



SOCIEDAD MEXICANA DE ONCOLOGÍA, A.C.

# GACETA MEXICANA DE ONCOLOGÍA

www.elsevier.es



## ARTÍCULO ORIGINAL

# Clasificación inmunológica de las leucemias agudas linfoblásticas del Hospital Infantil de México Federico Gómez, de acuerdo al EGIL (*European Group for the Immunological Classification of Leukemia*)

Elisa Dorantes-Acosta<sup>a,\*</sup>, Aurora Medina-Sanson<sup>a</sup>, Karla Dávila-Ornelas<sup>b</sup> y Briceida López-Martínez<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Hemato-Oncología, Hospital Infantil de México Federico Gómez, México D.F., México

<sup>b</sup> Pregrado de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Ciudad Juárez, Chi., México

<sup>c</sup> Subdirección de Servicios Auxiliares y Diagnósticos, Hospital Infantil de México Federico Gómez, México D.F., México

### PALABRAS CLAVE

Leucemia aguda linfoblástica; Leucemia bifenotípica; Leucemia infantil; México.

### Resumen

**Introducción:** La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el cáncer más frecuente en la niñez. El inmunofenotipo de las células leucémicas es uno de los factores que establecen riesgo de recaída. La elección del panel de anticuerpos para diagnóstico inmunológico de LLA, puede variar entre instituciones. No todos los casos de LLA expresan antígenos para un solo linaje, ya que se han reportado numerosos casos donde las células expresan características de más de un linaje hematopoyético. De acuerdo a diferentes criterios encontramos definiciones de LLA con expresión aberrante de antígenos, infidelidad de linaje, de linaje mixto y leucemias bifenotípicas (BAL). El Grupo Europeo de Clasificación Inmunológica de Leucemias (EGIL), creó un sistema basado en puntos para distinguir casos de BAL, de aquellos con expresión aberrante de otro linaje. Está basado en el número y grado de especificidad de marcadores (linfoides y mieloides), expresados en las células leucémicas.

**Métodos:** Se realizó un estudio retrospectivo y transversal, en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, se revisaron los expedientes de 113 pacientes con diagnóstico de LLA, en un periodo del 2008 al 2010. Se utilizó la clasificación del grupo del EGIL, para determinar si las leucemias tenían criterios de BAL.

**Resultados:** De los casos estudiados, se identificaron 29 pacientes asignados como riesgo habitual y 84 de alto riesgo. En 32 casos se pudo constatar por criterios del EGIL que se trataba de bifenotipia, esto correspondió al 28.3% del total de la muestra. El grupo donde se presentó el

\* Autor para correspondencia: Doctor Márquez N° 162, Colonia Doctores, C.P. 06720, México D.F., México. Teléfono: (55) 52289917, ext. 2124. Correo electrónico: elisadorantes@hotmail.com (Elisa Dorantes-Acosta).

**KEYWORDS**

Acute lymphoblastic leukemia; Biphenotypic leukemia; Childhood leukemia; Mexico.

mayor número de BAL, fue el grupo de alto riesgo de recaída (25 pacientes con bifenotipia en LLA alto riesgo contra 7 en el grupo de riesgo habitual).

*Conclusiones:* Este trabajo es un intento para clasificar a las leucemias de manera sistemática, sin embargo queda pendiente conocer si este diagnóstico impacta en el resultado clínico.

### Immunological classification of acute lymphoblastic leukemia in the *Hospital Infantil de México*, according to EGIL (European Group for the Immunological Classification of Leukemia)

**Abstract**

*Introduction:* Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common cancer in childhood. The immunophenotype of leukemic cells is one of the factors that set risk of relapse. The choice of antibodies for diagnostic panel immune ALL may vary between institutions. Not all cases of ALL express antigens for a single lineage as many cases have been reported where cells express the characteristics of more than one hematopoietic lineage. According to different criteria there are definitions of ALL with aberrant expression of antigens, lineage infidelity, mixed lineage, and biphenotypic leukemias (BAL). The European Group of Immunological Classification of Leukemia (EGIL) created a points-based system to distinguish BAL of those with aberrant expression. It is based on the number and degree of specificity markers (lymphoid and myeloid cells) expressed in leukemic cells.

