

Métodos para detectar enfermedad mínima residual en leucemia linfoblástica aguda y su aplicación clínica

Cárdenas-Araujo D, Gutiérrez-Aguirre CH

Resumen

En los últimos años se han logrado avances muy importantes en el tratamiento de niños y adultos jóvenes con leucemia linfoblástica aguda. En la última década, la aplicación de la enfermedad mínima residual en leucemia linfoblástica aguda se ha expandido significativamente de un número limitado de grupos de investigación en Europa y Estados Unidos a la aplicación en el resto del mundo. La enfermedad mínima residual es altamente predictiva de recaída en niños, adolescentes y adultos jóvenes en tratamiento contra leucemia linfoblástica aguda. Se han desarrollado muchas técnicas para complementar y refinar la morfología y evaluar la respuesta al tratamiento, que incluyen marcadores inmunológicos o moleculares, hibridación fluorescente *in situ*, etc. Este avance tecnológico ha permitido introducir el concepto de enfermedad mínima residual, que ha cambiado la definición convencional de "remisión".

PALABRAS CLAVE: Leucemia linfoblástica aguda; enfermedad mínima residual; citometría de flujo; hibridación fluorescente *in situ*; PCR.

Rev Hematol Mex. 2018 January;19(1):41-49.

Methods for detecting minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia and its clinical application.

Cárdenas-Araujo D, Gutiérrez-Aguirre CH

Abstract

In the past years, remarkable advances have been achieved in the treatment of acute lymphoblastic leukemia in children and young adults. Over the last decade application of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia has expanded significantly from a limited number of study groups in Europe and the United States to worldwide application. Minimal residual disease is highly predictive of relapse in children, adolescents, and young adults treated for acute lymphoblastic leukemia. Several techniques have been developed to complement and refine morphology in assessing response to treatment, including immunologic or molecular markers, fluorescent *in situ* hybridization, etc. This technologic advancement led to introducing the concept of minimal residual disease, which has challenged the conventional definition of "remission".

KEYWORDS: Acute lymphoblastic leukemia; Minimal residual disease; Flow cytometry; Fluorescent *in situ* hybridization; PCR.

Servicio de Hematología del Hospital Universitario, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

Recibido: 29 de diciembre 2017

Aceptado: 8 de enero 2018

Correspondencia

Dra. Daniela Cárdenas Araujo
dra.danielacardenas@hotmail.com

Este artículo debe citarse como

Cárdenas-Araujo D, Gutiérrez-Aguirre CH. Métodos para detectar enfermedad mínima residual en leucemia linfoblástica aguda y su aplicación clínica. Hematol Méx. 2018 ene;19(1):41-49.

ANTECEDENTES

En los últimos años se profundizó en el conocimiento de la cinética de la respuesta temprana al tratamiento en pacientes con leucemia linfoblástica aguda para predecir riesgo de recaída; sin embargo, 20 a 25% de los pacientes que inicialmente responden al tratamiento y morfológicamente no muestran blastos en médula ósea recaen durante la consolidación o luego de finalizar la misma.¹ La enfermedad mínima residual es el método utilizado para la detección de blastos en pacientes morfológicamente curados. La enfermedad residual se refiere a la existencia de enfermedad en pacientes que parecían estar en remisión completa por estudios convencionales.² Esta herramienta es de alto valor pronóstico de recaída en niños, adolescentes y adultos jóvenes con leucemia linfoblástica aguda.³ Múltiples estudios en niños con leucemia linfoblástica aguda utilizan la enfermedad mínima residual para estadificar el riesgo y determinar la intensidad de la quimioterapia que se administrará después de la inducción.⁴ Se han identificado algunos factores de pronóstico que podrían predecir recaída y, de acuerdo con esto, se han introducido protocolos de tratamiento según el grupo de riesgo. Los factores de pronóstico tradicionales incluyen edad, cuenta de blastos al diagnóstico, inmunofenotipo y anomalías genéticas.⁵ La disminución lenta de las células de leucemia después del curso inicial de tratamiento, medido por morfología de sangre periférica o médula ósea una a tres semanas después del diagnóstico, predice alto riesgo de recaída, pero es inexacta porque los blastos de la leucemia linfoblástica aguda son muy parecidos a los precursores linfoides de la médula ósea (hematogonias) y, en algunos casos, a linfocitos maduros,⁶ aquí reside una de las principales utilidades.

