

https://doi.org/10.24245/rev_hematol.v23i1.7207

Enfermedad mínima residual por citometría de flujo en pacientes con leucemia linfoblástica aguda

Minimal residual disease by flow cytometry in patients with acute lymphoblastic leukemia.

Estefania Cuta-Hernández,¹ Claudia Andrea Cruz-Baquero²

Resumen

La citometría de flujo es una técnica de amplia importancia en la investigación biomédica y diagnóstica, que permite el análisis multiparamétrico de poblaciones celulares. Se caracteriza por ser altamente sensible y rápida. Asimismo, entre las características evaluadas en la población celular de interés resaltan: el tamaño, granularidad, complejidad del citoplasma celular y receptores de superficie que permiten la caracterización y diferenciación fenotípica. En los últimos años, se han logrado avances notables en esta técnica, lo que ha permitido diferenciar poblaciones celulares de forma más específica y subclasificarlas mediante la conjugación de diversos anticuerpos monoclonales antígeno-específicos capaces de reconocer un set completo de receptores de membrana. A partir de dichos avances, esta técnica ha tomado especial importancia en el diagnóstico y seguimiento de enfermedades y anomalías hematológicas, como leucemias, síndromes mielodisplásicos, síndromes mieloproliferativos, entre otras. En razón de lo antes expuesto, la enfermedad mínima residual presente en la leucemia linfoblástica aguda es una población mínima leucémica que se detecta en un paciente después del tratamiento oncológico suministrado, donde se evalúa la eficacia del mismo, el riesgo de una recaída y el proceso de remisión completa por medio de varios avances bioinformáticos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y citometría de flujo. Esta revisión se focaliza en los avances de la implementación de citometría de flujo para la detección eficiente de la enfermedad mínima residual en pacientes diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda.

PALABRAS CLAVE: Citometría de flujo; enfermedad mínima residual; anticuerpos monoclonales; leucemia linfoblástica aguda.

Abstract

Flow cytometry is a technique of great importance in biomedical and diagnostic research, which allows multiparametric analysis of cell populations. It is highly characterized by being sensitive and fast. Likewise, among the characteristics evaluated in the cell population of interest, the following stand out: size, granularity, complexity of the cell cytoplasm and surface receptors that allow phenotypic characterization and differentiation. In recent years, notable advances have been made in this technique, which has made it possible to differentiate cell populations more specifically and sub-classify them through the conjugation of various antigen-specific monoclonal antibodies capable of recognizing a complete set of membrane receptors. Based on these advances, this technique has taken on special importance in the diagnosis, and the monitoring of diseases and hematological abnormalities, such as leukemias, myelodysplastic syndromes, myeloproliferative syndromes, among others. Due to the above, the minimal residual disease present in acute lymphoid leukemia is a minimal leukemic population that is detected in a patient after the cancer treatment provided, where the efficacy of the treatment, the risk of relapse and the process of complete remission by means of various bioinformatic advances, such as polymerase chain reaction and flow cytometry. This review focuses on the advances in the implementation of flow cytometry for the efficient detection of minimal residual disease in patients diagnosed with acute lymphoblastic leukemia.

KEYWORDS: Flow cytometry; Minimal residual disease; Monoclonal antibodies; Acute lymphoid leukemia.

¹ Estudiante de la Facultad de Ciencias de la Salud. Programa de Bacteriología y Laboratorio clínico.

² Docente investigadora, Grupo de Investigación REMA. Departamento de Bacteriología. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá, Colombia.

Recibido: diciembre 2021

Aceptado: febrero 2022

Correspondencia

Estefania Cuta Hernández
ecutah@unicolmayor.edu.co

Este artículo debe citarse como:
Cuta-Hernández E, Cruz-Baquero CA. Enfermedad mínima residual por citometría de flujo en pacientes con leucemia linfoblástica aguda. Hematol Méx 2022; 23 (1): 58-69.