*Methods:* We conducted a retrospective study at *Hospital Infantil de México*; we reviewed the clinical records of 113 patients diagnosed with ALL in a period from 2008 to 2010. EGIL group classification was used to determine if ALL had the criteria to BAL.

*Results:* One hundred thirteen clinical records were analyzed, 29 patients were identified as standard-risk and 84 as high risk patients. In 32 cases it was found BAL by EGIL criteria, this corresponded to 28.3% of the total sample. The group which had the highest number of BAL was the group of high risk of relapse (25 patients with high-risk against 7 patients with standard risk group).

*Conclusions:* This study is an attempt to classify systematically acute leukemia, however remains to know if this diagnosis impact on outcome.

**Introducción**

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el cáncer más frecuente en la niñez, representa el 23% de los diagnósticos de cáncer en menores de 15 años<sup>1</sup>, con una incidencia anual de 30 a 40 casos por millón<sup>2</sup>. En pediatría, la edad más frecuente de presentación es dentro del grupo de edad de 3 a 5 años<sup>3,4</sup>. Aproximadamente 2,400 niños y adolescentes menores de 20 años son diagnosticados con LLA cada año en los Estados Unidos, existiendo un aumento gradual de su incidencia en los últimos 25 años.

En América Latina la incidencia de la LLA es mayor a la reportada en otras partes del mundo, con tasas de hasta 120 pacientes por millón por año<sup>5,6</sup>, por lo que existen argumentos que hacen sospechar que los pacientes con LLA en esta región, podrían tener algunas variaciones biológicas con respecto a otros lugares del mundo.

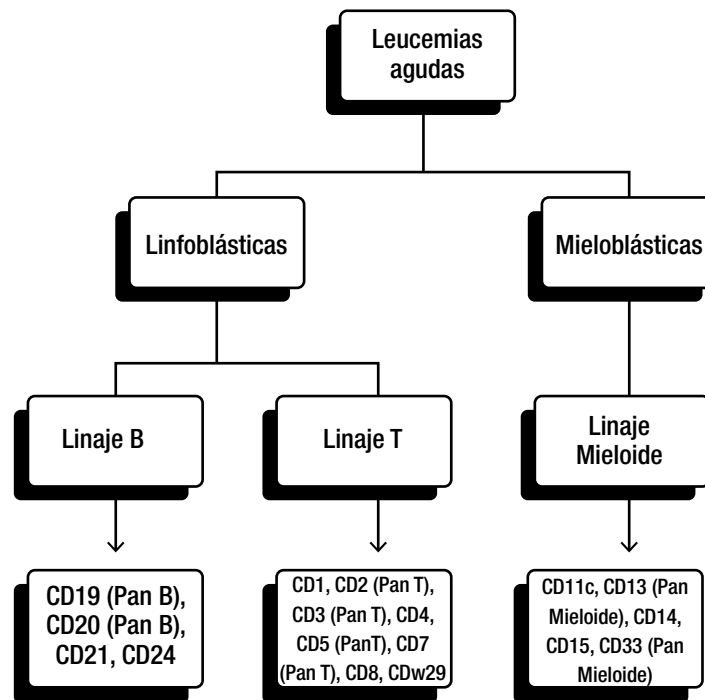
La sospecha diagnóstica de LLA se basa en la identificación de síndromes sugestivos como síndrome infiltrativo, hemorrágico, anémico y síndrome febril, así como la determinación de pruebas hematológicas, metabólicas y radiológicas. El estándar de oro para el diagnóstico es el aspirado de médula ósea, donde se deben realizar estudios de morfología, inmunocitoquímica, fenotipo y de biología molecular<sup>7</sup>.

La diferenciación morfológica de los blastos en LLA se clasifica en L1, L2 y L3 de acuerdo al Grupo Cooperativo Franco-Americano-Británico (FAB, por sus siglas en Inglés)<sup>8</sup>.

La presencia de alteraciones citogenéticas se relaciona con el pronóstico de estos pacientes. Las modificaciones en el número de cromosomas (hiperdiploidía, trisomía), se asocian como factores favorables<sup>9</sup>. Por otro lado, existen translocaciones tales como t(12;21), t(9;22), t(4;11), t(1;19), entre otras, que tienen repercusión en la respuesta al tratamiento y por ende en el pronóstico<sup>10-12</sup>.

