como género, edad de presentación de la enfermedad, diagnóstico, clasificación inmunofenotípica y datos moleculares (mutaciones y cariotipo) como mínimo.
3. El enfoque de la investigación presentada en la publicación contiene un análisis descriptivo de la enfermedad, datos epidemiológicos, inmunofenotípicos y/o

moleculares de la enfermedad, así como información referente al abordaje terapéutico y sobrevida.

4. El enfoque del artículo es describir y explicar mediante fisiopatología la razón de dichos hallazgos.

ANTECEDENTES

CAPÍTULO 1: ETIOLOGÍA DE LA LEUCEMIA AGUDA DE LINAJE AMBIGUO.

La leucemia es un cáncer hematopoyético en el cual la proliferación de glóbulos leucocitos se da de manera incontrolable, desplazando a la formación de elementos normales de la médula ósea y con la común circulación de elementos sanguíneos anormales en sangre periférica. Se clasifica como leucemia aguda si la proliferación clonal de glóbulos blancos es de tipo inmaduro, comúnmente denominados blastos, que comprometen mínimo el 20% de los leucocitos de médula ósea o sangre periférica (12,13). Las leucemias agudas resultan de una serie de eventos mutacionales que tienen lugar en el complejo proceso de hematopoyesis y que permiten la proliferación no controlada y maduración anormal del linaje celular, son de rápida evolución y de sobrevida muy baja sin tratamiento (14).

Tradicionalmente, las leucemias se han clasificado basadas en la morfología de las células malignas, categorizadas en primera instancia por el sistema Francés-Americano-Británico (FAB) en linaje mieloide y en linaje linfoide (14). Conforme el advenimiento de los estudios genómicos, la OMS clasificó las leucemias agudas basándose en la clínica, la morfología y las características moleculares, en donde se incluye una categoría de Leucemias Agudas de Linaje Ambiguo, en la cual la proliferación involucra dos o más linajes celulares (15).

Las leucemias agudas de linaje ambiguo (ALAL por sus siglas en inglés, *Acute Leukemia of Ambiguous Lineage*) incluyen aquellas leucemias que fallaron en su compromiso de diferenciarse en linaje Linfoide o Mieloide (Leucemias Agudas Indiferenciadas), o muestran evidencia de compromiso de diferenciación en más de un linaje (Leucemias Agudas de Fenotipo Mixto). Las leucemias con compromiso de diferenciación en más de un linaje se subdividen dependiendo de la caracterización inmunofenotípica en la población celular patológica, si hay más de un marcador de línea en una sola población de blastos (Leucemia Aguda Bifenotípica) y en aquellas con dos o más poblaciones de blastos independientes (Leucemia Aguda Bilineal) (Figura 1) (16).

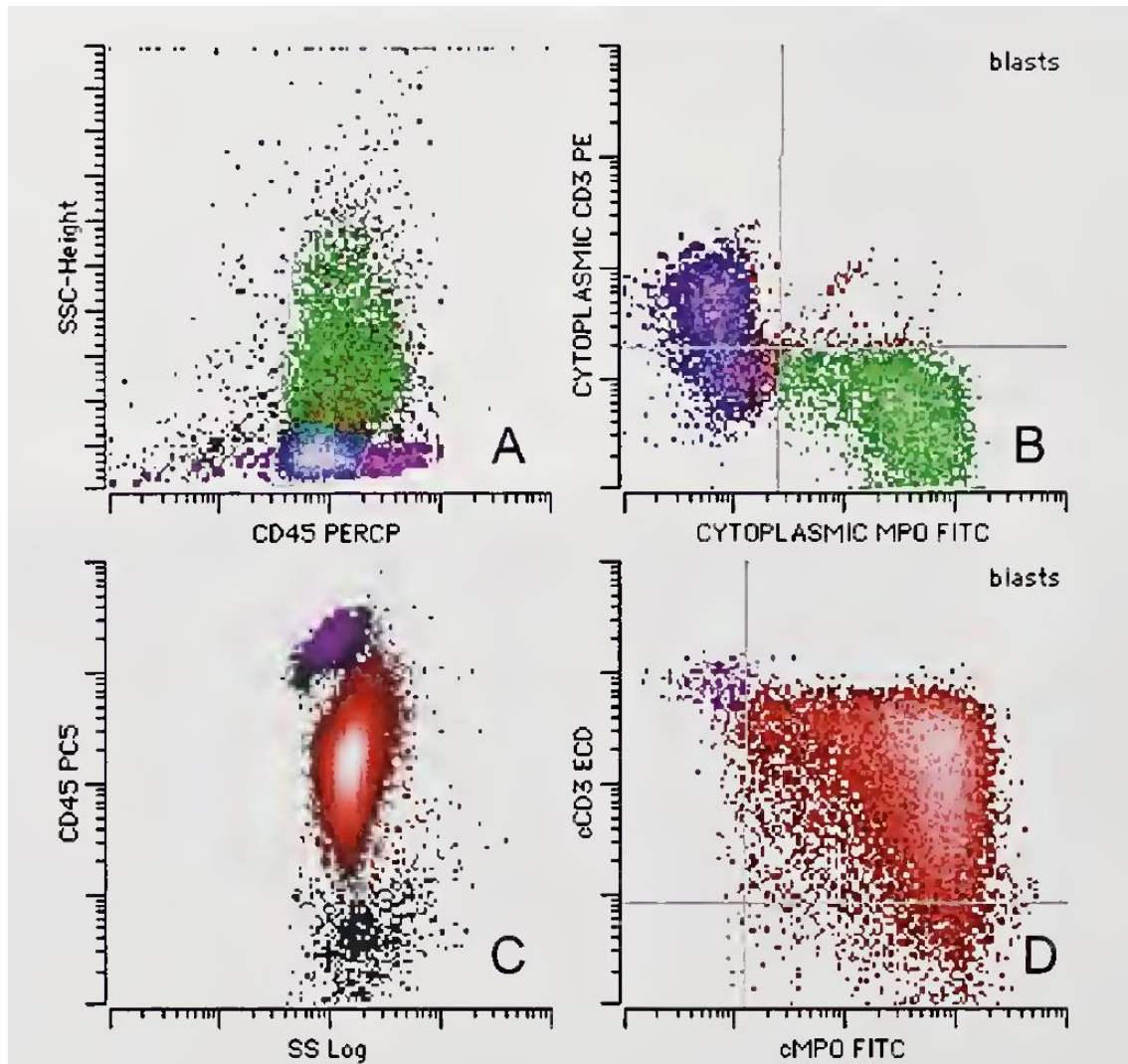


Figura 1: Leucemia aguda de fenotipo mixto, T/mieloide. **A-B** Leucemia bilineal: muestra dos poblaciones de blastos, la morada representa la población de linaje T (CD3+) y la verde muestra la población mieloide (MPO+). **C-D** Leucemia bifenotípica: muestra una sola población de blastos (rojo) que es doblemente positiva para el marcador mieloide (Mieloperoxidasa - MPO) y linfocito T (CD3). Tomado de Borowitz e investigadores, 2017.

Históricamente, existe una confusión con respecto a la terminología y definición de las Leucemias Agudas de Linaje Ambiguo, principalmente las MPAL. El término Leucemia Aguda Bilineal (BAL) se ha aplicado a las MPAL con poblaciones separadas de blastos de más de un linaje. El término Bifenotípico se ha reservado a MPAL que contienen una sola población de blastos co-expresando antígenos de más de una línea celular. Acorde a la OMS, la definición Leucemia Aguda de Fenotipo Mixto es aplicada a la presentación bifenotípica o bilineal, los términos derivados Leucemia B/Mieloide, Leucemia T/Mieloide o Leucemia B/T/Mieloide se refieren a leucemias conteniendo dos o tres linajes específicos, sin importar si de una población u otra hay mayor cantidad de blastos. Algunas LMA bien definidas pueden tener características inmunofenotípicas que

pueden sugerir una clasificación como Leucemia B/Mieloide o Leucemia T/Mieloide (Figura 2). La clasificación de la MPAL excluye los casos que pueden ser clasificados, genética o clínicamente en otra categoría, como los casos de LMA con alteraciones recurrentes como t(8;21), inv(16), t(15;17). Por ejemplo, casos de LMA con t(8;21) pueden expresar múltiples marcadores de linfocito B de forma aberrante; casos de Leucemia con rearreglo en FGFR1 expresan marcadores de línea T de manera aberrante (2,17,18).

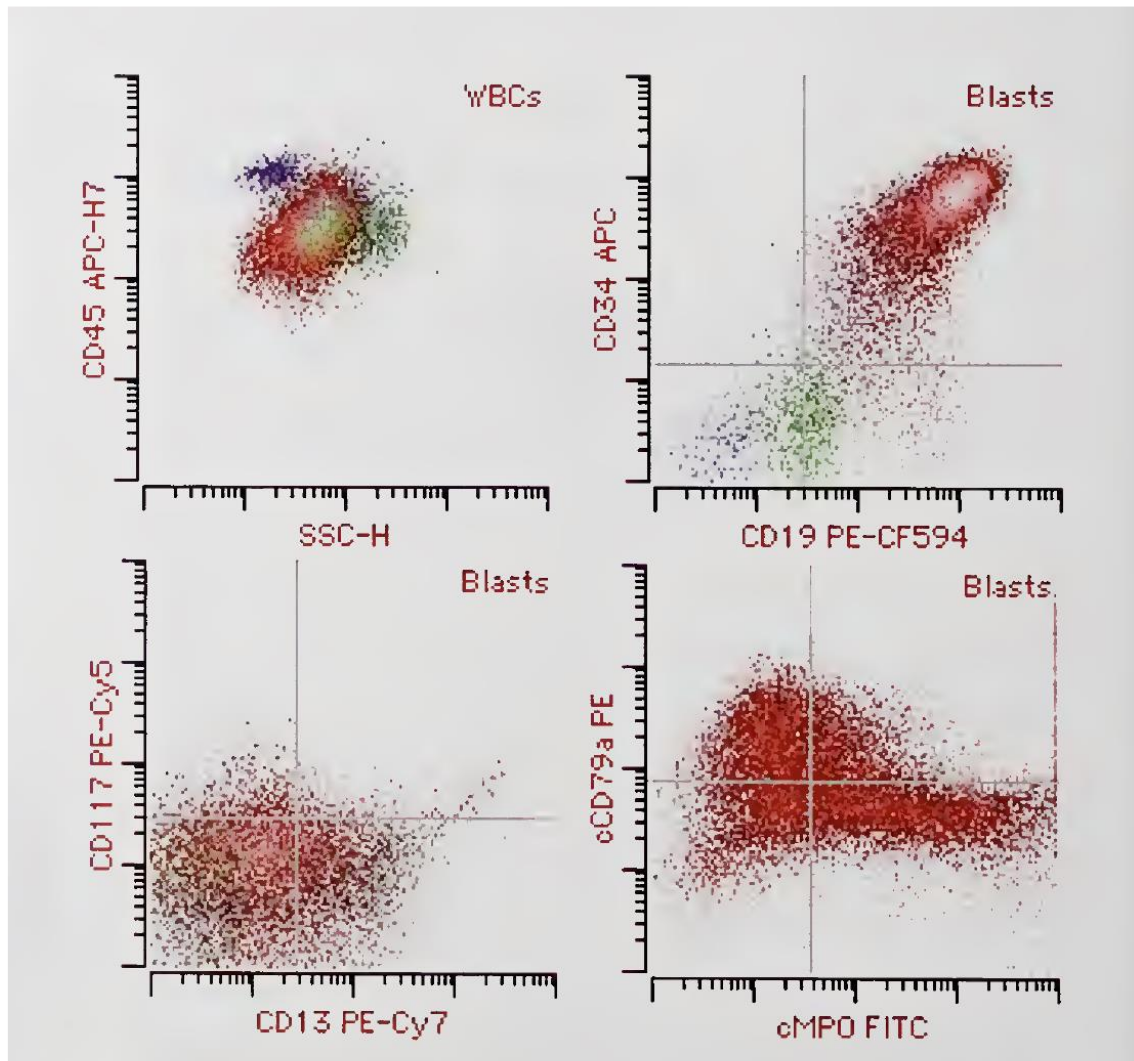


Figura 2. Leucemia aguda de fenotipo mixto B/mieloide. En la figura se observa una población de blastos relativamente uniforme CD34+ y CD19+, con expresión mínima de CD117 y CD13. Sin embargo, notese la población con expresión heterogénea de marcadores CD79a+ y MPO+, la población MPO+ carece de CD79a. Tomado de Borowitz e investigadores, 2017.

De acuerdo con la clasificación de la OMS más reciente (2017), en las Leucemias Agudas de Linaje Mixto, se agrupan 5 entidades: leucemia aguda indiferenciada, MPAL con t(9;22)(q34.1;q11.2), MPAL con t(v;11q23.3), MPAL B/mieloide sin otra especificación y MPAL T/mieloide sin otra especificación (9) (Figura 3).

Adicionalmente, la OMS en el 2017, adicionó un sexto subtipo de Leucemia Aguda de Fenotipo Mixto en donde se encuentran los tipos raros (2). No obstante, en caso que la leucemia presente cariotipo complejo, con más de tres aberraciones cromosómicas, se excluye su diagnóstico y se clasifica separadamente como LMA con cambios mielodisplásicos relacionados (5).

WHO myeloid neoplasm and acute leukemia classification

Acute leukemias of ambiguous lineage

Acute undifferentiated leukemia

Mixed phenotype acute leukemia (MPAL) with t(9;22)(q34.1;q11.2); *BCR-ABL1*

MPAL with t(v;11q23.3); *KMT2A* rearranged

MPAL, B/myeloid, NOS

MPAL, T/myeloid, NOS

Figura 3: Clasificación de la Organización Mundial de la Salud sobre la Leucemia aguda de linaje ambiguo. Tomado de Arber e investigadores, 2017.