ANTECEDENTES

Cualquier tipo de cáncer que afecta a la médula ósea, como la leucemia y el linfoma, son un problema de salud mundial; la más representativa es la leucemia con una tasa de incidencia en Colombia de 3.6 a 5.2 por cada 100,000 habitantes según GLOBOCAN y Sivigila en 2020.¹ Se caracteriza por la anormalidad en el proceso de proliferación y diferenciación celular a nivel del linaje linfoide o mieloide y según la etapa en la que se encuentra: aguda o crónica.²⁻⁵ De acuerdo con esto, puede clasificarse en leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica y leucemia mieloide crónica.⁶ Sin embargo, la leucemia linfoblástica aguda tiene especial relevancia clínica y diagnóstica por ser una de las neoplasias malignas con un reporte en el Boletín Epidemiológico Semanal del Instituto Nacional de Salud del 75% en población pediátrica² y un 20% en población adulta,⁷ con recaída entre el 40 y el 55% de los pacientes en proceso de remisión.^{2,3}

Por consiguiente, la leucemia linfoblástica aguda es una enfermedad heterogénea de células neoplásicas del sistema hematopoyético^{2,7} con ciertas propiedades celulares que permiten su diferenciación y clasificación, como tamaño, granularidad, receptores de superficie y complejidad del citoplasma celular, entre otros. Estas características favorecen su detección por métodos altamente específicos, sensibles, reproducibles y aplicabilidad, como la citometría de flujo (inmunofenotipos), inmunohistología, hibridación fluorescente *in situ* (FISH), citogenética (expresión aberrante de FLT3, NRAS/KRAS, DNMT3A, IDH1, IDH2 y NOTCH1) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR),⁸⁻¹⁴ los cuales se implementan en el diagnóstico y seguimiento terapéutico de la leucemia aguda con 893 casos reportados en 2020.¹ A pesar de los bajos números de casos reportados, la importancia en Salud Pública emerge del aumento

de cifras con respecto a recaídas en el proceso de remisión completa, originando el término enfermedad mínima residual a la aparición de células blásticas por debajo del 5% en médula ósea,⁸ difíciles de detectar por medio de un frotis de sangre periférica y médula ósea, dando la posibilidad de considerar nuevos métodos para su detección temprana.

Por ello, se realizó una recopilación de información fiable con el fin de profundizar sobre el papel de los inmunofenotipos detectables por el método de citometría de flujo, teniendo en cuenta los diferentes parámetros de calidad, como el factor de impacto (IF > 3) y el cuartil (Q1, Q2, Q3 o Q4); es posible calcular los anteriores con la página Bioxbio y SCImago, respectivamente, se seleccionó la bibliografía durante el periodo de enero de 2011 a septiembre de 2021, utilizando las palabras clave: enfermedad mínima residual y leucemia linfoblástica aguda o solo enfermedad mínima residual o citometría de flujo para detección de enfermedad mínima residual/métodos de diagnóstico de enfermedad mínima residual. Se seleccionaron 60 referencias bibliográficas para su análisis y se gestionaron en formato PDF utilizando Mendeley, como programa de gestión de referencias.

GENERALIDADES

El término enfermedad mínima residual (MRD, por sus siglas en inglés) surgió en el decenio de 1980, donde se usó por primera vez para su detección la microscopia de inmunofluorescencia para el monitoreo de disminución y recrecimiento de células malignas en pacientes diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda; debido a este reconocimiento de células emergentes, se estableció dicho término, haciendo referencia a la existencia de blastos leucémicos menores al 5% de forma residual no detectables por técnicas rutinarias en médula ósea, pero con una recuperación completa en

sangre periférica.^{9,15,16} El progreso en el uso de nuevas técnicas, como la citometría de flujo, hace posible la identificación de esta población aberrante con sensibilidad de 10^{-3} a 10^{-5} y aplicabilidad de más del 90% tanto en el linaje B (LLA-B) y linaje T (LLA-T), ayudando a establecer la etapa de diferenciación/madurez celular, dando lugar a la clasificación o estratificación de riesgo de recaída como bajo (0%), normal (47%) y alto (94%), donde la persistencia de más de 10^{-4} de linfoblastos neoplásicos hace referencia a enfermedad mínima residual positiva.^{9,16-19}