Como resultado de estudios epidemiológicos<sup>13</sup> se sabe que los pacientes con edad entre uno a 9 años y del sexo femenino, tienen una mejor supervivencia que los que se encuentran fuera de este rango de edad; mientras que el pronóstico es desfavorable para los pacientes con infiltración a sistema nervioso central (SNC) y leucocitosis (más de 50,000/mm<sup>3</sup>) al diagnóstico<sup>14</sup>.

Con base en todo lo anterior, además de la respuesta a la quimioterapia y el fenotipo de la leucemia se establece el riesgo que tiene el paciente de recaer, por lo que de acuerdo al centro hospitalario se clasifican a los pacientes en varios estratos. En algunos centros se estratifican en pacientes de riesgo bajo, habitual o estándar, riesgo alto y riesgo muy alto<sup>15</sup>.



**Figura 1** Panel diagnóstico para la clasificación de leucemias agudas. Panel frecuentemente utilizado de CD (*cluster of differentiation*, por sus siglas en Inglés). De esta manera se pueden detectar antígenos asociados con los linajes hematopoyéticos. La elección del panel diagnóstico puede variar entre instituciones y laboratorios.

Un punto relevante es la clasificación inmunológica de esta neoplasia; las leucemias agudas se clasifican, de acuerdo a la célula progenitora que las origina, en linfoblásticas y mieloblásticas, siendo mucho más frecuentes las linfoblásticas, y dentro de éstas últimas, el fenotipo de células precursoras B que representa el 80%-85% de los casos de LLA infantil. Los pacientes que presentan fenotipo de células T, han demostrado tener asociación con características clínicas de mal pronóstico<sup>16</sup>.

El fenotipo celular se define como aquellos marcadores de superficie e intracelulares, que precisan estirpes o linajes específicos<sup>17</sup>. Para determinar el fenotipo se utiliza la citometría de flujo, la cual se basa en la reacción de antígeno-anticuerpo. Los anticuerpos unidos a fluorocromos se unen a las proteínas de las células, que posteriormente pasan a través de un haz de luz y por medio de un sistema informático se puede calcular tanto el porcentaje de células que expresan esos antígenos, como la intensidad media de fluorescencia para el anticuerpo deseado. Todo ello ha llevado a colocar el fenotipo celular, no sólo con fines diagnósticos en las LLA, sino con fines pronósticos<sup>18</sup>.

El uso de anticuerpos monoclonales y el desarrollo de citómetros multiparamétricos han revolucionado la clasificación de muchas enfermedades, entre ellas las LLA. Gracias a estudios con citometría de flujo e inmunobiología, se ha observado que la transformación leucémica y la expansión clonal de las LLA, pueden ocurrir en diferentes etapas del proceso de maduración y diferenciación linfoide<sup>19,20</sup>.

Actualmente se han desarrollado más de 200 anticuerpos monoclonales (CD, *cluster of differentiation*, por sus siglas en Inglés), los cuales pueden detectar antígenos asociados con los linajes hematopoyéticos y están disponibles a la venta. Usando un panel de anticuerpos monoclonales asociados con la etapa de maduración de las células B, los investigadores han subclasificado las LLA de precursores B, en diversas etapas de acuerdo al grado de diferenciación y maduración. Sin embargo, ninguno se utiliza de manera aislada para establecer el diagnóstico<sup>21</sup>.

La elección del panel diagnóstico puede variar entre instituciones y laboratorios, en general, para la clasificación de leucemias linfoblásticas se incluyen anticuerpos para antígenos de células T (CD3, CD5 y/o CD7) y antígenos de células B (CD10, CD19, CD20 y CD22) (fig. 1).

Es importante señalar que no todos los casos de LLA expresan antígenos para un solo linaje, ya que se han reportado numerosos casos donde las células expresan características de más de un linaje hematopoyético<sup>22</sup>.

Las leucemias agudas con este tipo de expresión aberrante de antígenos, incluye casos de LLA que expresan antígenos mieloides asociados (My<sup>+</sup> ALL), y casos de leucemias mieloides agudas que expresan antígenos linfoides asociados (Ly<sup>+</sup>AML). En observaciones epidemiológicas, se ha demostrado que los pacientes con My<sup>+</sup>ALL y Ly<sup>+</sup>AML (infidelidad de linaje), no tienen diferencias significativas en el pronóstico de su enfermedad<sup>23</sup>.