Actualmente, la clasificación de la Organización Mundial de la Salud define a las leucemias agudas de linaje ambiguo en 6 categorías (2):

1. **Leucemia Aguda Indiferenciada (AUL):** Los criterios inmunofenotípicos para establecer el diagnóstico de la AUL han estado en constante definición en el tiempo, sin embargo, comprenden la falta de expresión de marcadores de linaje específicos (2,3,19). Antes de esta caracterización es necesario analizar el inmunofenotipo con un amplio panel de marcadores monoclonales para excluir leucemias de linajes inusuales como los derivados de células dendríticas, precursores de células NK, basófilos o tumores no hematopoyéticos. Al microscopio, los blastos no tienen características morfológicas para diferenciación mieloide y son negativos para marcadores como mieloperoxidasa y esterasa (2).
2. **Leucemia aguda de fenotipo mixto (MPAL) con t (9;22) (q34.1;q11.2); BCR-ABL1:** Cumple con los criterios de MPAL y además tiene blastos con la traslocación del cromosoma Philadelphia (Ph) y el rearrreglo BCR-ABL1. Algunos pacientes con LMC en fase blástica desarrollan blastos de linaje mixto, sin embargo, no pueden ser clasificados como MPAL al ser una progresión de una

enfermedad previa. A pesar de ser una leucemia rara, esta es la más frecuente de las leucemias agudas de linaje ambiguo y es más prevalente en adultos. Al microscopio se observan blastos dimórficos, unos de aspecto linfoide y otros de aspecto mieloide. Su contraparte normal propuesta es la Célula Madre Hematopoyética Multipotente, ya que no hay evidencia que esta leucemia derive de otra célula como lo hacen las otras células Ph positivo (2,19).

3. **MPAL con t(v;11q23.3); rearreglos en KMT2A:** Cumple con los criterios de MPAL y además tiene blastos con la traslocación en el cromosoma 11q23 que involucra al gen KMT2A, anteriormente llamado MLL. Este tipo, a diferencia de la anterior, es más común en niños que en adultos, siendo relativamente más común en la infancia. Al microscopio se ve una población dimórfica de blastos, unos de aspecto monocitoide y otros de aspecto linfoide, pero en algunos casos, se ha reportado como población morfológicamente homogénea de blastos (2,19).
4. **MPAL B/mieloide, sin otra especificación (NOS):** Cumple con los criterios de MPAL T/mieloide pero no cumple con los criterios de otro subgrupo genético. Es una leucemia rara, abarcando el 1% de las leucemias y es más común en adultos que en niños. Al microscopio pueden tener una sola población de blastos o tener dos poblaciones dimórficas (2). Los blastos en esta categoría carecen de las anormalidades genéticas del cromosoma Philadelphia o del MLL (19).
5. **MPAL T/mieloide, NOS:** cumple con los criterios para linaje T y mieloide, pero sus blastos carecen de las anormalidades citogenéticas descritas anteriormente. Ocurre principalmente en adultos, pero en niños a una mayor frecuencia que MPAL B/mieloide NOS. Al microscopio pueden tener una sola población de blastos o tener dos poblaciones dimórficas (2). Los blastos en esta categoría carecen de las anormalidades genéticas del cromosoma Philadelphia o del MLL (19).
6. **MPAL, NOS, tipos raros:** en ciertas publicaciones se han identificado casos de leucemia que muestran evidencia de compromiso en linaje T y linaje B o de forma trilineal (T/B/Mieloide) (19). Este fenómeno es muy raro, con una frecuencia aún menor que los otros subtipos de leucemia. Estrictamente aplicado, los criterios de caracterización del Grupo Europeo de Caracterización Inmunológica de Leucemias (EGIL, por sus siglas en inglés, *European Group for the Immunological Characterization of Leukemias*), al otorgar dos puntos por la expresión del CD79a, podría sobrestimar la incidencia de leucemia B/T, porque

el CD79a puede ser detectado en Leucemias Linfoblásticas T con ciertos anticuerpos. Por ello, en el estudio de un posible caso de MPAL B/T, no deben considerarse CD79a ni CD10 en la evidencia de diferenciación de célula B (2). También existen casos de evidencia trilineal (B/T/mieloide), sin embargo, por la escasa incidencia, no es posible realizar categorización acerca de sus características genéticas, clínicas o de pronóstico. A la fecha, no ha habido reportes de MPAL B o T con diferenciación megacariocítica o eritroide. Se ha postulado que los linajes eritroides y megacariocítico se derivan muy tempranamente de la célula madre hematopoyética pluripotente, por lo que el precursor tiene el potencial de diferenciación mieloide o linfoide B/T (2,19).

Epidemiología de la leucemia aguda de linaje ambiguo.

Las leucemias agudas de linaje ambiguo son entidades raras entre leucemias agudas, por lo que la incidencia exacta ha sido difícil de determinar, debido a la variabilidad entre los esquemas previos de clasificación y el sesgo derivado de los datos retrospectivos (5). El reporte de la frecuencia, las características clínicas y la sobrevida de los pacientes con ALAL son dependientes del sistema de clasificación usado al momento del reporte. La clasificación de la OMS del 2008-2016 es más exclusiva que el precedente sistema de EGIL (18). Al ser leucemias de linajes inusuales, históricamente se han reportado como indiferenciadas o bifenotípicas, por la expresión cruzada de antígenos mieloides y linfoides, por lo que la frecuencia de las leucemias agudas de linaje mixto puede ser menor que la reportada. Estas leucemias ocurren en niños y en adultos, sin embargo, hay subtipos de leucemias más frecuentes en los niños (2).

La leucemia aguda de linaje mixto comprende un grupo heterogéneo de enfermedades, en la cual, la Leucemia Aguda de Fenotipo Mixto representa el 2-3% de las leucemias agudas, con una incidencia estimada de 0,35 casos por millón de personas por año, según SEER, Estudio de *Surveillance, Epidemiology and End Results*(16), e incluye los subtipos Mieloide/Linfoide B (~58-59%), Mieloide/Linfoide T (~35-36%), Linfoide B/T (~4%) y trilineal (~2%). Las leucemias agudas indiferenciadas ocurren menos frecuentemente que las de fenotipo mixto y no tienen una incidencia definida (5,8,16). La incidencia parece ser mayor en hombres que en mujeres y tiene una distribución bimodal, con mayoría de casos en menores de 19 años y mayores de 60 años.

La mediana de edad al diagnóstico es de 50 años, menor a la observada en LMA y mayor a la LLA (5,20,21).

La incidencia de aberraciones cromosómicas como el BCR-ABL1 y rearrreglos en MLL se han presentado en frecuencias variadas en la literatura. En el estudio polaco, dirigido por Zajac, se mostró una incidencia mayor de BCR-ABL1 en adultos (15 - 30%) que en niños (4 - 16%), especialmente en el fenotipo B/mieloide, mientras los rearrreglos en KMT3A son reportados con más frecuencia en niños (11-12%) comparado con adultos (4-8%) (20).

En estudios anteriores a la publicación de la clasificación de la OMS, se ha reportado una prevalencia de leucemia aguda de fenotipo mixto en el rango de 2 - 20% de todas las leucemias; mientras que usando los criterios EGIL (por puntaje según línea celular) se muestra una frecuencia del 2 - 5% (3,17). En varios estudios realizados, se tiene que no hay diferencias en edades con respecto a la presentación de la enfermedad (22). La frecuencia usando los criterios de la OMS 2008 no es clara, sin embargo se muestra una frecuencia de menos del 3% del total de leucemias, significativamente menor comparado con la clasificación EGIL (3).

Esta enfermedad es rara, de prevalencia baja entre las leucemias agudas, por lo que hay limitado conocimiento o estudios en esta patología. Dada la rareza en sí de la enfermedad y del limitado conocimiento de la patogénesis, los estudios de progresión de la enfermedad y tratamiento están basados en análisis retrospectivos de cohortes de pocos pacientes. La terapia no está bien establecida, llevando a inconsistencias entre las opciones de tratamiento con régimen contra LMA o LLA (17).

CAPÍTULO 2: HISTORIA NATURAL DE LA LEUCEMIA AGUDA DE LINAJE AMBIGUO.

Origen celular clonal de la ALAL

La maduración y diferenciación de las células sanguíneas durante la hematopoyesis está asociada a la expresión del conjunto de marcadores que definen el linaje (18). La célula madre hematológica multipotente normalmente se diferencia en mieloide, linfóide B o T por un proceso complejo de maduración influenciado por muchos factores de transcripción. Este proceso depende precisamente, de los niveles de estos factores de transcripción, la permanencia en el tiempo de expresión y las interacciones con los otros factores, siendo sinérgicos o antagónicos. Por ejemplo, es sabido que el desarrollo linfóide B es dependiente de la alta expresión del factor de transcripción PAX-5 y que la supresión de este por C/EBP α puede inducir fenotipo mieloide o de fenotipo mixto en células comunes progenitoras linfoides (5). C/EBP α por si solo es requerido para la diferenciación mieloide, mientras la señalización NOTCH es necesaria para promover el desarrollo a progenitores de célula T (Figura 4). Los progenitores hematopoyéticos tempranos son conocidos por expresar marcadores de múltiples líneas, con la selección de destino única que se basa en la regulación multinivel de la transcripción de los factores de expresión para promover un fenotipo específico y también suprimir la programación alternativa. Este proceso se conoce como cebado de línea. La MPAL parece surgir a partir de la desregulación de los mecanismos que especifican el linaje celular, a través de disrupciones genéticas ocurriendo en una secuencia de tiempo específica o por alteraciones epigenéticas desacopladas (5,18).

El tiempo y el nivel de expresión de un factor de transcripción específico puede afectar la determinación del linaje; es posible que la competencia de factores de transcripción antagonice las funciones de uno con respecto a los otros, promoviendo la expresión de un linaje sobre el otro (5). Alternativamente, la desregulación y la expresión aberrante de los factores de transcripción que gobiernan la diferenciación celular ocurren como bases de las alteraciones genómicas y epigenéticas. Por ejemplo, la reducida expresión de PAX5 en las hematogonias, se ha asociado con células bifenotípicas y en leucemia aguda, lo que demuestra que altos niveles de PAX5 son críticos en el desarrollo de linaje B, mientras que niveles bajos resultan en fenotipo mixto; la supresión que ejerce C/EBP α sobre PAX-5 lleva al progenitor común linfóide a diferenciarse en fenotipo mieloide

(18,23,24). En la misma línea, la diferenciación linfoide T depende de los altos niveles de expresión de NOTCH, el cual si esta disminuido, favorece la diferenciación mieloide. Esto es consistente con el hecho que las aberraciones en NOTCH1 están solo presentes el MPAL T/mieloide (23,25).

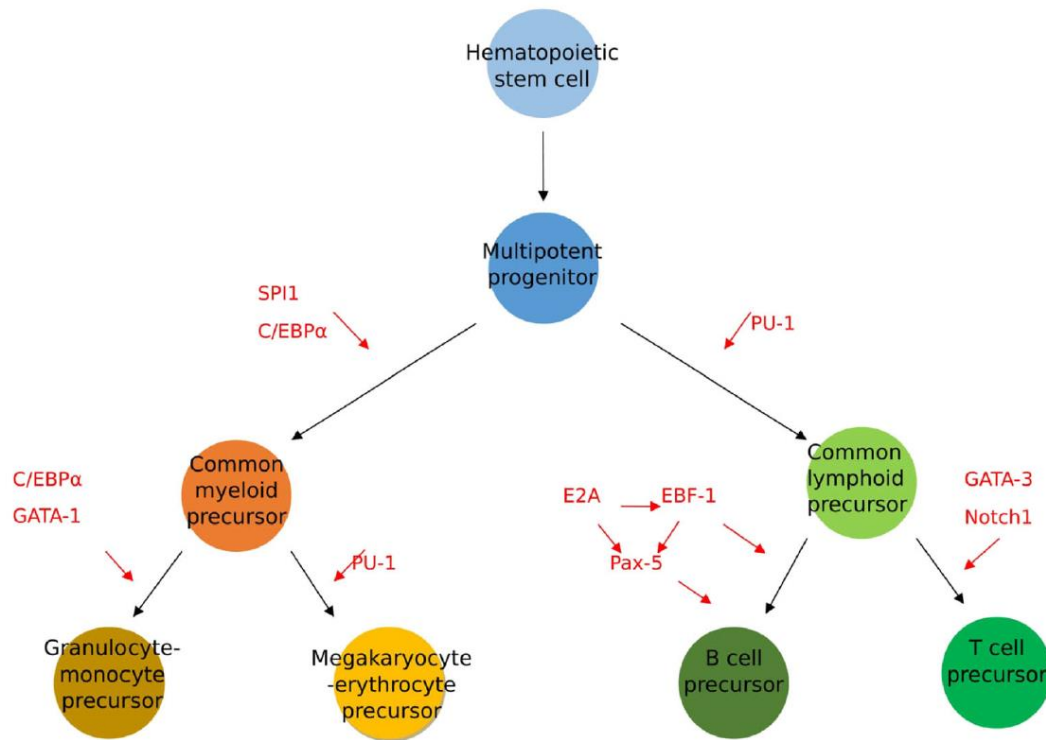


Figura 4: Diferenciación de la Célula Madre Hematopoyética. Note los factores de transcripción clave como C/EBPα para diferenciación mieloide, Pax-5 para linfoides B y Notch1 para linfoides T. Tomado de (5).

La desregulación y la expresión aberrante de los factores de transcripción que gobiernan la diferenciación celular ocurren en las alteraciones base de la genómica y epigenética de la leucemia aguda. El perfil de expresión de genes en los pacientes con LMA correlacionan con el fenotipo T/mieloide con un perfil distinto de expresión que incluye a C/EBPα promotor de hipermetilación y silenciador de genes y la estimulación de la señalización celular T, por la activación aberrante de la señalización NOTCH1 (26). Mutaciones que activan NOTCH1 fueron previamente descritas en el contexto de cambio de línea de LMA a LLA-T, sugiriendo el rol mutacional en los factores de transcripción en la reprogramación celular a línea específica. Las mutaciones pueden interrumpir el

desarrollo del fenotipo; la LLA de precursores tempranos T está asociada a mutaciones características de neoplasias mieloides, como DNMT3A, IDH1/2 (18).