El método de citometría de flujo es fundamental en la determinación de la presencia o ausencia de una célula neoplásica que da como resultado una enfermedad mínima residual positiva o negativa, por medio de características ópticas y de fluorescencia usando tres tipos de sistemas, como el sistema de fluidos (transporte de las células a través de una solución salina tamponada con fosfato), sistema óptico (uso de la dispersión de luz de forma directa o lateral para medir tamaño y granularidad) y sistema electrónico (procesamiento y detección de señales)^{18,20,21} proporcionando sensibilidad y especificidad en el análisis celular a través de la recolección de estas señales y, de esta manera, transformarlas en información hematológica importante para predecir una recaída, logrando intensificar el tratamiento si el paciente así lo requiere. Por tanto, la introducción de este método propició el uso de diferentes principios inmunológicos, biológicos y físicos, aumentando la innovación por medio del uso de paneles de anticuerpos monoclonales y fluorocromos como marcadores inmunológicos esenciales en la identificación precisa de poblaciones de células hematopoyéticas cancerígenas,¹⁸⁻²² estableciendo la aparición de la inmunofenotipificación moderna, capaz de detectar multiparámetros en una sola célula. Con respecto a estos avances, la citometría de flujo es un paso decisivo en el diagnóstico de la enfermedad mínima residual en leucemia linfoblástica aguda.¹⁸

Por esto, la mayoría de los anticuerpos que son utilizados en citometría de flujo, dirigidos contra antígenos específicos expresados en la superficie celular, proteínas de membrana o intracitoplasmática y analizados a la par con controles positivos o negativos, como en el caso de los marcadores de células T (CD3, CD4 o CD8).^{22,23,24} Debido a que la leucemia linfoblástica aguda exhibe típicamente unos inmunofenotipos precursores, éstos permiten la clasificación de dos subtipos LLA-T y LLA-B,²⁵ de esta forma, enfocar la detección de la enfermedad mínima residual por CMF en un análisis de una célula leucémica por 10^5 leucocitos^{26,27} donde la expresión de antígenos CD10, CD3, CD7, CD19, CD20, CD34, CD38, CD45, cCD3+ y TdT en células leucémicas puede predecir la aparición de la enfermedad mínima residual,^{24,27,28,29} esto difiere según el factor de riesgo, como la edad avanzada, el recuento de leucocitos, alteraciones genéticas y la respuesta a la quimioterapia, lo cual aumenta la probabilidad de recaída en los dos años posteriores al diagnóstico, con tasa de supervivencia inferior al 25%.^{9,10,25,30} De acuerdo con esto, el diseño de un panel de anticuerpos monoclonales es fundamental para la identificación de blastos y sus características fenotípicas relevantes, que dan resultados significativos en la detección de la enfermedad mínima residual. Estos paneles se seleccionan en función a la historia clínica de cada paciente y la morfología presentada en un frotis de médula ósea,²¹ con el fin de encontrar una línea fenotípica acertada; sin embargo, hay paneles, como el CD34, CD45 y TdT, que siempre deben utilizarse, ya que resaltan la existencia de una población de blastos en la muestra estudiada.²⁴