En contraste, las leucemias agudas de linaje mixto (linaje ambiguo) representan a un grupo heterogéneo de leucemias

poco comunes y con escasa diferenciación, que poseen características de ambos linajes: linfoides y mieloides<sup>24</sup>.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a las leucemias de linaje mixto (MPAL) con base en la expresión de marcadores específicos, en el caso de las células T, por la expresión del CD3 citoplasmático, y en el caso de antígenos mieloides, por la expresión de mieloperoxidasa (MPO) y con antígenos de diferenciación monocitoide. En el caso de las leucemias de progenitores de células B, no define un antígeno único o específico, pero se recomienda que expresen fuertemente CD19 junto con otro antígeno de linaje de células B asociado, o en caso de una débil expresión de CD19, se debe tener la expresión de al menos 3 marcadores de linaje B. Adicionalmente, la OMS reconoce 2 categorías distintas de MPAL; aquellas que presentan la t(9;22)(q34;q11)/BCR-ABL1 y las MPAL con t(v;11q23)/MLL. Los otros casos de MPAL se identifican como NOS (no especificadas, por sus siglas en Inglés)<sup>25</sup>.

El grupo del Hospital St. Jude, propone definir a las leucemias agudas bifenotípicas (BAL) cuando las características de 2 linajes se presentan en una misma población de blastos, mientras que las leucemias bilineales son definidas como características de 2 linajes en distintas poblaciones de blastos de un mismo paciente<sup>23</sup>.

Otro sistema de clasificación fue fundado por el Grupo Europeo de Clasificación Inmunológica de Leucemias (EGIL), el cual ha creado un sistema de basado en puntajes que dan grados de especificidad a los linajes hematopoyéticos linfoides y mieloides, expresados en las células leucémicas<sup>26</sup>.

El grupo del EGIL propone un sistema de clasificación para distinguir los casos de BAL, de aquellos con expresión aberrante de otro linaje.

Este sistema está basado en el número y grado de especificidad de marcadores (linfoides y mieloides), expresados en las células leucémicas (tabla 1).

Los antígenos o marcadores seleccionados por el EGIL fueron para el linaje B-linfoide: el CD79a, que corresponde a una proteína transmembrana unida a inmunoglobulina, que forma parte del receptor para el reconocimiento de los linfocitos B, también seleccionaron el CD22.

Para el linaje T-linfoide, el CD3 que se une al receptor de células T y que se expresa en el citoplasma en el desarrollo temprano del linaje T.

Para el linaje mieloides la mieloperoxidasa (MPO) que puede ser detectada por inmunocitoquímica convencional o anticuerpos monoclonales, contra la cadena  $\alpha$  de MPO en forma de proenzima.

De acuerdo a este sistema de clasificación, un caso considerado como bifenotípica se presenta, cuando el valor del puntaje es mayor de 2 para el linaje mieloides y uno para el linaje linfoides<sup>26,27</sup>.

Por todo lo anterior, se puede observar que a clasificación de las leucemias con linajes ambiguos, las BAL y bilineales son heterogéneos, por ende la incidencia de estos fenómenos tiene amplias variaciones en la literatura internacional<sup>23,28</sup>.

El objetivo de este trabajo fue aplicar la clasificación inmunológica del EGIL reportada en un periodo de 3 años en el Hospital Infantil de México Federico Gómez. Consideramos que es de suma importancia para estratificar a los pacientes bajo un sistema internacional.

**Tabla 1** Sistema de clasificación del Grupo Europeo de Clasificación Inmunológica de Leucemias (EGIL)

| Escala EGIL |                          |            |                            |
|-------------|--------------------------|------------|----------------------------|
| Linajes     |                          |            |                            |
| Puntos      | Linfoide B               | Linfoide T | Mieloides                  |
| 2           | CD79a<br>CD22<br>IgM cyt | CD3        | MPO*                       |
| 1           | CD19<br>CD10             | CD2<br>CD5 | CD13<br>CD33               |
| 0.5         | TdT                      | TdT<br>CD7 | CD14, CD15<br>CD11b, CD11c |

\* MPO (mieloperoxidasa) demostrada por métodos citoquímicos o inmunológicos. Bifenotípica se presenta cuando el valor del puntaje es mayor de 2 para el linaje mieloides y uno para el linaje linfoides.