En los años 80's, dos hipótesis surgieron para explicarla. Una de ellas es la Hipótesis de Greaves que sugiere la promiscuidad de línea, en la cual los progenitores hematopoyéticos poseen el potencial multilineal que es preservado como una reliquia si la transformación leucémica ocurre en este punto, esto por alteraciones genéticas fundadoras invariantes presentes a través del desarrollo filogenético (27). La otra hipótesis es la infidelidad de línea, en donde las células leucémicas expresan “desprogramación” de origen oncogenético, resultando en la expresión de blastos multilineales, es decir, adquisición secuencial de las mutaciones somáticas que dirigen a la célula a la expresión de un fenotipo multilineal (18,25,28).

El modelo clásico de jerarquía hematopoyética visualiza una temprana dicotomía, desde una célula madre hematopoyética pluripotencial autoperpetuable, hasta un progenitor multipotencial que ha perdido esta capacidad de autorrenovación pero mantiene su potencial de formar múltiples linajes. No obstante, se ha identificado progenitores linfoides aparentemente restringidos con capacidad de generar granulocitos o macrófagos, llamándose progenitores linfoides multipotentes primitivos. Recientemente se ha sugerido el origen de esta enfermedad como un proceso de maduración temprano del continuo de células hematopoyéticas indiferenciadas y células progenitoras (CLOUD-HSPC, por sus siglas en inglés, *continuum of low-primed undifferentiated hematopoietic stem and progenitor cells*). Esta teoría ha permitido la apertura del concepción de arresto en la maduración de la leucemogénesis, apoyando la proliferación de células en diferentes estados de diferenciación en su continuo que puede ser el origen de la ALAL (25,29).

Hallazgos citogenéticos y moleculares en MPAL

No hay aberraciones cromosómicas únicas asociadas a la leucemia aguda de fenotipo mixto. Las anormalidades se presentan en mayoría con anormalidad clonal, en menor proporción con cariotipo normal (3,20,30). La mayoría de los casos de MPAL están asociados con cariotipo anormal (64-87% aproximadamente). Dos lesiones genéticas se han reportado frecuentemente en MPAL, suficientes para ser consideradas como entidades separadas: la traslocación que involucra el gen 11q23 y la t(9;22)

(q34;q11.2) o el rearrreglo *BCR-ABL1*, la cual no debe confundirse en el diagnóstico de la fase blástica de la Leucemia Mieloide Crónica. Estas dos traslocaciones frecuentes se asocian al fenotipo MPAL B/mieloide (3,16). El rearrreglo MLL yuxtapone el extremo amino-terminal de la metiltransferasa de histonas MLL con una variedad de diferentes compañeros de fusión por la traslocación. A la fecha se han caracterizado más de 70 compañeros de fusión, siendo la desregulación en la expresión de genes HOX los relacionados a leucemogénesis. La expresión HOX es alta en células madre y en precursores tempranos, por lo que necesita ser regulado a la baja para la maduración. La expresión de HOX ectópica puede estar relacionado a la creación de precursores preleucémicos que pueden progresar en varias formas de leucemia (8).

Cerca del 70% de los pacientes con MPAL presentan anormalidades citogenéticas y la mayoría presenta cariotipo complejo (29,30). Estas anormalidades sumadas a las mutaciones genéticas demuestran la inestabilidad genética de esta leucemia (23). Entre las anormalidades más frecuentemente encontradas están la delección del 6q, 5q y 12p, monosomía del 5, monosomía 7, polisomía 21 y trisomía 8 (5). De igual manera, se ha observado una mayor expresión de los genes *MDR1*, *CEBPA*, *IGH*, *TCR* en pacientes con leucemia bifenotípica (3). Otras anormalidades comúnmente vistas en asociación con el fenotipo B/Mieloide son la del(1p32), trisomía 4, del(6q), aberraciones en 12p11.2 y tetraploidía. La t(9;22), como aberración citogenética más frecuente, está identificada en el ~15-30% de los casos, principalmente en adultos, en niños, la incidencia es del 4-16% aproximadamente; la MPAL con rearrreglos en *KMT2A* comprende el 10% aproximadamente de los casos de Leucemia Aguda de Linaje Ambiguo y son comunes en niños (11-12%) comparado con los adultos (4-8%) (5,16,17). El compañero de fusión más común en los rearrreglos con *KMT2A* es *AFF1* pero se han descrito como compañeros a los genes *MLLT1* o *MLLT3*. Estudios han reportado rearrreglos en el cromosoma 12, específicamente en el gen *ZNF384*, en MPAL B/mieloide pediátrica, con compañeros de fusión variables como *TCF3*, *EP300*, *TAF15*, *CREBBP*. Este rearrreglo no se ha identificado en adultos (16). Estudios han demostrado que el subtipo de MPAL B/Mieloide muestran frecuentemente un cariotipo complejo en comparación con la MPAL T/Mieloide (31). Con el advenimiento de la secuenciación de nueva generación (NGS), combinado con los datos obtenidos del cariotipo, se dice que un 93% de los casos de ALAL tienen mutaciones o anormalidades citogenéticas (17).

Aunque no está bien definido, el dogma prevalente acerca de la ontogenia mutacional de MPAL indica el hallazgo de mutaciones que ocurren en la célula de origen, en vez de acumulación de mutaciones corriente abajo que promueven promiscuidad de línea (27). Mutaciones encontradas en MPAL se han visto documentadas tanto en LMA como LLA. En intentos de entender mejor el perfil mutacional de la ALAL y su origen celular, se ha realizado la secuenciación del exoma completo y del transcriptoma a pacientes al momento del diagnóstico de la enfermedad. En pacientes con ALAL se han encontrado mutaciones genéticas comunes a las encontradas en otras neoplasias hematopoyéticas, encontrando genes mutados como *DNMT3A*, *RUNX1*, *TP53* y *KMT2D* (*MLL2*) (5,27). De igual manera, se ha encontrado con prevalencia las mutaciones en la vía de reparación del ADN. Mientras ninguna de estas mutaciones son recurrentes en la ALAL, se han encontrado muchos truncamientos en el marco de lectura y mutaciones sin sentido, llevando a la pérdida de función de la proteína codificada. Algunos de estos son mutaciones en *BRCA2*, mutación de cambio de marco de lectura en *PRKDC*, cuyo efecto es pérdida en la reparación del ADN y es requerido para la recombinación VDJ, mutación deletérea en el marco de lectura en el gen de anemia de Fanconi (*FANCD2*), mutación en genes de reparación de ADN como *MDC1*, *CHEK1* y *PARP1*. Mutaciones en *TP53* ocurren en pacientes con cariotipo complejo y con deleciones en cromosoma 17 o 17p (9,32).

Los estudios desarrollados en el panorama genético de esta enfermedad han detectado distintos tipos de frecuencias en mutaciones genéticas de MPAL. Estudios de secuenciación del exoma completo han mostrado mutaciones en genes regulatorios epigenéticos como *DNMT3A* hasta en una tercera parte adultos estudiado (17,32). Genes mutados involucran una variedad de funciones celulares incluidas la modificación de la cromatina, metilación del ADN, genes supresores de tumores, factores de transcripción y en señalización celular (Cuadro 1) (23).

La presencia de mutaciones en la vía de reparación del ADN puede explicar las disregulaciones en el ciclo celular, en la diferenciación celular hacia una línea y explicar la pobre respuesta a quimioterapia convencional (9). Estas mutaciones ocurren temprano en el desarrollo celular y les permite retener el potencial de adquirir características mieloides o linfoides (17,27). Sin embargo, desde otra perspectiva, las deficiencias en la vía de reparación del ADN pueden ser explotadas terapéuticamente para aumentar la destrucción de células tumorales mediante la terapia. Basándose en datos provenientes de

secuenciación de ADN en pacientes con ALAL, el fenotipo mixto puede ser parcialmente explicado por las mutaciones simultáneas de genes alterados recurrentemente en leucemias linfoides y mieloides así como la alteración en los genes de expresión de línea mieloide y linfóide (9).

Cuadro 1. Genes mutados frecuentemente encontrados en pacientes con ALAL según su función celular.

Función celular	Genes mutados
Participación en la modificación de la cromatina	ASLX1
Efecto en la metilación del ADN	DNMT3A, IDH, TET2
Genes supresores de tumores	TP53 y WT1
Factores de transcripción	NOTCH1, RUNX1 y GATA1/2
Vías de señalización de activación celular	FLT3, EGFR, NRAS y JAK2, KRAS, NF1

Tomado de Eckstein, 2016; Quesada, 2018 y Yong, 2020.

El perfil mutacional de MPAL es heterogéneo. Cuando una mutación genética en MPAL está presente, mutaciones en otros genes son comunes. Las frecuencias alélicas variantes, técnica que cuantifica la proporción de secuencias variantes detectadas en genes co-mutados, demuestra la varianza mutacional de la ALAL, lo que es consistente con la naturaleza heterogénea de esta leucemia (23,33). El perfil mutacional de MPAL no puede ser catalogado como híbrido entre LMA y LLA, ya que las mutaciones, aún en los genes asociados a linaje mieloide, están presentes en LMA y LLA. Algunas mutaciones tienen altos valores de frecuencia alélica variante, sugiriendo que han sido involucradas en la iniciación de la enfermedad, como lo son DNMT3A, RUNX1, IDH2, TET2 y SRSF2. Por otro lado, las mutaciones FLT3, ETV6, IL7R, p53, IKZF1, BCOR, CSF3R,

WT1 que son típicamente subclonales, tienen valores de frecuencia más bajos, lo que indica que son segundos eventos involucrados en la progresión de la enfermedad (21).

En uno de los estudios más grandes sobre MPAL realizado en China, se encontró que la delección *IKZF1* se encontró en un 13% de casos mieloides/B, mutación en *EZH2* en 9.7% de casos mieloides/B y mieloides/T, *ASXL1* en 6,5% de casos mieloides/B, *TET2* en 3.2% de casos mieloides/B, *ETV6* en 3.2% de casos mieloides/T y *NOTCH1* en 3.2% de casos mieloides/T. Adicionalmente, en análisis de microarreglos, se ha encontrado alteraciones crípticas del número de copias en los genes *CDKN2A*, *IKZF1*, *MEF2C*. Mutaciones en *FLT3* se han descrito en pacientes MPAL mieloides/T (34).

En un estudio de casos pediátricos, dirigido en 2018, el uso de la secuenciación del genoma completo, del exoma completo y del ARN, mostró mutaciones en pacientes con ALAL que han sido comúnmente identificados en LMA como *FLT3*, *RUNX1*, *CUX1* y *CEBPA*, identificadas en LLA como *CDKN2A*, *CDKN2B*, *ETV6* y *VPREB1* o en ambos como *WT1* y *KMT2A*. Uno de los hallazgos más relevantes de este estudio fue el rearreglo en *ZNF384*, característica similar a las LLA-B. Los investigadores mencionan que el perfil de expresión genética en LLA-B con *ZNF384* mutado es igual al encontrado en MPAL B/Mieloides. Además notaron una mayor expresión de la señalización mediada por *FLT3* en pacientes con *ZNF384* mutado, indistintamente del subtipo de MPAL (17,27).

Se han reportado MPAL B/mieloides con delecciones asociadas a LLA como *IKZF1*, así como mutaciones somáticas en modificadores epigenéticos (33% de los casos) como *TET2*, *EZH2*, *IDH2* y *ASXL1*. Mutaciones en genes de señalización celular se han reportado hasta en 61% de los casos, siendo mutuamente excluyentes con los genes reguladores epigenéticos. Estudios de población pediátrica y adulta han identificado más mutaciones asociadas a LMA que las relacionadas a LLA incluyendo *DNMT3A*, *NOTCH1*, *RUNX1*, *WT1*, *IDH2*, *FLT3*, *KRAS*, *NRAS*, *CUX1*, *CEBPA*, *CDKN2A/CDKN2B*, *ETV6*, *PHF6* y *VPREB1*(5,16). Por ejemplo, se han identificado casos en los cuales hay una delección en el gen *IKZF1* y una mutación sin sentido en *HOXB9*, los cuales son genes mutados expresados aberrantemente en LLA y LMA respectivamente. Análisis de frecuencia variante alélica de las mutaciones sugieren que la mutación *IKZF1* ocurrió más temprano en el clon fundador, previo a mutación de ganancia de codón de terminación en *HOXB9*, mientras que una mutación *FLT3* (E598G) fue desarrollada posteriormente durante la evolución clonal. Como otro ejemplo, en un

paciente con AUL se identificaron las mutaciones en *DNMT3A* (de ganancia de codón de terminación) y *IDH2* (R140Q), asociadas a LMA, y además una mutación en *NOTCH1*, asociada a LLA-T. Como tercer ejemplo, un caso de MPAL T/mieloide, que contiene mutación mieloide (*SUZ12*) y linfoide (*NOTCH*) (9).

Las MPAL B/mieloide se han asociado a una carga mutacional más alta con frecuentes mutaciones en reguladores epigenéticos como *EZH2*, *PHF6*, *DNMT3A* y mutaciones en señalización JAK/STAT. Interesantemente, MPAL T/mieloide parecen exhibir un perfil genético similar al de LLA de precursores tempranos de célula T (ETP-ALL, *early T cell precursor Acute Lymphoblastic Leukaemia*), con características compartidas como las mutaciones en *ETV6*, *WT1*, *EZH2*, *DNMT3A* y *FLT3*, que colectivamente distinguen estas dos entidades de LLA-T. Mutaciones en *NOTCH1* han sido identificadas en MPAL T/mieloide (~10-15%), siendo menos frecuente en LLA-T y ETP-LLA (16,32). Según lo observado, en estudios realizados, la MPAL B/Mieloide tiene menor cantidad de mutaciones con respecto a la MPAL T/Mieloide (23). Comparado con MPAL B/mieloide y T/mieloide, MPAL B/T son raras. En los pocos casos descritos, se han identificado mutaciones como *PHF6*, *WT1*, *JAK3*, *MED12*, *CTCF*, *IL7R*, *NOTCH1*, *SF3B1*, *PTPN11*, *EZH2*, *DNMT3A* y *TP53* (5,16). Interesantemente, mutaciones en *NPM1* y *CEBPA*, que definen a subtipos específicos de LMA, no han sido observadas en pacientes con MPAL (23).