MUESTRAS ÓPTIMAS

La médula ósea es la muestra más utilizada a lo largo del tiempo para el diagnóstico, clasificación y detección de la enfermedad mínima residual en

la leucemia linfoblástica aguda);^{10,16,17,25,26,27,31,32} sin embargo, se realizaron estudios usando sangre periférica, lo que demostró que los niveles de enfermedad mínima residual en sangre en pacientes diagnosticados con LLA-T eran compatibles o 1 log más bajo que en médula ósea y en pacientes con LLA-B se detectaron en sangre 1 a 3 log más bajos que en médula ósea.^{16,17,31-34} En consecuencia, la más conveniente para vigilar la enfermedad mínima residual independientemente del origen T o B es la muestra de médula ósea, aspirado medular o ambos, se recomienda recolectar un volumen de 2 a 5 mL para examinar $> 5 \times 10^6$ células por citometría de flujo y obtener un rango de sensibilidad 10^{-4} células blásticas aberrantes.^{16,35} La muestra de médula ósea debe obtenerse de pacientes con proceso de remisión o en el momento de remisión completa (aproximadamente el día 21 del primer ciclo) y durante el curso de la terapia de consolidación y mantenimiento,³⁶ ésta debe recolectarse en un tubo lila con EDTA (etilendiaminotetraacético) que funciona como quelante de calcio y de esta manera actúa como anticoagulante^{21,32,35,37} que debe conservarse a temperatura ambiente; de acuerdo con el protocolo, estas muestras deben incubarse con anticuerpos con alícuotas de médula ósea seguido de lisis de hematíes (glóbulos rojos) con una solución de cloruro de amonio, lavado con suero fisiológico o solución salina tamponada con fosfato (PBS) para después incubarse con los respectivos fluorocromos.³⁵⁻⁴¹

ANÁLISIS DE CITOMETRÍA DE FLUJO MULTIPARAMÉTRICO

El estudio de cada muestra debe analizarse mediante una combinación de anticuerpos y colores que detecten la viabilidad y presencia de células normales o anormales;³⁹ debido a esto los ensayos de ERM requieren una relación señal-ruido alta para permitir la separación completa de las poblaciones anormales de baja frecuencia de las células normales de inmunofenotipo similar.⁴¹

Por esto, se inicia con la exclusión de células muertas y desechos celulares por medio de puntos de dispersión frontal de luz (FSC)/dispersión lateral (SSC), para así disponer de poblaciones de blastos y células maduras en la médula ósea (**Figura 1**), con lo cual se seleccionan los blastos como población de estudio.

En este punto, la población de blastos encontrada en los gates seleccionados (regiones) pasa a la caracterización inmunofenotípica de acuerdo con la presencia de antígenos celulares y la excitación de los fluorocromos utilizados, como FITC (isotiocianato de fluoresceína), PE (ficoeritrina), APC (aloficocianina), entre otros.⁴⁰ De esta manera, continuar con la detección de blastos leucémicos; debe compararse la expresión del marcador del CD45 con la complejidad o granulosidad celular (SSC) para diferenciar entre las células blásticas inmaduras y maduras que se encuentran en la médula ósea.^{24,28,39,40} **Figura 2**

Otros marcadores útiles para identificar poblaciones de linfoblastos son CD34, CD10, CD20 y CD79a que se expresan en gran parte en LLA-B y en una minoría de casos de LLA-T,

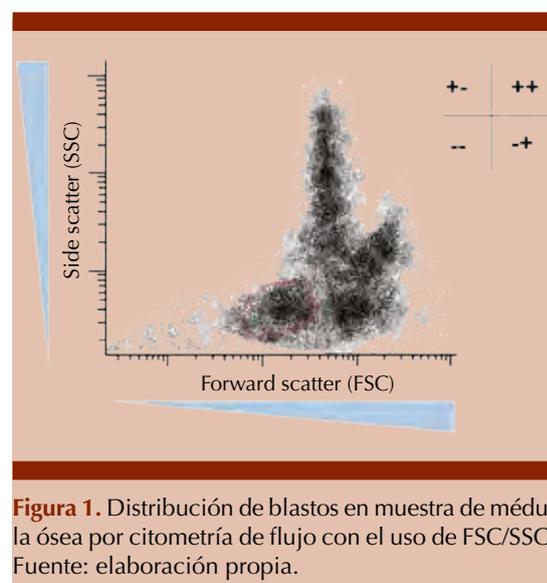


Figura 1. Distribución de blastos en muestra de médula ósea por citometría de flujo con el uso de FSC/SSC. Fuente: elaboración propia.