¿Cuáles son los métodos de detección de enfermedad mínima residual?

Las células leucémicas se distinguen de las células hematopoyéticas normales por muchas

características genéticas y celulares.⁷ La enfermedad mínima residual puede determinarse por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante la detección de rearrreglos de genes de receptor T, inmunoglobulinas o ambos y por citometría de flujo.⁸

Reacción en cadena de la polimerasa

Durante el desarrollo de la célula B, los segmentos V, D y J de los genes de inmunoglobulina sufren rearrreglos, con borramiento e inserción de nucleótidos en los sitios de unión, con lo que se genera una secuencia única de genes para cada célula y su descendencia. Como las células de la leucemia linfoblástica aguda provienen de la transformación oncogénica de un solo precursor linfoide, éstos tienen rearrreglos clonales en los genes de antígeno-receptor, lo que puede utilizarse para distinguir células leucémicas de precursores linfoides normales mediante la técnica de PCR. La mayor parte de estos rearrreglos son en la línea de células B.⁶ La PCR tiene sensibilidad de 0.01 a 0.001%.⁹

Citometría de flujo

El principio de esta técnica está basado en que las células leucémicas expresan características inmunofenotípicas distintivas que permiten distinguirlas de las células hematopoyéticas normales.¹⁰ El inmunofenotipo asociado con leucemia se define al diagnóstico en más de 95% de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda y sirve para detectar enfermedad mínima residual durante el tratamiento con sensibilidad de 0.01% o de un blasto en 10,000 células normales;¹¹ el 0.01% comúnmente se usa para definir la positividad de la enfermedad mínima residual porque éste es el límite de detección de la citometría de flujo. Los inmunofenotipos asociados con leucemia se reconocen por este método. La mayor parte de los estudios clínicos realizados para definir enfermedad mínima resi-

dual utilizaron cuatro marcadores al diagnóstico, pero pueden utilizarse ocho o más. Esto aumenta la confianza para discriminar entre células normales y células leucémicas, y así se incrementa la sensibilidad en la detección de enfermedad mínima residual.⁶

El conocimiento del inmunofenotipo de células normales es fundamental para poder identificar células patológicas y así establecer los fenotipos asociados con leucemias linfoblásticas agudas. Las células de leucemia linfoblástica aguda presentan marcadores que identifican su origen en precursores B o T. Los precursores linfoides T residen en el timo y no circulan, por lo que la expresión de marcadores T en sangre o médula ósea son suficientes para identificar células leucémicas T. Los progenitores B residen en la médula ósea, pero generalmente están ausentes durante las primeras dos a tres semanas de la inducción a la remisión, porque son extremadamente sensibles a la quimioterapia.¹² En el caso de leucemia linfoblástica aguda B, encontrar marcadores de células inmaduras es suficiente para medir la respuesta al tratamiento. Es importante analizar una muestra suficiente de células (por ejemplo, 100,000 mononucleares) para cada combinación de anticuerpos; 2 mL de médula ósea o 10 mL de sangre periférica proveerán suficientes células.⁶

Transcriptos de fusión

Las células de leucemia linfoblástica aguda tienen anormalidades genéticas que también pueden usarse para distinguirlas de las células normales. Las utilizadas más ampliamente para detección de enfermedad mínima residual son las fusiones de genes, como BCR-ABL1, MLL-AFF1, TCF3-PBX1 y ETV6-RUNX1, lo que resulta en la expresión de transcriptos de ARN mitocondrial aberrante. Estas anormalidades pueden utilizarse para estudios de enfermedad mínima residual y están presentes en 40% de niños y

adultos con leucemia linfoblástica aguda.¹³ La detección de enfermedad residual mediante anormalidades cromosómicas tiene sensibilidad de 0.1 a 0.001%.

¿Cuál es el mejor método para detectar enfermedad mínima residual?

La elección del método para buscar enfermedad mínima residual varía de acuerdo con la experiencia del centro médico. Los estudios para detectar enfermedad residual son complejos y necesitan ser realizados por personas capacitadas. Por ejemplo, la citometría de flujo requiere conocimiento del inmunofenotipo de las células de médula ósea y sangre periférica en diferentes condiciones y la experiencia para escoger qué marcadores utilizar en cada caso.¹⁴ Además, los resultados deben ser interpretados en el contexto que el paciente haya recibido quimioterapia, porque esto puede alterar el inmunofenotipo.