## Métodos

### Tipo de estudio

Se realizó un estudio retrospectivo y transversal, se revisaron los expedientes de 113 pacientes con diagnóstico de LLA en un periodo de enero del 2008 a diciembre del año 2010; se realizó estadística descriptiva. Se clasificó a los pacientes de acuerdo a los criterios del EGIL.

### Fenotipo por citometría de flujo

La citometría de flujo se realizó en muestras provenientes de aspirado de médula ósea. El procesamiento de las muestras se realizó de acuerdo a la rutina del protocolo de lisis de eritrocitos. Las células mononucleares se tiñeron con los siguientes fluorocromos y antígenos:

(CD34 PE/CD45 FITC), (CD20 PE/CD5 FITC), (CD19 PE/CD10 FITC), (CD7 PE/CD33 FITC), (CD2 PE/CD22 FITC), (glicoforina A PE/CD3 FITC), (CD58 PE/CD15 FITC), (CD117 PE/CD41a FITC), (CD14 PE/CD61 FITC), (CD13 PE/HLA-DR FITC), (CD79a PE), (MPO FITC), (anti-Kappa FITC), (anti-Lambda FITC), (Anti-TdT PE) Becton Dickinson Biosciences®, San Diego, CA.

Las muestras fueron adquiridas en un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences) y posteriormente, analizadas utilizando el programa CellQuest (Becton Dickinson Biosciences).

Los antígenos considerados como positivos se definieron como la expresión de un fluorocromo cuando  $\geq 30\%$  de la población celular expresó el marcador de fluorescencia arriba de este punto de corte, utilizando el correspondiente control de isotipo.

Se utilizó la clasificación del grupo del EGIL para determinar si las leucemias tenían criterios de bifenotípica.

## Resultados

De los 113 pacientes estudiados, se diagnosticaron 29 pacientes como de riesgo habitual y 84 como de alto riesgo

**Tabla 2** Características generales y clasificación inmunológica de los 113 pacientes del estudio

| Riesgo clínico asignado | Número de pacientes n (%) | Leucemia de progenitores B N (%) | Leucemia de células T N (%) | Bifenotipia de acuerdo a criterios del EGIL N (%) | Sin inmunofenotipo en el expediente clínico N (%) |
|-------------------------|---------------------------|----------------------------------|-----------------------------|---|---|
| Riesgo habitual         | 29 (25.6)                 | 19 (16.8)                        | 0 (0)                       | 7 (6.1)   | 3 (2.6)   |
| Alto riesgo             | 84 (74.3)                 | 39 (34.5)                        | 12 (10.6)                   | 25 (22.1)   | 8 (7)   |
| TOTAL*                  | 113 (100)                 | 58 (51.3)                        | 12 (10.6)                   | 32 (28.3)   | 11 (9.7)  |

\* Los resultados se expresan en número de pacientes y porcentajes del total de los pacientes incluidos en el estudio.

(tabla 2). Realizamos la revisión retrospectiva de los expedientes para hacer la clasificación sistemática del inmunofenotipo en estos pacientes. Encontramos que dentro del grupo de riesgo habitual, 19 pacientes que correspondía al 16.8% de la muestra total, se clasificaron con inmunofenotipo B, no existieron pacientes con fenotipo T en este grupo y encontramos 7 pacientes a los cuales clasificamos como bifenotipia de acuerdo al EGIL.

En 3 casos (2.6% del total de la muestra), no se encontró resultado del inmunofenotipo en el expediente de los pacientes clasificados como de riesgo habitual.

Encontramos que 84 pacientes habían sido asignados por su oncólogo como de alto riesgo, y de ellos 39 pacientes tuvieron inmunofenotipo de progenitores B y 12 pacientes se clasificaron de células T. En 32 casos se pudo constatar por criterios del EGIL que se trataba de bifenotipia, esto correspondió al 28.3% del total de la muestra.

En el grupo de alto riesgo encontramos que en 11 casos no existía el reporte de inmunofenotipo en el expediente clínico por lo que no fue posible hacer la clasificación inmunológica (tabla 2).

Al analizar de manera separada solo al grupo de leucemias que cumplían criterios de bifenotipia por la clasificación del EGIL, de los 7 pacientes clasificados como portadores de bifenotipia dentro del grupo de riesgo habitual, 6 se clasificaron como bifenotipia para fenotipo B/T con puntaje de  $4.45 \pm 0.57$  y uno para T/Mieloide, con resultado de 3.5 puntos al aplicar la escala.