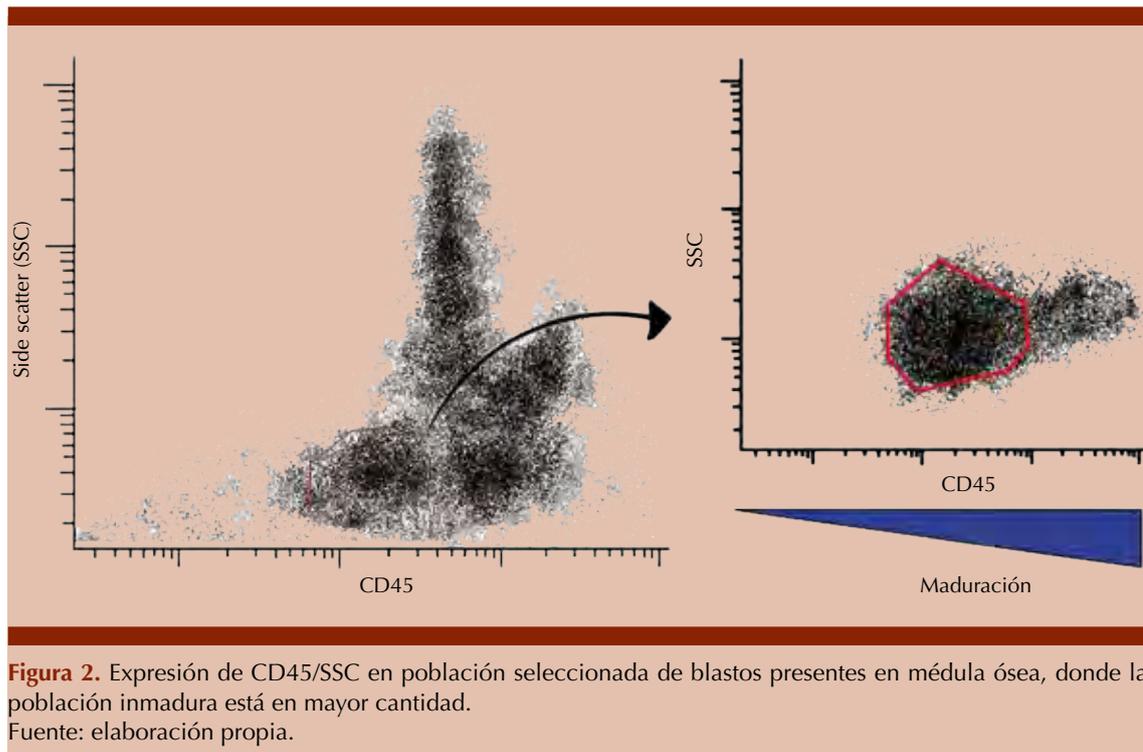


Figura 2. Expresión de CD45/SSC en población seleccionada de blastos presentes en médula ósea, donde la población inmadura está en mayor cantidad.
Fuente: elaboración propia.

respectivamente.^{24,42-45} El marcador CD4 puede usarse en casos con expresión débil o negativa de la expresión de TdT,⁴² debido a que el TdT y CD19 se encuentran positivos en al menos el 95% de los casos de leucemia linfoblástica B y en menor proporción de leucemia linfoblástica T.^{24,44,45} Estos inmunofenotipos característicos son esenciales en la detección de LLA-B (**Cuadro 1**), por ende, son primordiales en la identificación de poblaciones mínimas de enfermedad mínima residual, ya que tienen una relación de expresión aumentada frente a la mayor parte de los precursores de células B normales inmaduras. **Figura 3**

En cuanto a la determinación de enfermedad mínima residual en pacientes con LLA-T, se caracterizan por una expresión anormal de CD3 (ausente en la superficie, presente en el citoplasma), CD5 (presente o disminuido), CD7