La PCR también requiere experiencia y conocimiento; debe haber consideraciones especiales en presencia de clones menores, que tal vez no fueron detectadas al diagnóstico y pueden predominar durante el curso de la enfermedad.¹⁵

La citometría de flujo y la técnica de PCR aportan resultados similares cuando las concentraciones se encuentran por encima de 0.01% y ambos métodos pueden producir una estimación de la enfermedad residual en las primeras 24 horas de recolección de la muestra. Estos métodos miden dos cosas diferentes, uno mide las células malignas y el otro la expresión del ARNm en las células malignas. Con el uso de marcadores para células inmaduras, la citometría de flujo tiene el potencial de distinguir entre una clona maligna con o sin potencial de recaída. En cambio, las mediciones de enfermedad mínima residual por PCR incluyen información de la homeostasia celular y se detectan más fácilmente células que contienen altas concentraciones de secuencias

de ARN. En algunos centros, el costo es similar, pero en otros el costo de PCR es mayor. La citometría de flujo está disponible en la mayor parte de los centros de tratamiento contra el cáncer en Estados Unidos y para detectar enfermedad residual de manera temprana, por ejemplo en el día 15, tiene la ventaja sobre la PCR; sin embargo, ésta puede ser mejor opción para estudios postrasplante de médula ósea o al final del tratamiento por su alta sensibilidad.⁶ La pauta a seguir la marca el tipo de laboratorio que se encuentre en el centro y la experiencia que tengan con el método (**Cuadro 1**).

¿Cuál es el momento ideal para realizar los estudios de enfermedad mínima residual?

Aún no está claro cuándo es el día adecuado para determinar la enfermedad mínima residual. La medición durante la inducción a la remisión es altamente informativa en niños con leucemia linfoblástica aguda. En muchos protocolos de tratamiento contra leucemia linfoblástica aguda, los días 8 y 15 de la terapia de inducción se consideran los puntos más importantes para valorar

la sensibilidad de la leucemia al tratamiento. La interpretación es simple, una reducción rápida o incluso eliminación de la leucemia (o su clona predominante) es altamente predictiva de una supervivencia libre de recaída mayor.¹⁶ Borowitz demostró que los niveles de enfermedad mínima residual (medida por citometría de flujo) en sangre periférica en el día 8 de la inducción en un grupo grande de pacientes con leucemia linfoblástica aguda B (2143 pacientes) se asociaron directamente con la supervivencia libre de evento. Los pacientes con enfermedad mínima residual de 0.01% o menor tuvieron supervivencia libre de evento de 90%, mientras el grupo con enfermedad mínima residual mayor de 10% tuvo supervivencia libre de evento de 54%.⁴ En general, la medición dos semanas después del diagnóstico provee identificación temprana de los buenos y los malos respondedores.⁶ La Asociación Italiana de Hematología y Oncología Pediátrica y el grupo BFM determinan la enfermedad mínima residual por PCR en los días 33 y 78 del tratamiento para dividir en grupos de riesgo bajo, moderado y alto.¹⁷ El *St. Jude Children's Research Hospital* utiliza

Cuadro 1. Comparación de los diferentes métodos de detección de enfermedad mínima residual

Objetivo	Método	Sensibilidad	Ventajas	Desventajas
Rearreglos en los genes de Ig y TCR	PCR-RQ	0.01-0.001%	<ul style="list-style-type: none">Alta sensibilidadCuantificación exacta	<ul style="list-style-type: none">LaboriosaEvolución clonal → falsos negativosNo es aplicable en todos los centros
Transcriptos de fusión	PCR-RQ	0.01-0.001%	<ul style="list-style-type: none">RápidaAsociación inequívoca con clonas leucémicas o preleucémicas	<ul style="list-style-type: none">Inestabilidad del ARN → falsos negativosRiesgos de contaminación-cruzada → falsos positivos
Inmunofenotipos leucémicos	Citometría de flujo	0.01%	<ul style="list-style-type: none">DisponibilidadRápidaCuantificación exactaProvee información de células hematopoyéticas normales	<ul style="list-style-type: none">Falta de experiencia en el procesamiento e interpretación de los datos → falsos-positivos y falsos-negativosCambios en el fenotipo → se requieren múltiples sets de marcadores
Transcriptos de BCR/ABL	PCR-RQ	0.01-0.001%	<ul style="list-style-type: none">Alta sensibilidadEstabilidad del objetivo durante el curso del tratamientoRápidaFácil/barata	<ul style="list-style-type: none">Sólo aplicable en pacientes Ph positivosInestabilidad del ARNFalta de estandarización de la pruebaFalsos-negativos por contaminación