Estas mutaciones presentadas en MPAL B/mieloide y T/mieloide sugieren en cierta manera que una mutación particular perturba el programa de diferenciación, creando una imagen de infidelidad de línea (21)

Cambios moleculares detectados en pacientes con Leucemia Aguda Indiferenciada

A pesar de la rareza de la AUL, las investigaciones sugieren que su perfil de expresión genética está relacionado con la sobreexpresión de ciertos marcadores de pronóstico pobre en LMA como *BALLC*, *ERG* y *MN1* (16). Se han observado alteraciones asociadas con síndromes mielodisplásicos (SMD) y LMA secundaria en pacientes con AUL. Los casos de esta leucemia se han relacionado a alteraciones cromosómicas como la *del5/5q*, *del7/7q* y *del17/17p*, trisomía del cromosoma 12 y 13, así como mutaciones como *DNMT3A*, espliceosoma (*ZRSR2*), *RUNX1*, complejo de cohesinas (*STAG2*, *RAD21*) y *TP53* (9,16). Análisis de secuenciación de ARN revelaron

una expresión más cercana de la expresión de la AUL a la LMA en contraste a la cercanía de MPAL t(9;22)(q34.1, q11.2) con la LLA-B (9). Cuando se compara con otros tipos de ALAL, pacientes con AUL tienden a tener más edad, menor sobrevida y un perfil clínico similar a pacientes con LMA secundaria. Esta observación sugiere que en la mayoría de los casos de AUL, definidas por la OMS, pueden tener una derivación mieloide con mutaciones de LMA secundaria y SMD, no obstante, esta observación puede estar sesgada por los pocos casos, por lo que se requiere una cohorte más alta para establecer esta hipótesis (9).

Basándose en datos obtenidos a través de perfil de metilaciones, estudios han mostrado que las Leucemias Agudas de Fenotipo Mixto pueden ser agrupadas en “MPAL similar a LMA” o “MPAL similar a LLA”. Se ha evidenciado que las leucemias MPAL B/Mieloide pueden ser agrupadas mayoritariamente en LLA-B, mientras tanto, las AUL parecen compartir perfil de expresión genética y mutacional con las LMA (9).

CAPÍTULO 3: DIAGNOSTICO CLÍNICO Y DE LABORATORIO DE LA LEUCEMIA AGUDA DE LINAJE AMBIGUO.

El diagnóstico de la leucemia aguda de fenotipo mixto depende del inmunofenotipo. La citometría de flujo es el método preferido para establecer el diagnóstico, especialmente en los subtipos en los cuales hay una co-expresión de marcadores mieloides y linfoides en una misma célula. En los casos en los que se encuentren dos poblaciones celulares, el diagnóstico puede realizarse también por inmunohistoquímica, aplicada en tejidos o en citoquímica convencional (2).

Diagnóstico Clínico

Los síntomas clínicos en un paciente con MPAL son típicamente los característicos de la leucemia aguda, están dados por el fallo medular. Estos síntomas incluyen fatiga, infecciones y sangrados debido a anemia, trombocitopenia, leucocitos residuales disfuncionales y supresión inmune general. El recuento leucocitario es alto y la mayoría tiene alto porcentaje de blastos (3,5,17). En adición, la hepatoesplenomegalia o linfadenopatías pueden estar presentes. No obstante, se han descrito casos en los cuales el diagnóstico se ha realizado en pacientes asintomáticos, en donde la leucemia es un hallazgo incidental en chequeos médicos de rutina. Esto responde al grado de afección de otras líneas, es decir, en casos donde la hemoglobina, la funcionalidad de los glóbulos blancos no clonales y el recuento plaquetario están ligeramente afectados, las manifestaciones clínicas del paciente no serán acentuadas (17).

Diagnóstico de Laboratorio

Caracterización morfológica

La morfología blástica de la Leucemia Aguda de Linaje Ambiguo refleja una diversidad de alteraciones fenotípicas y genéticas. Los blastos de la AUL típicamente carecen de características mieloides (granulación azurófila citoplasmática, cuerpos de Auer) y son frecuentemente pequeños o medianos en tamaño, con relación núcleo/citoplasma a favor del núcleo, núcleos redondos, nucleolos prominentes y citoplasma escaso. Algunas diferencias morfológicas como mayor una cantidad de citoplasma, vacuolas o apariencia de “espejo de mano” pueden presentarse y recordar una

leucemia linfoblástica. En concordancia con la heterogeneidad intrínseca de las MPAL, los blastos pueden incluir características mieloblásticas, monoblásticas y/o linfoides. La población de blastos puede ser dimórfica o similar a la descrita en las AUL (ver Figura 5). Las MPAL con traslocación BCR-ABL1 o con traslocación del gen MLL expresan población dimórfica comprometida de mieloblastos/linfoblastos o monoblastos/linfoblastos respectivamente (6,8,31).

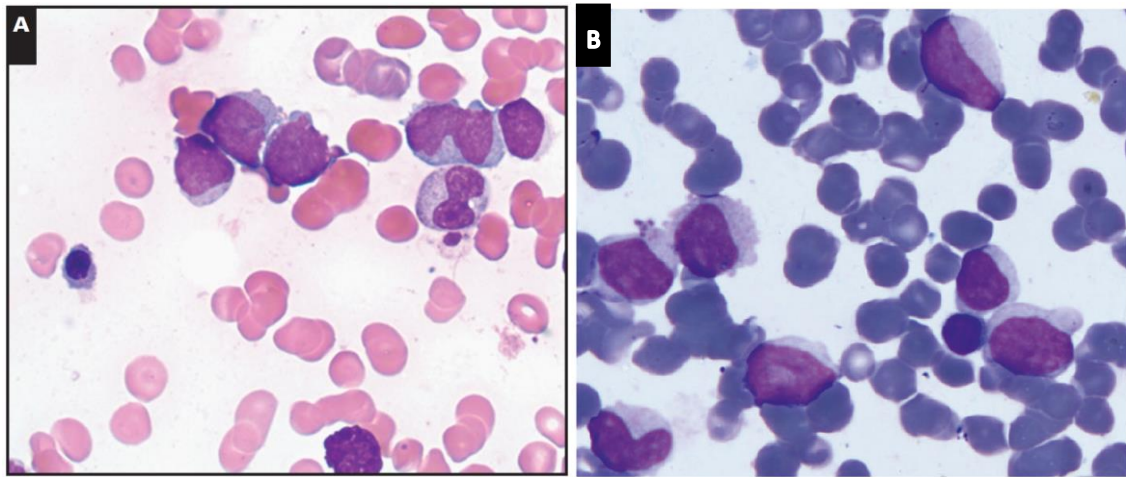


Figura 5: Frotis de sangre periférica donde se muestran blastos pertenecientes a una Leucemia Aguda de Linaje Ambiguo. **A.** Foto de frotis de sangre periférica de MPAL B/T. **B.** Foto de sangre periférica de Leucemia Aguda Indiferenciada. Nótese la heterogeneidad de las células inmaduras con respecto a su morfología. Modificado de Porwit & Béné, 2015 y Olga K. Weinberg, 2019)

Desde el punto de vista morfológico, la presentación de MPAL es heterogénea y la mayoría de los pacientes presentan blastos con morfología linfoblástica o mieloblástica, con o sin diferenciación monocitoide. Por tanto, el diagnóstico de MPAL no puede ser siempre sospechado desde la morfología, a excepción de evidencia de blastos duales con características linfoides y mieloides. No obstante, el diagnóstico de MPAL es difícil y debe ser acompañado de inmunofenotipo, citogenética y hallazgos moleculares (20,31).

Caracterización y hallazgos inmunofenotípicos

Historia de la caracterización inmunofenotípica de las MPAL

Con el advenimiento de más anticuerpos disponibles para la caracterización inmunofenotípica de la población leucémica, se volvió claro que hay un porcentaje significativo de las LLA y las LMA que presentan aberraciones inmunofenotípicas, con las cuales se desarrollaron criterios para el diagnóstico de una verdadera leucemia de fenotipo mixto. Uno de los primeros sistemas de puntaje para definir la leucemia aguda

bifenotípica fue propuesta por Catovsky y colaboradores en 1991, los cuales sugieren que se trata de un caso distinto de leucemia aguda, con biología y pronóstico únicos. Este sistema se basó en establecer puntaje a la presencia de distintos marcadores inmunofenotípicos específicos de cada línea celular al momento del diagnóstico (Cuadro 2). Dentro de los marcadores con mayor peso en el puntaje, estaba el CD3 citoplasmático, el CD22 y la mieloperoxidasa (MPO) que permitían diferenciar la leucemia aguda de fenotipo mixto de la leucemia aguda con expresión aberrante de marcadores de otros linajes hematopoyéticos. Dos o más puntos de dos linajes separados son necesarios para clasificarla como bifenotípica (3).

Cuadro 2. Sistema de puntuación propuesto por Catovsky y colaboradores para la leucemia aguda bifenotípica.

Puntaje	Linaje B	Linaje T	Linaje Mieloide
2	cCD2 cadena cμ	cCD3	MPO
1	CD10 CD19 CD24	CD2 CD5 Rearreglo TCR (β o δ)	CD33 CD12 CD14 Morfología mieloide o citoquímica mieloide
0,5	TdT Rearreglos en IgH		CD11b CD11c CD15

Nota: ≥ 2 puntos son requeridos para asignar el linaje. Tomado de Weinberg y colaboradores, 2010.

En 1995, el grupo EGIL, basado en la caracterización de Catovsky, propuso posteriormente la clasificación inmunológica de las leucemias agudas, en donde se incorporó la definición de leucemia aguda bifenotípica (cuadro 3). Según esta clasificación, un puntaje mayor o igual a 2 puntos permite la clasificación de una línea mieloide y de una linfoide, con al menos 20% de las células marcadas con los anticuerpos monoclonales como punto de corte para considerar dicho marcador como positivo. Esto

con excepción de la MPO, el CD3, el CD79a y el TdT, ya que por su alta especificidad, el punto de corte mínimo es de 10% (3,5).

La redefinición del sistema establecido en 1991 tuvo la intención de usar criterios más restrictivos para definir a la enfermedad. Sin embargo, los investigadores y profesionales en salud plantearon preocupaciones rápidamente acerca de estos criterios tales como la falta de especificidad en algunos marcadores como el CD79a en la definición de linaje B y en positividad en MPO para definir línea mieloide. Adicionalmente, este sistema variaba arbitrariamente los puntos de corte en la expresión antigénica celular para ser interpretado como positivo (como ocurrió con la MPO, CD3, TdT y CD79a), no distinguía entre leucemia bifenotípica o bilineal, no incluía la intensidad antigénica y no incorporó los datos citogenéticos (19).

Cuadro 3. Sistema de puntaje revisado EGIL para la leucemia aguda bifenotípica.

Puntaje	Linaje B	Linaje T	Linaje Mieloide
2	CD79a IgM citoplasmático CD22 citoplasmático	CD3 (citoplasmático /membrana) Anti-TCR α/β o δ/γ	Anti-MPO
1	CD19 CD10 CD20	CD2 CD5 CD8 CD10	CD13 Cd33 CDw65 CD117
0,5	TdT CD24	TdT CD7 CD1a	CD14 CD15 CD64

Nota: ≥ 2 puntos son requeridos para asignar el linaje. Tomado de Weinberg y colaboradores, 2010.

En el 2001, la OMS incluyó la categoría de la Leucemia Aguda de Linaje Ambiguo, en donde se puede utilizar el sistema de puntaje EGIL para la clasificación de estas. En esta categoría se incluyó la Leucemia Aguda Indiferenciada, así como las leucemias agudas bilineales y bifenotípicas. Sin embargo, se ha reconocido que la leucemia aguda bilineal, a pesar de tener dos poblaciones de blastos diferentes, puede evolucionar en una leucemia aguda bifenotípica sin relación clara de la razón de esta (3).

Aun cuando la clasificación de EGIL está bien aplicada, la estricta aplicación de esta puede llevar a errores de clasificación, por ejemplo, casos de LMA con t(8;21) (q22;q22) o t(15;17)(q22;q12) pueden ser clasificados como bifenotípicas, porque la expresión de marcadores linfoides B, como CD19, PAX5, CD79a y CD20, son comunes en la LMA con t(8;21) y marcadores linfoides T, como CD2, son frecuentemente asociados a LMA con t(15;17) (3,17). Además, el sistema EGIL no refleja la intensidad de expresión antigénica, que es importante para determinar la especificidad de la línea (3).

Clasificación actual de la MPAL

En el 2017, la OMS clasificó las leucemias bilineales y bifenotípicas indistintamente bajo el nombre de Leucemia Aguda de Fenotipo Mixto, leucemia en la cual se muestra una expresión combinada de antígenos de distintos linajes, en donde no es posible asignar una sola línea y cuya clasificación es por exclusión de otras entidades, como por ejemplo, las LMA con anormalidades genéticas recurrentes (3,5). En casos de dos poblaciones separadas de blastos con distintos patrones de diferenciación linaje específicos, una de esas dos poblaciones de blastos debe cumplir con los criterios de LMA. Se debe tener cuidado en la diferenciación en los casos de LMA cuya presentación inicial tiene hematogonias incrementadas y puede confundirse con la MPAL B/ mieloide (3,35).