(aumentado) y CD48 (ausente) en relación con las células T maduras (**Cuadro 1**).^{24,39,43,44} Sin embargo, la existencia de inmunofenotipos específicos para su detección no se ha establecido debido al aumento de heterogeneidad de los marcadores, provocando un obstáculo en su detección. **Figura 4**

Este enfoque de reconocimiento de marcadores inmunológicos (**Cuadro 1**) en leucemia linfoblástica aguda proporciona facilidad para el desarrollo de estandarización en el método de citometría de flujo que beneficie el diagnóstico y la detección de enfermedad mínima residual. De esta forma, se destacan combinaciones de anticuerpos, como TdT/CD10/CD34/CD19, CD7/CD3/CD5/CD45 y CD38/CD10/CD3/CD19^{45,46} que son altamente efectivos en casos evaluados para remisión.

Cuadro 1. Principales marcadores inmunológicos presentes en la leucemia linfoblástica aguda

Tipo de leucemia linfoblástica aguda	Marcadores inmunológicos	Referencias bibliográficas
LLA-B	CD20+ CD10+ CD19+ CD79a+ CD45± CD34+ CD58+ CD22+ CD20+ HLA-DR+ TdT+	16, 23, 24, 33, 35, 36, 39, 40, 41-46, 48, 53, 55
LLA-T	CD45+ CD5+ CD7+ CD19+ CD34+ CD99+ CD3- cCD3+ HLA-DR TdT±	23, 24, 33, 39, 40, 43-46, 55, 60, 61

Fuente: elaboración propia.

IMPORTANCIA CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL

La detección de enfermedad mínima residual es un fuerte factor pronóstico que identifica y estratifica a los pacientes con alto, mediano o bajo riesgo de fracaso y efectos del tratamiento y, de esta forma, dirigir una terapia adecuada.^{43,47,48} Como un indicador temprano de respuesta útil en conjunto con las medidas de respuesta tradicionales para la monitorización durante y después de la terapia en pacientes con enfermedad mínima residual positiva que son asociados a un mal pronóstico.⁴⁷

Desde una perspectiva clínica, es necesario reconocer el nivel de sensibilidad que puede detectarse por citometría de flujo para la estratificación del riesgo y mantener una relación entre el protocolo terapéutico con la tasa de respuesta y de esta forma proporcionar una

atención eficiente para evitar recaídas.^{16,36,49} La sensibilidad para la estratificación del riesgo (**Cuadro 2**) tiene diferentes niveles (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}), que se correlacionan con un tasa de recaída, incluso un nivel bajo de ERM se asoció con un resultado desfavorable, esto puede manifestarse con la existencia de más del 5% de linfoblastos por morfología o evidencia de enfermedad extramedular.^{50,51,52}

Asimismo, se estratifica a los pacientes con riesgo normal con enfermedad mínima residual $\leq 10^{-2}$ ($< 0.1\%$) en el día 15 del tratamiento suministrado; cualquier paciente que tenga más del 10% de blastos leucémicos detectados por citometría de flujo en el día 15 de tratamiento se incluye en el grupo de alto riesgo de recaída, de igual forma, los pacientes con enfermedad mínima residual $\geq 10^{-3}$ (0.1%) en el día 33 y su detección continúa en el día 78 se clasifican en el grupo de alto riesgo y serán