citometría de flujo como método de detección para identificar sujetos en alto riesgo de manera temprana basado en la positividad de la enfermedad mínima residual en los días 15 y 42. Los pacientes con enfermedad mínima residual de 1% o más en el día 15 reciben terapia de inducción intensificada y en pacientes con 5% se agrega una intensificación adicional. Asimismo, los pacientes con enfermedad mínima residual no detectada ($< 0.01\%$) en el día 15 reciben terapia de reinducción menos intensa y menos dosis acumulada de antraciclinas. Los pacientes con leucemia linfoblástica aguda en riesgo estándar quienes tienen enfermedad mínima residual de 0.01% en el día 42 se reclasifican como en alto riesgo. Cualquier paciente con enfermedad mínima residual de 1% o más en el día 42 es susceptible de recibir trasplante de médula ósea en la primera remisión.^{6,18}

Una interrogante que frecuentemente se plantea es si la detección de enfermedad mínima residual puede realizarse en muestras de sangre periférica. En pacientes con leucemia linfoblástica aguda B, los niveles de enfermedad residual son más altos en la médula ósea que en sangre periférica, por lo que se prefiere analizar la médula ósea en búsqueda de enfermedad mínima residual, a diferencia de la leucemia linfoblástica aguda T, en la que los niveles de enfermedad mínima residual son similares en sangre periférica que en médula ósea; en estos pacientes la enfermedad mínima residual puede realizarse en sangre periférica.¹⁹

¿Cuál es la aplicación clínica de la enfermedad mínima residual?

Valorar la respuesta al tratamiento

Los estudios clínicos realizados con enfermedad mínima residual revelaron que muchos pacientes que alcanzan remisión morfológica aún podrían tener enfermedad residual, hallazgo que se

asocia con alto riesgo de recaída. Uno de los aspectos más decepcionantes del seguimiento de la enfermedad, basado en métodos estándar, es el paciente que después de haber terminado la quimioterapia acude a valoración y puede estar clínicamente bien, con cuentas hematológicas normales, pero 14 días después manifiesta datos de enfermedad en médula ósea. Aquí la importancia clínica de la enfermedad mínima residual es identificar a estos pacientes antes de tener manifestaciones en sangre periférica.

También en los pacientes con una primera recaída que alcanzan una segunda remisión, tener enfermedad residual positiva predice peor resultado. Por tanto, la principal utilidad de buscar enfermedad residual es identificar los pacientes que son aptos a recibir intensificación del tratamiento.⁶

El nivel de positividad de la enfermedad mínima residual es proporcional al riesgo de recaída. Valores iguales o mayores que 1% al final de la inducción a la remisión (en pacientes que están en remisión morfológica) se relacionan con peor resultado, en ese momento deben diseñarse protocolos en los que se recomiende el trasplante de progenitores hematopoyéticos en la primera remisión en estos pacientes.²⁰ El grupo BFM encontró que los pacientes con enfermedad mínima residual de 0.1% o más en los días 33 y 78 del tratamiento tuvieron tasa de recaída de 75%.²¹

El *St. Jude Total Therapy XV Study* (NCT00137111) fue el primer estudio clínico que utilizó los niveles de enfermedad mínima residual de forma prospectiva, durante y después de la inducción a la remisión para guiar el tratamiento de acuerdo con el riesgo. Con el seguimiento a largo plazo de los pacientes estudiados, los resultados mostraron que la determinación de enfermedad mínima residual secuencial es útil para la elección del tratamiento de acuerdo con el riesgo.²²