El sello de identidad de la leucemia aguda de fenotipo mixto es la combinación de antígenos expresados en una o más poblaciones de blastos que no permite la clasificación en un solo linaje. Se han descrito varios escenarios en la cual esto puede ocurrir (2):

1. En el escenario más simple, hay dos o más poblaciones de blastos: una o más que cumple independiente los criterios de clasificación para LMA y una o más que cumple los criterios para LLA-B o LLA-T. Sin embargo, para la clasificación como leucemia aguda el recuento de blastos debe ser mayor al 20% de las células nucleadas, por lo tanto, esto no debe cumplirse para cada población, sino a la suma de estas. Estos casos se denominaban anteriormente, Leucemia Aguda Bilineal (2).
2. En el segundo escenario, hay una población dominante de blastos que expresan combinación de antígenos que por separado podrían ser considerados específicos

para más de una línea. Hay casos híbridos en la cual la población dominante de blastos es acompañada de una o más poblaciones pequeñas con un inmunofenotipo diferente. En este caso, la clasificación de la leucemia es más rigurosa y hay interpretaciones que deben ser consideradas para llegar al diagnóstico de la MPAL (Cuadro 4) (2).

La mayoría de los casos de MPAL expresan CD45, marcador hematopoyético temprano, además de marcadores CD34, CD38, TdT y HLA-DR. La presencia de estos marcadores sugiere que el origen de la célula leucémica está derivado de progenitores muy tempranos que tiene el potencial de diferenciarse en linaje mieloide o linfoide (3,17). Tanto en adultos como en niños, la enfermedad se manifiesta con mayor porcentaje en la modalidad MPAL B/mieloide, y en menor proporción MPAL, NOS B/T. El marcador CD10 se asocia con muy alta frecuencia en los casos MPAL B/mieloide, y TdT en todos los casos de presentación bifenotípica de la MPAL (3,35).

Cuadro 4. Clasificación de las Leucemias Agudas de Linaje Ambiguo acorde la clasificación OMS 2017.

Linaje	Linaje B
Mieloide	Mieloperoxidasa (por citometría de flujo, inmunohistoquímica o citoquímica) o diferenciación monocitoide (al menos dos: NSE (Esterasa no específica), CD11c, CD14, CD64, lisozima).
Linfoide T	CD3 citoplasmático (por citometría de flujo o inmunohistoquímica) o CD3 de superficie (raro en MPAL).
Linfoide B	CD19++ y al menos uno: CD79a, CD22 citoplasmático o CD10, o CD19+ y al menos dos de los siguientes: CD79a, CD22 citoplasmático o CD10.

Tomado de Borowitz, 2017.

A continuación, se detallan las especificaciones recomendadas por la OMS para la determinación del linaje celular en el conjunto de células blásticas.

- **Componente de célula T en MPAL:** está caracterizado por una fuerte expresión de CD3 citoplasmático (CD3c o cyCD3) y la usual ausencia de CD3 de superficie. La expresión de CD3c es mejor determinado por citometría de flujo, usando fluoróforos brillantes como la ficoeritrina y la aloficocianina. A pesar de que la expresión de CD3c es comúnmente heterogénea, la intensidad de la fluorescencia debe ser equivalente a la fluorescencia observada en los linfocitos T residuales. El linaje T puede también ser demostrado con marcaje inmunohistoquímico para CD3, sin embargo, pueden haber falsos positivos con células NK activadas (2). En casos de LMA puede haber expresión aberrante de CD2, CD4, CD5 o CD7, por lo que la correcta interpretación del CD3 citoplasmático es importante para el diagnóstico final (8).
- **Componente de célula B en MPAL:** es caracterizado por la expresión de CD19 de superficie con CD10, o en ausencia de CD10 con la presencia de CD79a citoplasmático, CD22 o PAX5 (generalmente por inmunohistoquímica). Una intensidad de fluorescencia de CD19 en los blastos debe ser comparable a los linfocitos B residuales para ser considerado como marcador específico de línea. Se debe tener la precaución cuando se CD19 es el único marcador en la población en estudio. Si la expresión de CD19 es débil, la presencia de dos marcadores adicionales es requerida. CD19 puede estar negativo con otros tres marcadores de célula B presente, sin embargo, esta posibilidad es excepcionalmente rara (2).
- **Componente mieloide en MPAL:** El marcador más específico para el componente mieloide es la MPO en el citoplasma del blasto. En casos que el componente mieloide es de origen monocítico, la MPO puede estar negativa y la evidencia de diferenciación monoblástica puede ser considerada aceptable, incluida la positividad difusa de NSE o expresión de CD11c, CD14, CD36, CD64 o lisozima. Sin embargo, a pesar de la alta especificidad de la MPO, su uso como criterio único del componente mieloide en MPAL ha sido problemático, en parte por los factores técnicos asociados con su medición, específicamente, reacciones cruzadas de los anticuerpos anti-MPO con linfoblastos B y expresión inespecífica. En algunos casos de LLA-B se ha encontrado MPO+ lo cual no posee importancia clínica asociada de momento, por lo que se debe tener en consideración en la clasificación de las leucemias con una sola población de blastos linfoides B con débil expresión de MPO. Criterios adicionales en el diagnóstico de MPAL con componente mieloide son CD117 (KIT) y expresión fuerte de CD13 y CD33

(2,29). La expresión del marcador MPO ha tenido relevancia discutida en la literatura. En guías previas de la FAB, basadas en citoquímica, el 3% de blastos positivos por MPO permitían denominar el componente mieloide en la leucemia. Este corte aumentó a 10% en la clasificación de EGIL, sin embargo, se encontraron casos discordantes cuando se comparó entre ambas guías, llevando a la conclusión que el punto de corte de 10% es conservador pero no sensible. Como el marcaje inmunofenotípico de MPO responde a diferencias en los reactivos permeabilizantes y a la presencia de varios anticuerpos en el mercado, la expresión de este por inmunofenotipo puede ser difícil de establecer. Por lo tanto, la expresión de MPO en blastos leucémicos deben ser comparado con el control interno positivo y negativo. En raras ocasiones, el marcador MPO puede estar expresado en LLA-B. Estos casos son identificados y tratados como una LLA ya que, en contraste, la MPAL tiene además de MPO, otros marcadores de línea mieloide definiendo dos inmunofenotipos o dos poblaciones de blastos (8).

- **Marcadores en AUL:** Estos casos expresan CD34, HLA-DR o CD38, para así excluir la posibilidad de neoplasias no hematológicas. Por definición, va a carecer de antígenos de línea mieloide o linfóide (19). Inmunofenotípicamente, hay dificultades en la clasificación de LMA con mínima diferenciación (LMA-M0) y la AUL. La AUL no debe expresar marcadores de célula B, T o mieloide y no debe cumplir con los criterios para LLA (B o T) o LMA con mínima diferenciación o MPAL. AUL puede ser positivo para CD34, CD38, HLA-DR y/o TdT: algunos casos pueden no ser adecuadamente clasificados por la insuficiente cantidad de datos inmunofenotípicos o expresión discordante de marcadores, que no permite la clasificación definitiva (8).
- **Otras consideraciones:** MPAL con una sola población de blastos al diagnóstico pueden cambiar en el tiempo, o pueden recaer, en una leucemia con dos poblaciones de blastos y viceversa. Este fenómeno se denomina como cambio de línea y puede ocurrir en terapia, persistencia de la enfermedad y recaída (2,35).

En la investigación dirigida por Pomerantz y colaboradores, analizaron a 21 pacientes diagnosticados como MPAL según los criterios de EGIL y la OMS entre los años 2005 y 2015. Se encontró 13 casos de MPAL definido por la clasificación EGIL que la OMS los subclasificó ya sea el LLA o LMA, en su mayoría LMA. De igual manera

hubo 2 casos de LLA reclasificados como MPAL por la OMS. Por lo tanto, se identificaron 19 casos de MPAL por clasificación EGIL y al reclasificarlos con los criterios de la OMS se identificaron 8 casos de MPAL. Como se mencionó, los criterios de la OMS son más restrictivos y excluyentes que los de la clasificación EGIL, por lo que, usando esta última, más pacientes son clasificados como MPAL que LLA o LMA. En términos de la sobrevida estudiada en esta investigación, las peores sobrevidas fueron observadas en pacientes con MPAL en comparación con la obtenidas para pacientes con LLA y LMA. Los cambios significativos se encontraron en la sobrevida de pacientes que fueron sometidos a un protocolo de quimioterapia contra enfermedad linfoblástica (36).

El reporte de la frecuencia, las características clínicas y la sobrevida de los pacientes con ALAL son dependientes del sistema de clasificación usado al momento del reporte. La clasificación de la OMS del 2008-2016 es menos inclusiva que el precedente sistema de EGIL (36).

CAPÍTULO 4. PROTOCOLOS TERAPEUTICOS EN EL TRATAMIENTO DE LA LEUCEMIA AGUDA DE LINAJE AMBIGUO.

MPAL es considerada una enfermedad de alto riesgo con pobre sobrevida. En análisis multivariados de datos SEER, este subtipo de leucemia de ALAL está asociado a peor pronóstico con respecto a la LLA, LMA y a otras leucemias (37). Factores de mal pronóstico que ha sido reconocidos son la edad adulta, alto conteo leucocitario al diagnóstico, citogenética adversa (presencia del rearrreglo MLL), creatinina y ácido úrico basales incrementados, infiltración extramedular al diagnóstico y la respuesta a la terapia de inducción (38). La mejor sobrevida de los pacientes se observa cuando el diagnóstico se da en pacientes menores de 15 años (5,28,39). Aplicando la definición de MPAL dada por la OMS y basado en los estudios retrospectivos, la tasa de remisión completa de la enfermedad es de 61.5-85.2% y la mediana de sobrevida global es de 14.8-18 meses. Por lo tanto, basado solo en el pronóstico, es razonable que el acercamiento terapéutico en pacientes adultos con MPAL debe ser similar a la de los pacientes con leucemia de alto riesgo: alcanzar la remisión completa y proseguir a un trasplante alogénico de células madre cuando sea posible (17,28). El pobre pronóstico de MPAL comparado a los otros tipos de leucemia se debe a que (17):

1. Las células madre leucémicas de fenotipo mixto son quimioresistentes por su poca replicación.
2. Los blastos pueden adaptarse a la terapia al cambiar el fenotipo.
3. Algunos MPAL expresan altos niveles de proteínas de resistencia a multidroga.

En términos del inmunofenotipo, en casos pediátricos no hay diferencia en la sobrevida de los casos mieloide/linfoide B y los casos mieloide/linfoide T. Sin embargo, en población adulta, se ha observado menor remisión completa y sobrevida en los casos mieloide/linfoide T comparado con la MPAL B/Mieloide. La expresión del CD19 y del CD14 se ha asociado a una sobrevida no favorable (3,5). Es importante identificar los casos de MPAL y no mal diagnosticarse como LLA o LMA por un uso inadecuado de los marcadores inmunofenotípicos. En realidad, algunos casos refractarios de leucemia aguda con pobre respuesta a la terapia pueden representar casos de MPAL no detectados o asignados incorrectamente a otro linaje (8).

El manejo clínico de la Leucemia Aguda de Linaje Ambiguo es problemático, no hay protocolos de tratamiento establecidos y se han reportado diferentes acercamientos terapéuticos (17). Inicialmente se inicia con corticosteroides, seguidos de un régimen enfocado para Leucemia Linfoblástica. En ausencia de respuesta a los corticosteroides, hay un cambio a protocolo dirigido contra leucemia mieloblástica con agentes alquilantes (8).

En la era anterior al desarrollo de los inhibidores de tirosina quinasa (TKI), la presencia de anormalidades genéticas como el cromosoma Philadelphia se relacionaba con peor pronóstico comparado a aquellos que no poseían dicha traslocación, principalmente en adultos, no obstante, con el advenimiento de los TKI, este mal pronóstico parece no persistir (2,3,5). La sobrevida de los pacientes con ALAL no-AUL ha incrementado. La razón de este incremento es probablemente debido a que muchos de ellos tienen MPAL con t(9;22) (q34.1;q11.2) y su tratamiento consta de quimioterapia TKI contra BCR-ABL1 (17,28). En los estudios realizados con pacientes con ALAL portadores de la traslocación del cromosoma Philadelphia muestran que la administración de mesilato de imatinib, nilotinib, dasatinib o ponatinib con quimioterapia ha incrementado la sobrevida y la frecuencia de remisión completa a niveles vistos en pacientes con LLA con t(9;22) (39). Adicionalmente, la sobrevida de estos pacientes ha aumentado por la elegibilidad de estos al trasplante de médula ósea como consolidación del tratamiento. Está postulado que la ALAL acarrea blastos que son derivados de la célula madre hematopoyética primitiva de larga vida, las cuales son capaces de presentar infidelidad de línea, por lo que la quimioterapia sola va a ser insuficiente para erradicar la enfermedad. Por tanto, la opción del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos es recomendado en la mayoría de los estudios (9,17,28). La sobrevida de este tipo de ALAL es tal, que los estudios sugieren que pronóstico de MPAL con t(9;22) es superior a los demás subtipos de MPAL (39).

En pacientes con rearrreglos en MLL, el panorama es lúgubre. Estudios reportan casos de pacientes de menor edad (inclusive infantes y niños) cuyo rearrreglo en MLL representa la explicación del pobre pronóstico de la MPAL infantil. Adicionalmente, pacientes con este rearrreglo del cromosoma 11 tienen peor sobrevida en contraste con los pacientes con cariotipo normal o traslocación (9;22). Similar a lo observado en LLA de infantes, la presencia de esta anormalidad citogenética está asociada a resistencia de la quimioterapia y peores cifras de sobrevida (39).

El monitoreo de la Enfermedad Mínima Residual (EMR) es de esencial importancia y tiene efectos significativos en las decisiones terapéuticas. Datos disponibles sugieren que un resultado negativo de MRD después de la terapia inicial en MPAL resulta en buena sobrevida libre de evento y de sobrevida global (36). La utilidad de este monitoreo es evidente en casos de MPAL con traslocación *BCR-ABL1*. El monitoreo molecular no está disponible en las formas de MPAL, por tanto, la citometría de flujo es una herramienta de laboratorio indispensable para el monitoreo de la población con fenotipo aberrante y así ser predictor de sobrevida (21).