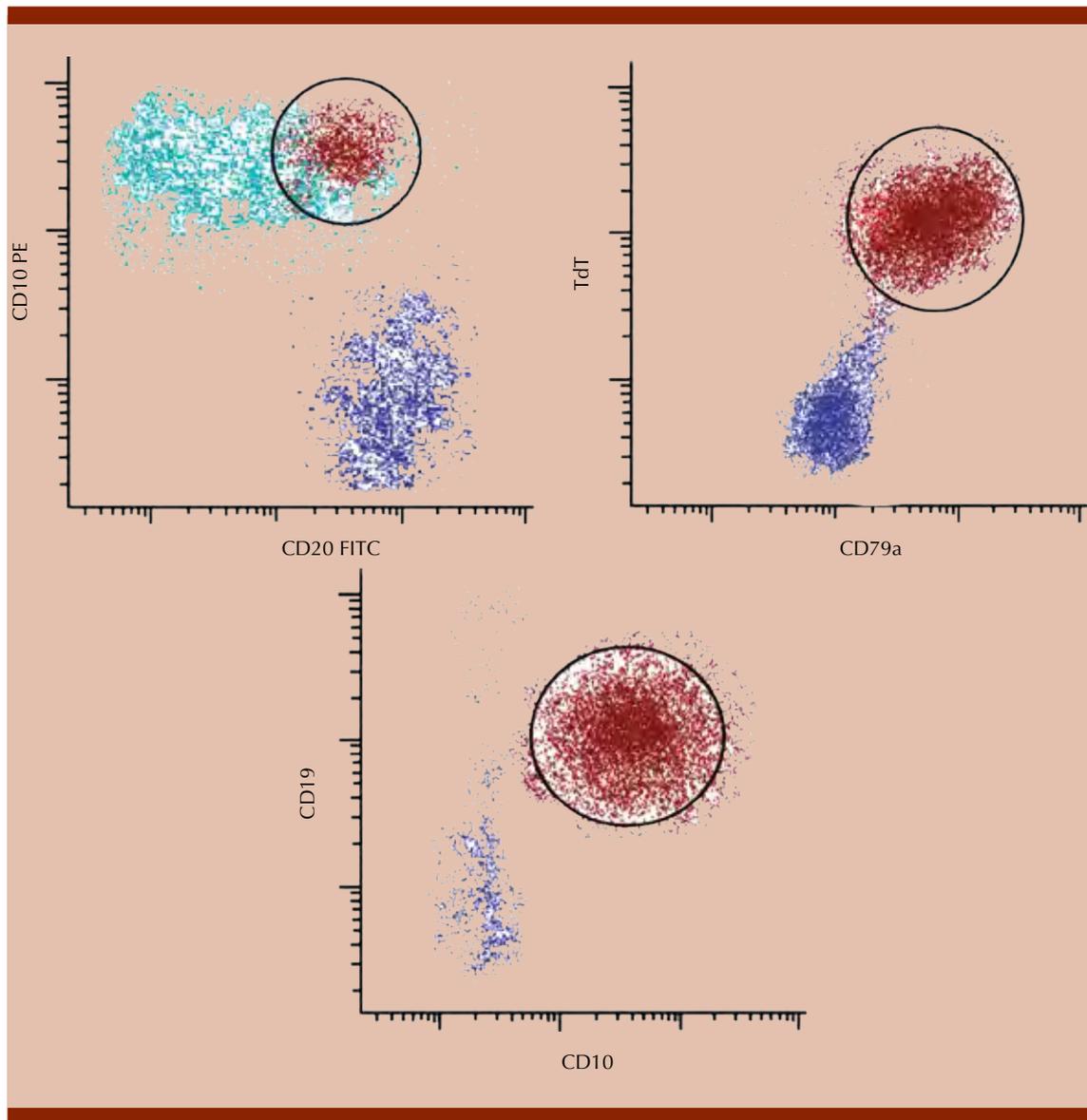


Figura 3. Expresión de inmunofenotipos clave en la detección de enfermedad mínima residual de linfoblastos leucémicos de linaje B.
Fuente: elaboración propia.

vigilados después de cada modificación en el tratamiento.^{43,49,50-54,56}

Los pacientes con mayor riesgo de recaída deben recibir una terapia adaptada a este riesgo,

los anticuerpos de doble especificidad, como blinatumomab, provocan la activación directa de los linfocitos T biespecíficos contra los blastos leucémicos que poseen CD19 y linfocitos CD3, los CAR-Ts implican un mecanismo similar, en