En el grupo de pacientes catalogados como de alto riesgo, 19 cumplieron criterio para bifenotipia B/T con una media de  $3.76 \pm 0.63$  puntos y en 6 casos los pacientes cumplieron con criterios para bifenotipia de B/mieloide con media de  $3.25 \pm 1$  puntos. En este último grupo ningún paciente calificó para bifenotipia T/Mieloide (tabla 3).

## Discusión

Los sistemas de clasificación inmunológica de las leucemias a través del tiempo han sido heterogéneos, de igual manera los puntos de corte para considerar positivos los porcentajes en los CD, que deben tomarse como diagnósticos para determinar linaje. Otro problema es que el panel de anticuerpos para determinar linaje entre cada institución varía de acuerdo con las posibilidades para adquirir anticuerpos y si a esto agregamos el diferente entrenamiento entre el personal que realiza citometría, hacen que el diagnóstico inmunológico sea más difícil de replicar entre instituciones.

La tendencia mundial gira en torno a homologar paneles de anticuerpos indispensables para diagnóstico, así como incorporar otros marcadores con mayor grado de especificidad diagnóstica, de hecho el mismo grupo del EGIL propone actualmente considerar marcadores que reconozcan cadenas específicas del receptor de células T y al CD117 para linaje mieloide.

También es importante discutir que la clasificación del EGIL tiene limitaciones, y que la OMS en el 2008 difiere en

**Tabla 3** Resultado detallado de aplicar la escala de EGIL

| Riesgo clínico asignado | Total de leucemias bifenotípicas de acuerdo a criterios del EGIL | Subtipo de leucemia bifenotípica y puntaje del EGIL |                    |         |
|-------------------------|--|---|--------------------|---------|
|                         |  | B/T   | B/M                | T/M     |
| Riesgo habitual 29      | 7  | 6 ( $4.45 \pm 0.57$ )                               | -                  | 1 (3.5) |
| Alto riesgo 84          | 25   | 19 ( $3.76 \pm 0.63$ )                              | 6 ( $3.25 \pm 1$ ) | -       |

B: leucemia de progenitores B; T: leucemia de células T; M: leucemia mieloide. Se muestra el número de pacientes y entre paréntesis la puntuación del EGIL con desviación estándar.

general de las definiciones de este Grupo Europeo, y no se señalan implicaciones en el diagnóstico o tratamiento de los pacientes con bifenotipia<sup>29</sup>.

Este trabajo es un intento para clasificar a las leucemias de los pacientes de manera sistemática y bajo un criterio establecido, sin embargo queda pendiente conocer si este diagnóstico impacta en el resultado clínico de los pacientes.

También es probable que conforme los criterios de clasificación cambian, algunas BAL tengan que ser reclasificadas en un futuro.

## Conclusiones

Implementar escalas como esta para clasificar de una manera objetiva y sistemática a nuestros pacientes, podría mejorar el diagnóstico y tal vez establecer consideraciones pronósticas, lo que impactaría directamente en la salud infantil de los pacientes oncológicos.

Es importante considerar que en este trabajo tuvimos un 9% de pacientes sin resultado de inmunofenotipo en el expediente, lo cual es una limitante importante para la asignación del riesgo de recaída, las instituciones de salud debemos trabajar por que este número disminuya.

Puede observarse que la clasificación de las leucemias con linajes ambiguos, las bifenotípicas y bilineales son heterogéneas, por ende la incidencia de estos fenómenos tiene amplias variaciones en la literatura médica internacional. Este trabajo propone una forma de clasificación en un centro hospitalario en México, sería muy conveniente normar lineamientos de calidad en citometría de flujo para clasificar de manera homogénea a las leucemias de los pacientes, así como estandarizar los criterios diagnósticos para poder realizar trabajos colaborativos entre las instituciones.