En un metanálisis publicado recientemente se incluyeron 39 estudios (16 con leucemia linfoblástica aguda en adultos, 20 pediátricos y 3 mixtos), que incluyeron 13,637 pacientes. En los estudios pediátricos, los pacientes con enfermedad mínima residual negativa tuvieron supervivencia libre de enfermedad de 77% en 10 años, comparado con 32% en los pacientes que tenían enfermedad mínima residual positiva. En adultos con enfermedad mínima residual negativa, 64% estuvieron libres de enfermedad vs 21% en pacientes con enfermedad residual.²

En el estudio BFM ALL 2000 se incluyeron 3184 pacientes con leucemia linfoblástica aguda Ph negativa, que fueron estadificados de acuerdo con el riesgo. Se determinó enfermedad mínima residual con técnica de PCR y se clasificaron como riesgo estándar si la enfermedad mínima residual estaba negativa en los días 33 y 78; riesgo intermedio si la enfermedad mínima residual estaba positiva en alguna de las dos mediciones o las dos positivas pero con niveles menores de 10^{-3} ; los pacientes con enfermedad mínima residual positiva mayor de 10^{-3} se consideraban en riesgo alto. Los pacientes con escasa respuesta a la prednisona (más de 1000 blastos por microlitro en sangre periférica en el día 8) o falla para alcanzar la remisión (más de 5% de blastos en médula ósea en el día 33), o enfermedad extramedular persistente después de la fase I de la inducción, o positividad para la fusión MLL/AF4 fueron tratados en el grupo de alto riesgo independientemente del resultado de la enfermedad mínima residual.¹⁷

Disminución en la intensificación del tratamiento

Además de clasificar el riesgo de recaída, aún no está claro si una enfermedad mínima residual negativa nos dé la pauta para decidir si debemos disminuir la intensidad del tratamiento. Sabemos que los pacientes que tienen buena citorreducción en un inicio generalmente tienen

enfermedad mínima residual negativa y esto es de buen pronóstico. Aún permanece la pregunta de si en estos pacientes el tratamiento debería ser menos intenso. Se piensa que no, porque el hecho de que la enfermedad mínima residual negativa sea un factor de buen pronóstico se ha estudiado sólo en el contexto de un protocolo intensivo desde el diagnóstico, por tanto, si disminuimos la intensidad, existe el riesgo de recaída en estos pacientes. La contraparte de esto es que algunos pacientes con leucemia linfoblástica aguda podrían ser curados con un protocolo menos intenso.⁶ En efecto, 36% de los pacientes en el *St. Jude Hospital* fueron curados con protocolos de tratamiento de 1967 a 1979 (con regímenes de protocolo menos intensos que los actuales) y 53% de pacientes entre 1979 y 1983 (que incluían tratamiento de intensificación limitado),²³ incluso en un estudio a todos los pacientes se les suspendió el tratamiento un año posterior al diagnóstico, con supervivencia libre de evento a cinco años de 60%.²⁴

Hace poco se publicó un estudio con 778 niños y adolescentes con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda, para comparar resultados se utilizó un grupo histórico. Ambos grupos recibieron el mismo esquema de inducción y se estadificaron de acuerdo con la enfermedad mínima residual (determinada por PCR). La intensidad del tratamiento fue reducida significativamente en la etapa de intensificación en los pacientes en riesgo estándar, el tratamiento se intensificó en pacientes en riesgo intermedio, e intensificado de forma importante en pacientes en alto riesgo. La mediana de seguimiento fue de 80 meses. Los autores concluyen que puede disminuirse la intensidad del tratamiento en grupos con enfermedad mínima residual no detectada después de los primeros cursos de quimioterapia. En el grupo de riesgo intermedio los resultados mejoraron al administrar pulsos de asparaginasa y dexametasona/vincristina. En el caso de pacientes en riesgo alto, se obtuvo

mejoría en la supervivencia libre de enfermedad al intensificar los cursos de quimioterapia y en la mayoría de los casos con alotrasplante.²⁵

Aún no está bien definido si la enfermedad mínima residual negativa pueda ser un parámetro útil para decidir disminuir la intensidad del tratamiento, esto sería de gran utilidad principalmente en pacientes frágiles con alto riesgo de toxicidad y en centros médicos con recursos limitados porque los beneficios de disminuir el tratamiento pudieran ser mayores que el riesgo de recaída.