La rareza relativa de ALAL, la inconsistencia en los criterios diagnósticos y la falta de datos prospectivos, han contribuido a la ausencia de guías basadas en evidencia para el manejo de estos pacientes. Las implicaciones clínicas de las revisiones en la definición de MPAL incluye el subregistro de los casos mal diagnosticados como LLA o LMA por la insuficiencia de paneles inmunofenotípicos comprensivos, lo que podría repercutir directamente en tratamientos subóptimos en ciertos individuos con MPAL no reconocido. Aparte del reto diagnóstico, pacientes que son diagnosticados con MPAL tienen un pronóstico lúgubre. Esto puede deberse a citogenética adversa, el uso de quimioterapia en altas dosis, alta expresión de glicoproteína P u otros factores inherentes al paciente como las comorbilidades o demográficos (5).

Con la evidencia basada en estudios, se ha notado que el régimen de inducción para la LLA provee la mejor opción de alcanzar la remisión, con 75-83% de remisión, mientras que el régimen mieloide brinda remisión entre un 28 y 57%. El régimen de inducción consiste en quimioterapia hyperCVAD (ciclofosfamida hiperfraccionada, vincristina, doxorubicina y dexametasona alternada con altas dosis de citarabina y metotrexate) (40). El uso de régimen combinado (LLA y LMA) confiere la misma efectividad que un régimen de LLA (71% comparado con un 64% respectivamente) (5,17,28) (Figura 6). En un estudio polaco, Zajac y colaboradores encontraron que la sobrevida libre de evento (SLE) fue mejor en pacientes con MPAL T/mieloide, esto relacionado a un abordaje terapéutico agresivo como el de LLA-T y a una estratificación del paciente en alto riesgo, que consecuentemente, su régimen quimioterapéutico es mucho más agresivo (20).

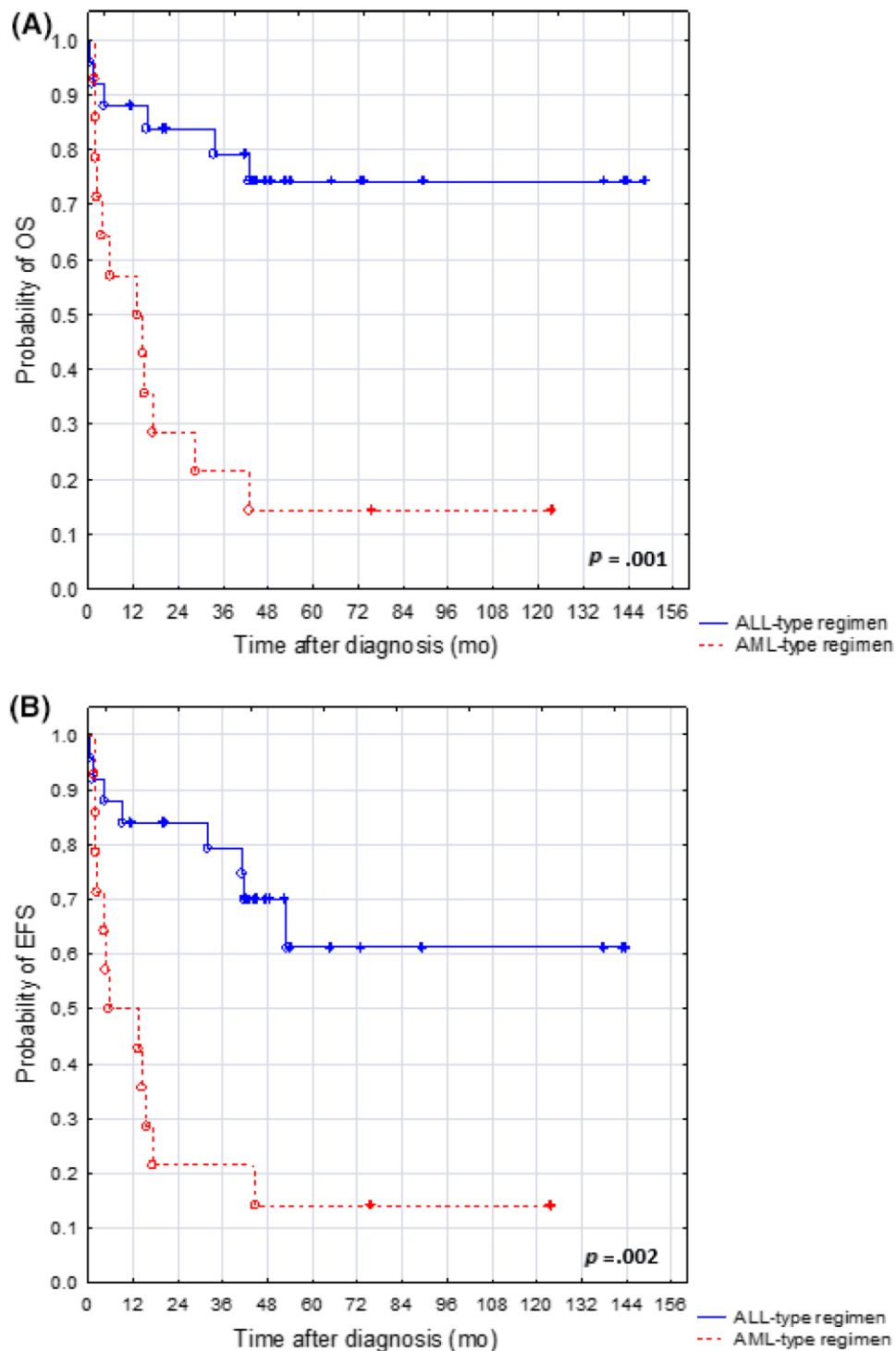


Figura 6: Sobrevida Global (A) y Sobrevida Libre de Evento (B) a 5 años de pacientes con MPAL tratados con régimen de inducción dirigido a LLA comparado con LMA. Tomado de Zająć-Spychała y colaboradores, 2020.

El reto más importante en la MPAL es el proveer la terapia óptima para estos pacientes. Datos demuestran que la terapia de inducción en el tratamiento de LLA con agentes que tienen actividad contra leucemias linfoides y mieloides parece ser más

efectiva que la quimioterapia dirigida contra LMA en el alcance de la remisión completa. Estos datos son respaldados en la mayor tasa de remisión completa, mayor porcentaje de supervivencia global y supervivencia libre de evento, comparado con los pacientes que recibieron protocolos de inducción para LMA. Por lo tanto, la inducción con quimioterapia utilizada en LLA provee mayores tasas de remisión y menor muerte (20).

Otro aspecto de importancia es la terapia post inducción, en la cual, el trasplante de progenitores hematológicos está asociado con mayor supervivencia, especialmente en pacientes con anormalidades genéticas como el BCR-ABL1. El efecto beneficioso del trasplante en MPAL se visualiza independientemente del régimen de inducción utilizado, linfóide o mieloide (Figura 7 y 8) (20).

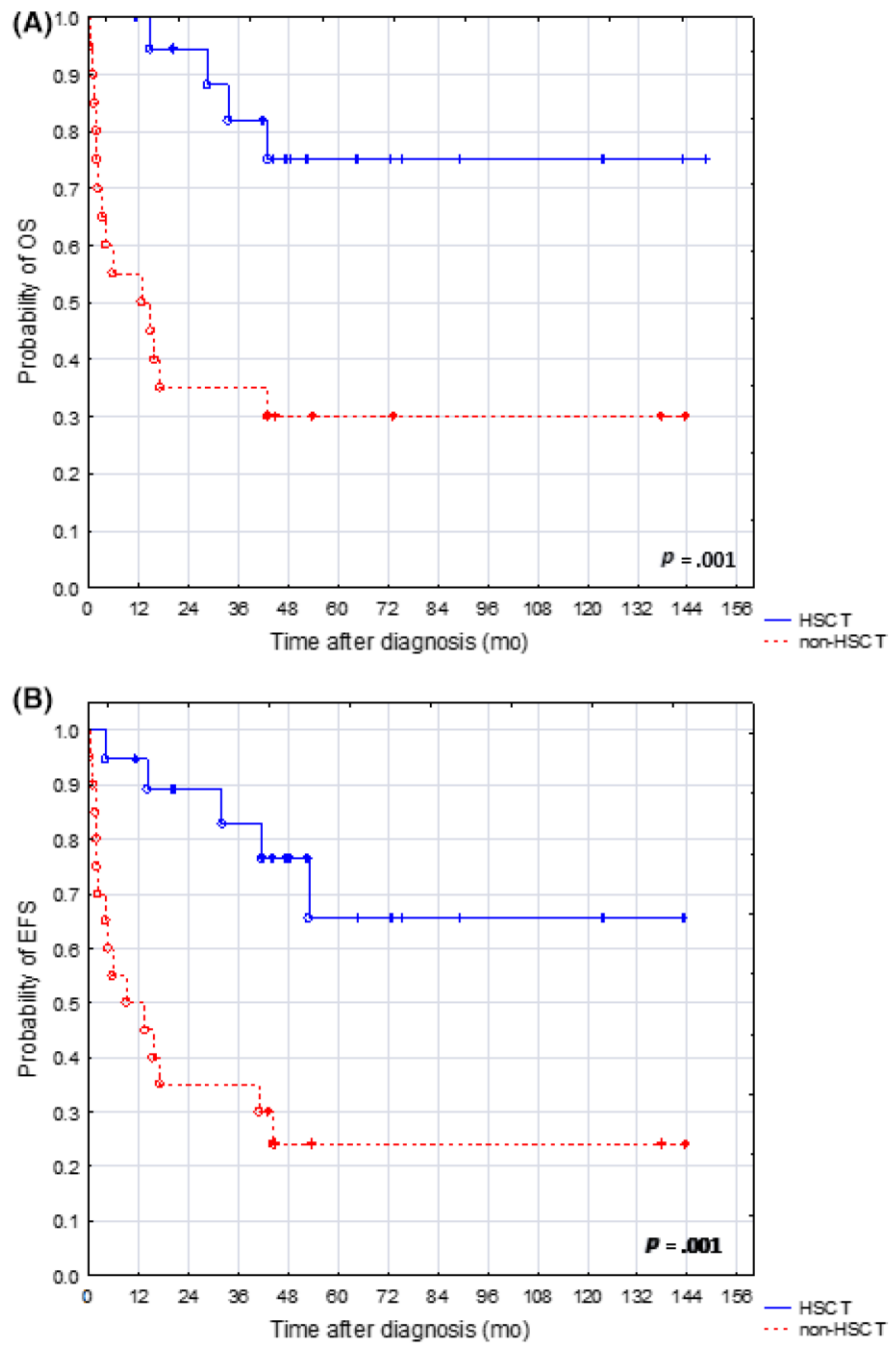


Figura 7: Sobrevida Global (A) y Sobrevida Libre de Evento (B) a 5 años de pacientes con MPAL que fueron sometidos o no a Trasplante de Progenitores Hematológicos. Tomado de Zająć-Spychała y colaboradores, 2020.

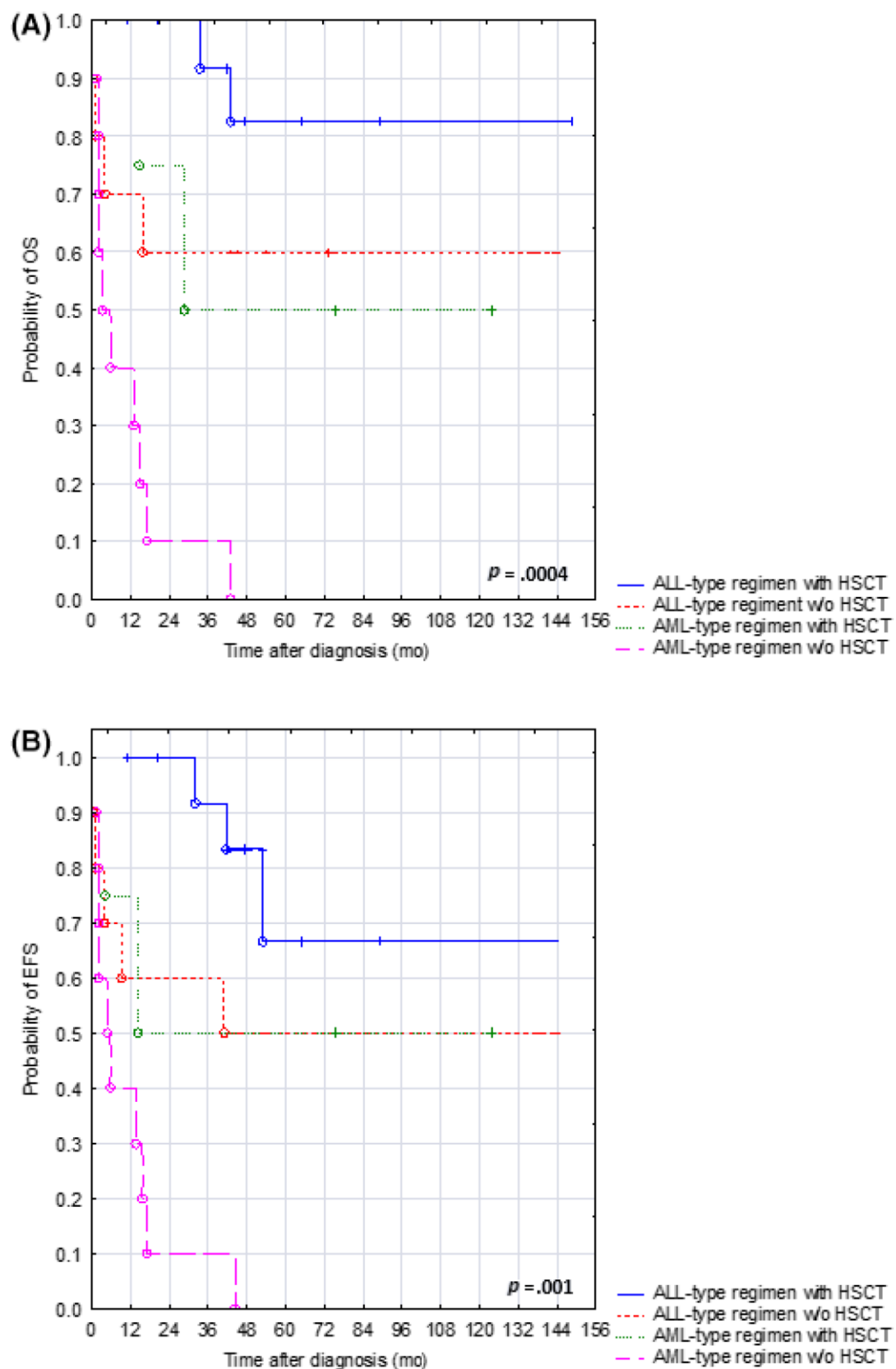


Figura 8: Sobrevida Global (A) y Sobrevida Libre de Evento (B) a 5 años de pacientes con MPAL que fueron sometidos o no a Trasplante de Progenitores Hematológicos estratificando en grupos de inducción de LLA y LMA. Tomado de Zająć-Spychała y colaboradores, 2020.