## Financiamiento

No se recibió ningún patrocinio para la realización de este artículo.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## Referencias

1. Consultado el 16 de mayo de 2013. [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2008/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008/).
2. Consultado el 16 de mayo de 2013. <http://seer.cancer.gov/publications/childhood/>.
3. Xie Y, Davies SM, Xiang Y, et al. Trends in leukemia incidence and survival in the United States (1973-1998). *Cancer* 2003;97:2229-2235.
4. McNeil DE, Coté TR, Clegg L, et al. SEER update of incidence and trends in pediatric malignancies: acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 2002;39:554-557.
5. Pérez-Saldívar ML, Fajardo-Gutiérrez A, Bernáldez-Ríos R, et al. Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC Cancer* 2011;11:355-366.

6. Kadan-Lottick NS, Ness KK, Bhatia S, et al. Survival variability by race and ethnicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *JAMA* 2003;290:2008-2014.
7. Tefferi A, Killmann NM. Globalization of treatment strategies in leukemia: challenges and responsibilities. *Leukemia* 2008;22:1093-1094.
8. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia: concordance among observers and clinical correlations. *Br J Haematol* 1981;4:553-561.
9. Raimondi SC, Pui CH, Hancock ML, et al. Heterogeneity of hyperdiploid (51-67) childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1996;2:213-224.
10. McLean TW, Ringold S, Neuberg D, et al. TEL/AML-1 dimerizes and is associated with a favorable outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1996;11:4252-4258.
11. Borkhardt A, Cazzaniga G, Viehmann S, et al. Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter therapy trials. *Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica and the Berlin-Frankfurt-Münster Study Group. Blood* 1997;2:571-577.
12. Pui CH, Frankel LS, Carroll AJ, et al. Clinical characteristics and treatment out-come of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(4;11)(q21;q23): a collaborative study of 40 cases. *Blood* 1991;3:440-447.
13. Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004;15:1535-1548.
14. Pui CH, Sandlund JT, Pei D, et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIII at St Jude Children's Research Hospital. *Blood* 2004;9:2690-2696.
15. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, et al. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol* 2011;29:551-565.
16. Shuster JJ, Wacker P, Pullen J, et al. Prognostic significance of sex in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 1998;8:2854-2863.
17. Foon KA, Schroff RW, Gale RP. Surface markers on leukemia and lymphoma cells: recent advances. *Blood* 1982;60(1):1-19.
18. Capitini CM, Cooper LJ, Egeler RM, et al. Highlights of the First International "Immunotherapy in Pediatric Oncology: Progress and Challenges" Meeting. *J Pediatr Hematol Oncol* 2009;31:227-244.
19. Mirro J Jr, Kitchingman G, Behm FG, et al. T cell differentiation stages identified by molecular and immunologic analysis of the T cell receptor complex in childhood lymphoblastic leukemia. *Blood* 1987;69:908-912.
20. Roper M, Crist WM, Metzgar R, et al. Monoclonal antibody characterization of surface antigens in childhood T-cell lymphoid malignancies. *Blood* 1983;61:830-837.
21. Margolin J, Rabin K, Steuber CP, et al. Principles and Practice of Pediatric Oncology. Acute Lymphoblastic leukemia. 6<sup>th</sup> Ed. Chapter 19. Philadelphia, USA: Ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 518-565
22. Altman AJ. Clinical features and biological implications of acute mixed lineage (hybrid) leukemias. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1990;12:123-133.
23. Rubnitz JE, Onciu M, Pounds S, et al. Acute mixed lineage leukemia in children: the experience of St Jude Children's Research Hospital. *Blood* 2009 21;113:5083-5089.
24. Weir EG, Ali Ansari-Lari M, Batista DA, et al. Acute bilineal leukemia: a rare disease with poor outcome. *Leukemia* 2007;21(11):2264-2270.

25. Matutes E, Pickl WF, Van't Veer M, et al. Mixed-phenotype acute leukemia: clinical and laboratory features and outcome in 100 patients defined according to the WHO 2008 classification. *Blood* 2011 17;117:3163-3171.
26. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGL). *Leukemia* 1995;9:1783-1786.
27. Matutes E, Morilla R, Farahat N, et al. Definition of acute bi-phenotypic leukemia. *Haematologica* 1997;82:64-66.
28. Uckun FM, Sather HN, Gaynon PS, et al. Clinical features and treatment outcome of children with myeloid antigen positive acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. *Blood* 1997;90(1):28-35.
29. Borowitz MJ, Bene M-C, Harris NL, et al. Acute leukemias of ambiguous lineage. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al (editors). *WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC; 2008. p. 149-155.