Papel de la enfermedad mínima residual posremisión

En pacientes con leucemia linfoblástica aguda que alcanzan primera o segunda remisión, la vigilancia secuencial de la enfermedad mínima residual puede identificar recaída antes que sea detectada por morfología o citogenética. La enfermedad mínima residual secuencial es particularmente útil en los pacientes que se encuentran en remisión, pero tuvieron una enfermedad mínima residual positiva al final de la terapia de inducción. El hecho de mantenerse con enfermedad mínima residual negativa después de una enfermedad mínima residual positiva se asocia con resultado favorable, asimismo, si se mantienen o incrementan los niveles de enfermedad residual trae consigo un alto riesgo de recaída.²⁶

También es útil en pacientes que tienen regeneración linfopoyética muy vigorosa después de la inducción, que puede simular recaída o mala respuesta al tratamiento por morfología, en estos casos la enfermedad mínima residual nos puede ser útil para aclarar el origen de las células sospechosas.

En casos de trasplante de médula ósea, la detección de enfermedad mínima residual antes del trasplante se asocia con incremento en el riesgo

de recaída postrasplante.^{27,28} Esta herramienta se está utilizando para elegir el momento ideal para realizar el trasplante; los pacientes que son aptos para someterse a trasplante de médula ósea deben recibir cursos adicionales de quimioterapia para reducir los niveles de enfermedad mínima residual antes del trasplante. Después del trasplante, detectar enfermedad residual puede servir como indicador para disminuir la terapia inmunosupresiva, administrar infusión de linfocitos del donador o para ambos fines.⁶

Con la vigilancia de BCR/ABL pueden predecirse resultados en pacientes adultos con leucemia linfoblástica aguda Ph positiva que reciban trasplante alogénico o autólogo. En 27 pacientes con enfermedad mínima residual positiva postrasplante alogénico, todos recibieron imatinib y el BCR/ABL se encontró indetectable en 14 de ellos después de una mediana de 1.5 meses. Estos pacientes se mantuvieron en remisión mientras estuvieron en tratamiento con imatinib; 3 tuvieron recaída después de suspender el inhibidor. Por el contrario, 12 de los 13 pacientes que no alcanzaron respuesta molecular tuvieron recaída.²⁹

Enfermedad mínima residual en recaída

La vigilancia de la enfermedad mínima residual en pacientes en recaída conlleva algunos obstáculos debido principalmente a la evolución clonal.³⁰ El análisis detallado de todos los marcadores moleculares al diagnóstico y en el momento de la recaída puede revelar un origen diferente de la clona predominante.³¹ Esto significa que las enfermedades mínimas residuales seriadas después de la remisión usando los marcadores que se identificaron al diagnóstico podrían fallar si ocurre evolución clonal a la recaída.

CONCLUSIONES

Numerosos estudios han establecido que la enfermedad mínima residual es la herramienta

con más valor pronóstico para predecir los resultados en niños, adolescentes y adultos jóvenes con leucemia linfoblástica aguda. Existe mucha información en la bibliografía que apoya la aplicación de la enfermedad mínima residual para valorar el riesgo de recaída y, con base en esto, los pacientes con enfermedad mínima residual positiva son asignados a recibir un tratamiento más intensivo. Las técnicas actuales son complejas, y hacen posible la detección temprana de células leucémicas, lo que permite ajustar el tratamiento, realizar un trasplante alogénico de células hematopoyéticas o ambos. La utilidad de la detección de enfermedad mínima residual en pacientes con leucemia linfoblástica aguda es evidente, el método que se seleccione dependerá, entre otras cosas, de su disponibilidad, recursos económicos y experiencia del centro médico.