El manejo clínico de MPAL sin rearrreglos en BCR-ABL1 o MLL, está basado en el éxito de la terapia similar a LLA y alguna experiencia con el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. Estudios recomiendan que adultos menores de 40 años se sometan a regímenes de inducción específicos inspirados en población pediátrica, mientras que, para adultos mayores de 40 años, la combinación de 5 drogas: ciclofosfamida, daunorubicina, vincristina, prednisona y L-asparaginasa, sea utilizada. No obstante, el trasplante de progenitores hematológicos debe ser ofrecido a todos los pacientes con esta enfermedad. Para el tratamiento de MPAL con rearrreglos en BCR-ABL1, se sugieren las recomendaciones anteriormente citadas con la adición de los inhibidores de tirosina quinasa. La inclusión de estos inhibidores en la terapia ha aumentado la sobrevida para esta enfermedad, siendo similar a la sobrevida de pacientes con LLA-B con cromosoma Philadelphia (Figura 9). Por su parte, el subtipo de MPAL con rearrreglos en MLL se ha caracterizado por su falta de respuesta al tratamiento. Recientemente, la relación de este subtipo con la actividad aberrante de la metiltransferasa de histonas DOT1, ha permitido el estudio de inhibidores de DOT1L y de otros agentes que tienen como punto de acción la activación de los genes HOX (5).

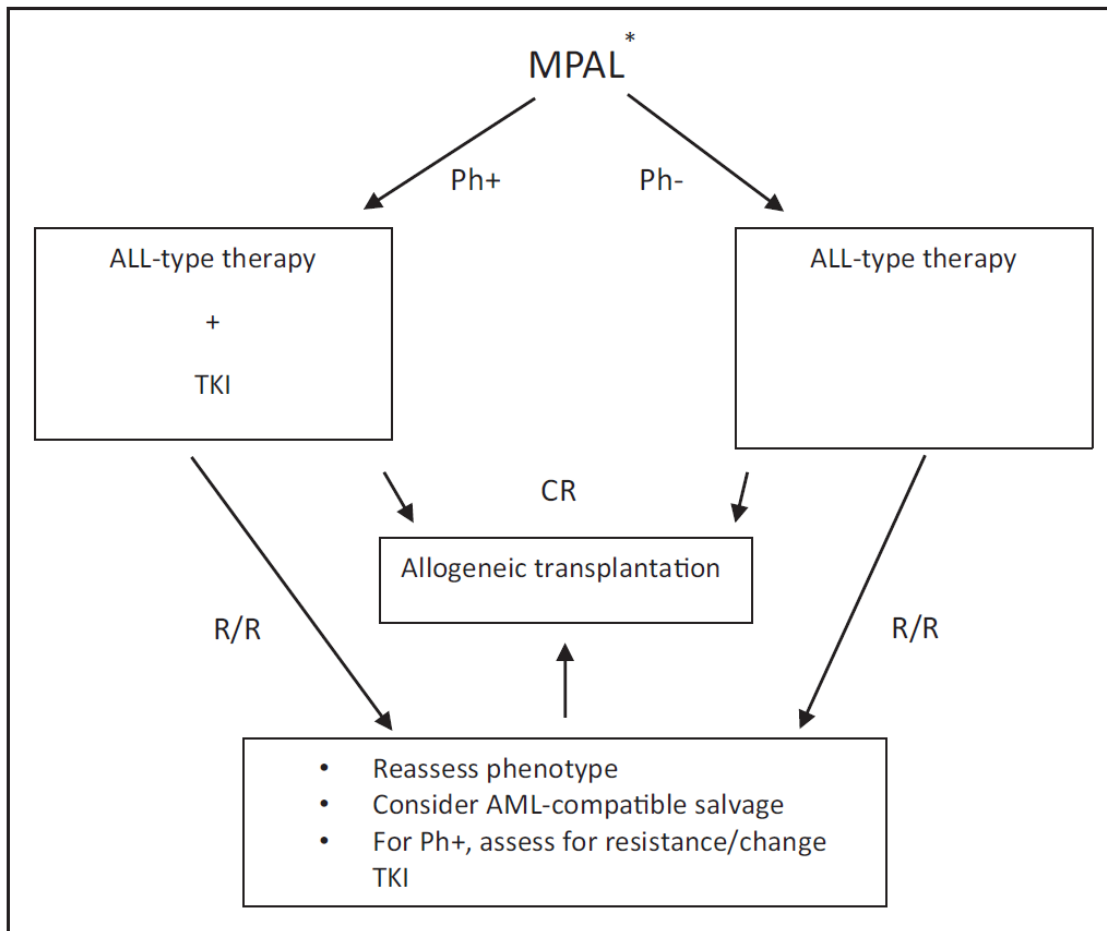


Figura 9: Algoritmo de tratamiento propuesto para la leucemia aguda de fenotipo mixto. Nótese que el algoritmo propuesto está dirigido a la terapia de consolidación del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. MPAL: Ph+/-: Cromosoma Philadelphia positivo o negativo, CR: remisión completa, R/R: Recaída/Refractoriedad, TKI: inhibidores de la tirosina quinasa. Tomado de Wolach & Stone, 2020.

Los estudios de patofisiología molecular han identificado mutaciones que deben ser consideradas antes de iniciar el tratamiento, como IDH1/2, BRAF, NOTCH1 y FLT3 que pueden representar objetivos terapéuticos con agentes disponibles o en estudios clínicos como lo son los TKI y los inhibidores de NOTCH1. Drogas recientemente avaladas por el FDA como el midostaurin (inhibidor de FLT3) y enasidenib (inhibidor de IDH2) han sido clínicamente efectivos en pacientes con FLT3 e IDH2 mutado, respectivamente. Pacientes pediátricos con ZNFr384 mutado y sobreexpresión de FLT3 también han respondido bien al midostaurin (17). Las terapias que promueven el compromiso de células T al CD19 de células malignas han incrementado su aplicación en leucemias refractarias, en donde se incluye el blinatumomab (anti CD3/CD19) y las células CAR-T (28).

Los estudios retrospectivos en esta enfermedad son concluyentes en que el protocolo de régimen quimioterapéutico contra leucemia linfoblástica tiene mejores resultados que los casos con protocolos contra leucemia mieloblástica, con sobrevidas libres de evento de aproximadamente 80% en protocolos contra LLA. La combinación de protocolos contra LMA y LLA no genera mayor ventaja en la sobrevida y genera más mortalidad asociada a tratamiento, por la mayor toxicidad (10).

Cuando la terapia se basa en la expresión del CD19, la diferencia en la sobrevida cuando se usa el protocolo linfoblástico es aún más marcada a favor de esta, no solo por el uso de la terapia hyper-CVAD, sino por el uso de terapia específica como blinatumomab (anticuerpo específico que une CD19 y CD3, facilitando la interacción célula tumoral y linfocito T) o CAR-T – CD19 (10). Uno de los estudios más relevantes sobre las estrategias de tratamiento en la ALAL en niños, estudió retrospectivamente a una cohorte de 233 niños diagnosticados con ALAL desde el periodo 2002 al 2015 en 18 países. Este estudio planteó un algoritmo terapéutico para esta enfermedad (Figura 10), basándose en las siguientes conclusiones de dicho estudio:

- Las recomendaciones de tratamiento estaban basadas en la comparación de la ALAL a la LLA o LMA. En el desarrollo granulocítico, la presencia de MPO ha servido como marcador inmunofenotípico, pero este ha sido encontrado en línea linfoide en el estudio del ARN mensajero. No hay evidencia que la expresión de MPO está directamente conectada a la mejor respuesta de la terapia contra la LMA, de hecho, la buena respuesta a la terapia contra LLA en pacientes con leucemia MPO+ está documentada. Dada la variabilidad de la expresión de la MPO, no es sorprendente el debate sobre el punto de corte para diagnosticar la positividad (7).
- La especulación que una ALAL involucra tratamiento para su parte linfoide (LLA) y mieloide (LMA) está equivocada, ya que se asume que se tratan como si fueran de linaje único. Además, ambos tratamientos están diseñados con su intensidad máxima tolerable, por lo tanto, el uso combinado puede comprometer la eficacia o incrementar el riesgo de toxicidad fuera de los límites aceptables (7).
- Debido a la sobrevida lúgubre de los pacientes con LMA CD19+, el uso de la terapia mieloide en MPAL CD19+ no es recomendado. En presencia de marcadores linfoides, la sobrevida utilizando la terapia contra LLA es excelente, por lo que debe ser considerada como primera línea de tratamiento. En casos

específicos, en donde el CD19 esté ausente se puede elegir por una terapia combinada o una terapia dirigida contra LMA (7).

- Se debe evaluar el trasplante de progenitores hematopoyéticos en leucemias de alta carga al final de la inducción (>1% de EMR). Aunque el tamaño de la cohorte no permitió observar un beneficio significativo, la recomendación es la realización del trasplante ante una terapia de inducción con pobre respuesta. En estos casos debe reevaluarse el fenotipo tumoral o realizar un cambio en el tratamiento (7).

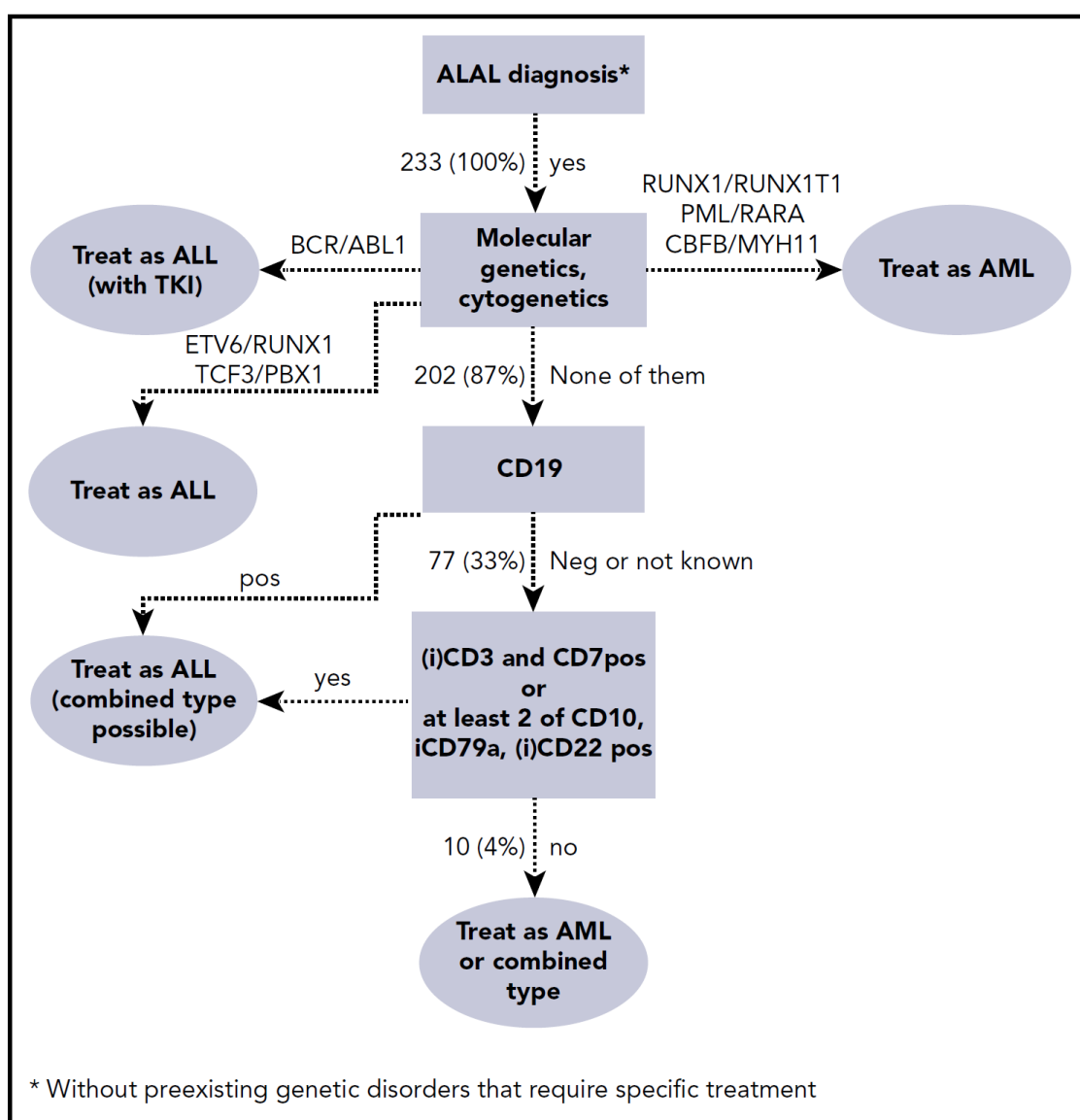


Figura 10: Algoritmo de tratamiento recomendado en pacientes con ALAL. Nótese que deben descartarse primero los casos de LMA y LLA molecular y posteriormente evaluar la positividad del CD19 para optar para un régimen de tratamiento para LLA o si es negativo para optar por uno de LMA o combinado. Tomado de Hrusak y colaboradores en el 2018.

CONCLUSIONES

Esta investigación consistió en una revisión bibliográfica sobre la situación actual de la Leucemia Aguda de Linaje Ambiguo. Esta revisión se basó en la actualización de tópicos en esta enfermedad así como en publicaciones de análisis de datos retrospectivos de esta. Los aspectos más importantes de esta neoplasia se revelan a continuación:

1. La Leucemia Aguda de Linaje Ambiguo es una malignidad hematológica heterogénea, que se caracteriza por la presencia de blastos que expresan fenotipo linfoide y mieloide en la presentación de la enfermedad. Puede presentarse de forma bilineal (dos poblaciones distintas) o bifenotípica (una población con dos linajes). Esta neoplasia representa del 1-3% de las leucemias agudas, con una incidencia estimada de 0,35 casos por millón de personas, con igual ocurrencia en niños y adultos, sin embargo, el subtipo de MPAL con rearrreglos en KMT3A está más presente en niños e infantes. El subtipo más común es MPAL B/Mieloide. La distribución etaria es bimodal, con mayoría de casos en menores de 19 años y mayores de 60 años, pero la mediana de diagnóstico es de 50 años, menor a lo observado a las demás leucemias agudas.
2. El origen clonal de esta enfermedad se hipotetiza que se produce en la célula madre hematopoyética multipotencial a través de procesos mutacionales relacionados a funciones celulares como modificación de cromatina, metilación del ADN, genes supresores de tumores, factores de transcripción y vías de señalización celular. A pesar de las similitudes de defectos genéticos con sus contrapartes de LMA y LLA, su perfil mutacional no puede ser catalogado como híbrido entre ellas, ya que las mutaciones que se encuentran en esta enfermedad están presentes en ambas leucemias. Las dos lesiones genéticas de mayor impacto en el diagnóstico, pronóstico y monitoreo es la t(9;22) o la t(v;11q23).
3. El diagnóstico de la ALAL es complejo e integral. La morfología generalmente se muestra con blastos de tipo linfoide, sin embargo, se puede observar poblaciones distintas de blastos, con morfología linfoide y mieloide por separado; aunque no es diagnóstico, puede ser sugestivo. Esta neoplasia no tiene traslocaciones ni mutaciones específicas, como sucede en LMA o LLA, por lo que estos hallazgos no son relevantes en la clasificación, sino en el pronóstico y subclasificación de esta. El diagnóstico de esta recae en el inmunofenotipo y los hallazgos inmunohistoquímicos. Se debe constatar que en la población blástica

hay marcadores específicos de línea mieloide, linfoide B o T, en cualquier combinación, para poder definirlo como un caso de MPAL. Cuando no se constatan marcadores de línea, con marcadores de inmadurez celular y de exclusión de otras neoplasias, se habla de una Leucemia Aguda Indiferenciada.

4. Esta enfermedad tiene un mal pronóstico. Con el régimen quimioterapéutico contra LLA se ha encontrado tasas de remisión completa, sobrevida libre de enfermedad y sobrevida global de hasta el 85%. Adicionalmente, el trasplante de progenitores hematopoyéticos y el uso de inhibidores de tirosina quinasa ha mejorado mucho la sobrevida de estos pacientes. Nuevos algoritmos basados en la expresión del CD19 se han planteado para tratar esta enfermedad: la presencia de este marcador atribuye la escogencia de un tratamiento contra LLA seguido de trasplante de médula ósea. No obstante, los investigadores revelan la necesidad de más estudios en el tratamiento de esta enfermedad.

La clasificación de esta enfermedad ha variado con el tiempo, desde 1991 que inició su clasificación, hasta el 2016, en la última versión de la OMS, por lo que, el repertorio de publicaciones sobre este tema es heterogéneo en su epidemiología y hallazgos, lo que ha repercutido en la definición de los esquemas terapéuticos del mismo. El tema principal sobre esta enfermedad se puede resumir en la frase “Las células son ambiguas, el mensaje no” en donde, aunque la clasificación de la enfermedad es complicada, muchas veces confusa, la acción terapéutica y el tratamiento debe realizarse contemplando todos los datos clínicos y tratarse agresivamente para poder obtener mejores resultados de sobrevida.

BIBLIOGRAFIA

1. Weir EG, Ali Ansari-Lari M, Batista DAS, Griffin CA, Fuller S, Smith BD, et al. Acute bilineal leukemia: A rare disease with poor outcome. *Leukemia*. 2007;21(11):2264–70.
2. Borowitz MJ, Béné MC, Harris NL, Porwit A, Matutes E, Arber DA. Acute Leukaemias of Ambiguous Lineage. In: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. International Agency for Research on Cancer; 2017. p. 592. (Medicine Series).
3. Weinberg OK, Arber DA. Mixed-phenotype acute leukemia: Historical overview and a new definition. *Leukemia*. 2010;24(11):1844–51.
4. Lee JH, Min YH, Chung CW, Kim BK, Yoon HJ, Jo DY, et al. Prognostic implications of the immunophenotype in biphenotypic acute leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2008;49(4):700–9.
5. Khan M, Siddiqi R, Naqvi K. An update on classification, genetics, and clinical approach to mixed phenotype acute leukemia (MPAL). *Ann Hematol*. 2018;97(6):945–53.
6. Weinberg OK, Hasserjian RP, Baraban E, Ok CY, Geyer JT, Philip JKSS, et al. Clinical, immunophenotypic, and genomic findings of acute undifferentiated leukemia and comparison to acute myeloid leukemia with minimal differentiation: a study from the bone marrow pathology group. *Mod Pathol* [Internet]. 2019;32(9):1373–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41379-019-0263-3>
7. Hrusak O, Haas V De, Stancikova J, Vakraňmanova B, Janotova I, Mejstrikova E, et al. International cooperative study identifies treatment strategy in childhood ambiguous lineage leukemia. *Blood*. 2018;132(3):264–76.
8. Porwit A, Béné MC. Acute Leukemias of Ambiguous Origin. *Am J Clin Pathol*. 2015;144(3):361–76.
9. Lao ZT, Ding LW, An O, Hattori N, Sun QY, Tan KT, et al. Mutational and transcriptomic profiling of acute leukemia of ambiguous lineage reveals obscure but clinically important lineage bias. *Haematologica*. 2019;104(5):e200–3.
10. Rohrlich PS. The cells are ambiguous, not the message. *Blood*. 2018;132(3):239–

40.

11. Van Den Ancker W, Terwijn M, Westers TM, Merle PA, Van Beckhoven E, Dräger AM, et al. Acute leukemias of ambiguous lineage: Diagnostic consequences of the WHO2008 classification. Vol. 24, *Leukemia*. 2010. p. 1392–6.
12. Juliusson G, Hough R. *Leukemia*. *Prog Tumor Res*. 2016;43:87–100.
13. Sabath DE. *Leukemia*. *Brenner's Encycl Genet Second Ed*. 2013;2:226–7.
14. Rose-Inman H, Kuehl D. Acute leukemia. *Emerg Med Clin North Am* [Internet]. 2014;32(3):579–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.emc.2014.04.004>
15. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391–405.
16. Patel SS, Weinberg OK. Diagnostic workup of acute leukemias of ambiguous lineage. *Am J Hematol*. 2020;95(6):718–22.
17. Yong WL, Yusof N, Ithnin A, Shuib S, Tumian R, Yousuf R, et al. Mixed phenotype acute leukaemia with t(9,22), BCR-ABL1: A case report. *Malays J Pathol*. 2020;42(3):469–76.
18. Wolach O, Stone RM. How I Treat How I treat mixed-phenotype acute leukemia. 2015;125(16):2477–85.
19. Steensma DP. Oddballs: Acute Leukemias of Mixed Phenotype and Ambiguous Origin [Internet]. Vol. 25, *Hematology/Oncology Clinics of North America*. Elsevier Inc; 2011. p. 1235–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hoc.2011.09.014>
20. Zająć-Spychała O, Irga-Jaworska N, Drożyńska E, Muszyńska-Roslan K, Krawczuk-Rybak M, Zawitkowska J, et al. Mixed phenotype acute leukemia: Biological profile, clinical characteristic and treatment outcomes: Report of the population-based study. *Eur J Haematol*. 2020;105(1):85–93.
21. Andrews C, Tierens A, Minden M. The genomic and biological complexity of mixed phenotype acute leukemia. *Crit Rev Clin Lab Sci* [Internet]. 2021;58(3):153–66. Available from:

<https://doi.org/10.1080/10408363.2020.1829537>

22. Orgel E, Alexander TB, Wood BL, Kahwash SB, Devidas M, Dai Y, et al. Mixed-phenotype acute leukemia: A cohort and consensus research strategy from the Children's Oncology Group Acute Leukemia of Ambiguous Lineage Task Force. *Cancer*. 2020;126(3):593–601.
23. Quesada AE, Hu Z, Routbort MJ, Patel KP, Luthra R, Loghavi S, et al. Mixed phenotype acute leukemia contains heterogeneous genetic mutations by next-generation sequencing. *Oncotarget*. 2018;9(9):8441–9.
24. Singh N, Kumar D, Agrawal N, Panaych A. Diagnostic Dilemma in Ambiguous Lineage Acute Leukemia: A Case Report. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2017;17–9.
25. Nakada D. Transcriptional and Microenvironmental Regulation of Lineage Ambiguity in Leukemia. 2017;7(November):1–7.
26. Noronha EP, Marques LVC, Andrade FG, Sardou-Cezar I, Santos-Bueno FV Dos, Da Paz Zampier C, et al. T-lymphoid/myeloid mixed phenotype acute leukemia and early T-cell precursor lymphoblastic leukemia similarities with NOTCH1 mutation as a good prognostic factor. *Cancer Manag Res*. 2019;11:3933–43.
27. Alexander TB, Gu Z, Iacobucci I, Dickerson K, Choi JK, Xu B, et al. The genetic basis and cell of origin of mixed phenotype acute leukaemia [Internet]. Vol. 562, *Nature*. Springer US; 2018. 373–406 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0436-0>
28. Wolach O, Stone RM. Optimal therapeutic strategies for mixed phenotype acute leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2020;27(2):95–102.
29. Porwit A, Béné MC. Multiparameter flow cytometry applications in the diagnosis of mixed phenotype acute leukemia. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2019;96(3):183–94.
30. Manola KN. Cytogenetic abnormalities in acute leukaemia of ambiguous lineage: an overview. *Br J Haematol*. 2013;(July):24–39.
31. Kurzer JH, Weinberg OK. Acute Leukemias of Ambiguous Lineage: Clarification on Lineage Specificity. *Surg Pathol Clin* [Internet]. 2019;12(3):687–97. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.path.2019.03.008>

32. Eckstein OS, Wang L, Punia JN, Kornblau SM, Andreeff M, Wheeler DA, et al. Mixed-phenotype acute leukemia (MPAL) exhibits frequent mutations in DNMT3A and activated signaling genes. *Exp Hematol* [Internet]. 2016;44(8):740–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2016.05.003>
33. Toth LN, Green D, Peterson J, Deharvengt SJ, de Abreu FB, Loo EY. Variant allele frequencies do not correlate well with myeloblast counts in a clinically validated gene sequencing panel for routine acute myeloid leukemia workup. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2019;60(10):2415–22. Available from: <https://doi.org/10.1080/10428194.2019.1587757>
34. Yan L, Ping N, Zhu M, Sun A, Xue Y, Ruan C, et al. Clinical, immunophenotypic, cytogenetic, and molecular genetic features in 117 adult patients with mixed-phenotype acute leukemia defined by WHO-2008 classification. *Haematologica*. 2012;97(11):1708–12.
35. Koulmane Laxminarayana SL, Madireddy N, Manohar C, Udupa K. Multiparametric Flow Cytometry in Mixed Phenotype Acute Leukemia. *Indian J Hematol Blood Transfus* [Internet]. 2019;35(3):451–8. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12288-019-01101-0>
36. Pomerantz A, Rodriguez-Rodriguez S, Demichelis-Gomez R, Barrera-Lumbreras G, Barrales-Benitez O, Lopez-Karpovitch X, et al. Mixed-phenotype acute leukemia: Suboptimal treatment when the 2008/2016 WHO classification is used. *Blood Res*. 2016;51(4):233–41.
37. Nix KM, Harrison KJ, Shivakumar SP, Shawwa AA, Conrad DM. Case Report Mixed phenotype acute leukemia , B / myeloid , NOS with near-tetraploidy : a case report. 2017;10(11):11206–10.
38. Heesch S, Neumann M, Schwartz S, Bartram I, Schlee C, Burmeister T, et al. Acute leukemias of ambiguous lineage in adults: Molecular and clinical characterization. *Ann Hematol*. 2013;92(6):747–58.
39. Qasrawi A, Ramlal R, Munker R, Hildebrandt GC. Prognostic impact of Philadelphia chromosome in mixed phenotype acute leukemia (MPAL): A cancer registry analysis on real-world outcome. *Am J Hematol*. 2020;95(9):1015–21.
40. Duong VH, Begna KH, Kashanian S, Sweet K, Shafer DA, Singh ZN, et al.

Favorable outcomes of acute leukemias of ambiguous lineage treated with hyperCVAD : a multi-center retrospective study. 2020;

41. Munker R, Brazauskas R, Wang HL, de Lima M, Khoury HJ, Gale RP, et al. Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Patients with Mixed Phenotype Acute Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2016;22(6):1024–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2016.02.013>