REFERENCIAS

1. Pui CH, Boyett JM, Rivera GK, et al. Long-term results or total therapy studies 11,12 and 13A for childhood acute lymphoblastic leukemia at St Jude Children's Research Hospital. *Leukemia* 2000;14:2286-2294.
2. Berry DA, Zhou S, Higley H, et al. Association of Minimal residual disease with clinical outcome in pediatric and adult acute lymphoblastic leukemia: A meta-analysis. *JAMA Oncol* 2017;3(7):e170580.
3. Borowitz MJ, Wood BL, Devidas M, et al. Prognostic significance of minimal residual disease in high risk B-ALL: a report from Children's Oncology Group study AALL0232. *Blood* 2015;126(8):964-971.
4. Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group Study. *Blood* 2008;111(12):5477-5485.
5. Faham M, Zheng J, Moorhead M, et al. Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2012;120(26):5173-5180.
6. Campana D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010;2010:7-12.
7. Campana D. Status of minimal residual disease testing in childhood haematological malignancies. *Br J Haematol* 2008;143(4):481-489.
8. Campana D, Coustan-Smith E. The use of flow cytometry to detect minimal residual disease in acute leukemia. *Eur J Histochem* 1996;40Suppl 1:39-42.
9. Van der Velden V, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003;17:1013-1034.
10. Bradstock KF, Janossy G, Tidman N, et al. Immunological monitoring of residual disease in treated thymic acute lymphoblastic leukaemia. *Leuk Res* 1981;5(4-5):301-309.
11. Ciudad J, San Miguel JF, López-Berges MC, et al. Prognostic value of immunophenotypic detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1998;16(12):3774-3781.
12. Coustan-Smith E, Ribeiro RC, Stow P, et al. A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. *Blood* 2006;108(1):97-102.
13. Campana D. Role of minimal residual disease monitoring in adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009;23(5):1083-1098.
14. Campana D, Coustan-Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry* 1999;38(4):139-152.
15. Szczepanski T, Willemse MJ, Brinkhof B, van Wering ER, van der Burg M, van Dongen JJ. Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor B-ALL provides improved strategies for selection of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease. *Blood* 2002;99(7):2315-2323.
16. Schrappe M. Minimal residual disease: optimal methods, timing, and clinical relevance for an individual patient. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:137-142.
17. Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 Study. *Blood* 2010;115(16):3206-3214.
18. Coustan-Smith E, Sancho J, Behm FG. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemia cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;100(1):52-58.
19. Van der Velden V, Jacobs DC, Wijkhuijs AJ, et al. Minimal residual disease levels in bone marrow and peripheral blood are comparable in children with T cell acute lymphoblastic leukemia (ALL), but not in precursor-B-ALL. *Leukemia* 2002;16(8):1432-1436.
20. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2006;354(2):166-178.
21. Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, et al. Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor

- gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2008;22(4):771-782.
22. Pui CH, Campana D, Pei D, et al. Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *N Engl J Med* 2009;360(26):2730-2741.
23. Rivera GK, Pinkel D, Simone JV, Hancock ML, Crist WM. Treatment of acute lymphoblastic leukemia: 30 year's experience at St Jude Children's Research Hospital. *N Engl J Med* 1993;329(18):1289-1295.
24. Toyoda Y, Manabe A, Tsuchida M, et al. Six months of maintenance chemotherapy after intensified treatment for acute lymphoblastic leukemia of childhood. *J Clin Oncol* 2000;18(7):1508-1516.
25. Pieters R, De Groot-Kruseman H, Van Der Velden V, et al. Successful therapy reduction and intensification for childhood acute lymphoblastic leukemia based on minimal residual disease monitoring: Study ALL10 from the Dutch Childhood Oncology Group. *J Clin Oncol* 2016;34(22):2591-2601.
26. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;96(8):2691-2696.
27. Knechtli CJ, Goulden NJ, Hancock JP, et al. Minimal residual disease status before allogeneic bone marrow transplantation is an important determinant of successful outcome for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1998;92(11):4072-4079.
28. Krejci O, van der Velden VH, Bader P, et al. Level of minimal residual disease prior to haematopoietic stem cell transplantation predicts prognosis in paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia: a report of the Pre-BMT MRD Study Group. *Bone Marrow Transplant* 2003;32(8):849-851.
29. Wassmann B, Pfeifer H, Stadler M, et al. Early molecular response to posttransplantation imatinib determines outcome in MRD+Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ALL). *Blood* 2005;106(2):458-463.
30. Eckert C, Flohr T, Koehler R, et al. Very early/early relapses of acute lymphoblastic leukemia show unexpected changes of clonal markers and high heterogeneity in response to initial and relapse treatment. *Leukemia* 2011;25(8):1305-1313.
31. Szczepanski T, van der Velden VH, Waanders E, et al. Late recurrence of childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia frequently represents a second leukemia rather than a relapse: first evidence for genetic predisposition. *J Clin Oncol* 2011;29(12):1643-1649.