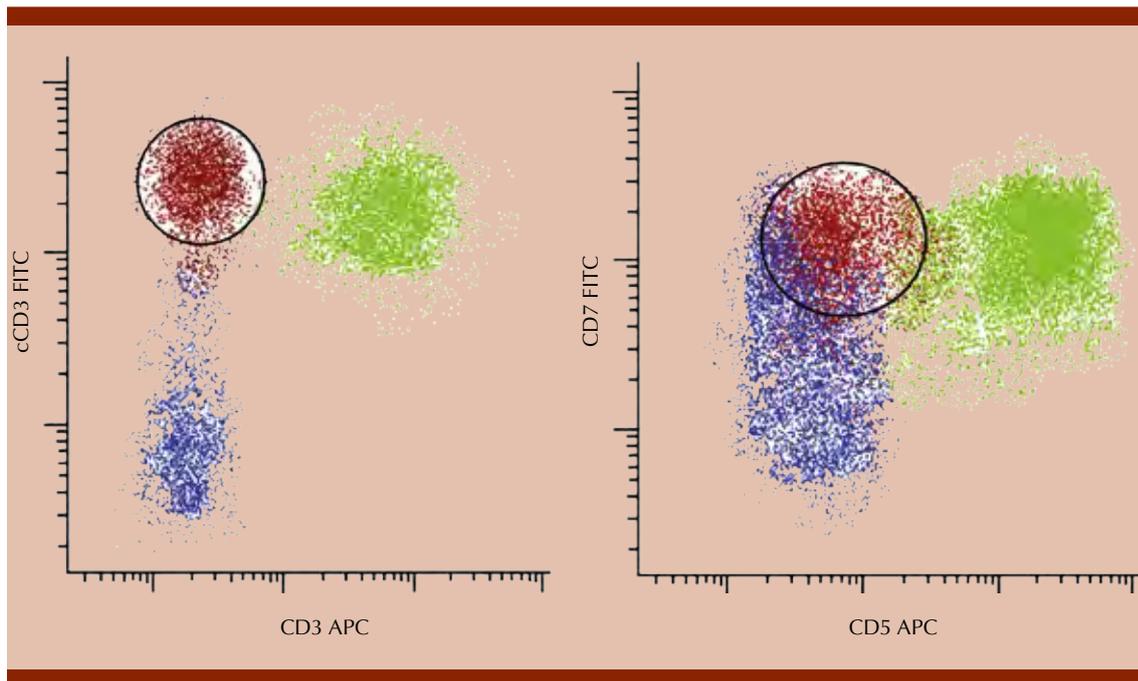


Figura 4. Expresión de los principales inmunofenotipos para la detección de enfermedad mínima residual de linfoblastos leucémicos de linaje T.

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 2. Estratificación del riesgo de enfermedad mínima residual por citometría de flujo

Sensibilidad de detección celular hematológica	Niveles de riesgo	Referencias bibliográficas
$\geq 10^{-1}$ o $\geq 10^{-2}$	Riesgo alto	43, 48, 49, 52-55, 57, 61
$\geq 10^{-3}$	Riesgo normal	
$\geq 10^{-4}$ y $\geq 10^{-5}$	Riesgo bajo	

Fuente: elaboración propia.

el que las propias células T de un paciente están programadas genéticamente para reconocer las células leucémicas, lo que induce una respuesta inmunitaria antileucémica.^{9,49,51,55,56,57,60} También el conjugado anticuerpo anti-CD22-fármaco inotuzumab ozogamicina que se une a las células leucémicas se internaliza y libera una citotoxina que destruye la célula leucémica (**Figura 5**).^{49,51,55,56,59} Por el contrario, los pacientes con menor riesgo de recaída pueden beneficiarse

de la reducción del tratamiento, lo que potencialmente ahorra tratamientos innecesarios y toxicidades relacionadas.^{9,49,57-60}

Después de proporcionar el tratamiento adecuado, debe lograrse una remisión completa que requiere la presencia de hematopoyesis de las tres líneas celulares con menos del 5% de blastos en la muestra de médula ósea y recuperación celular en el hemograma periférico con ausencia

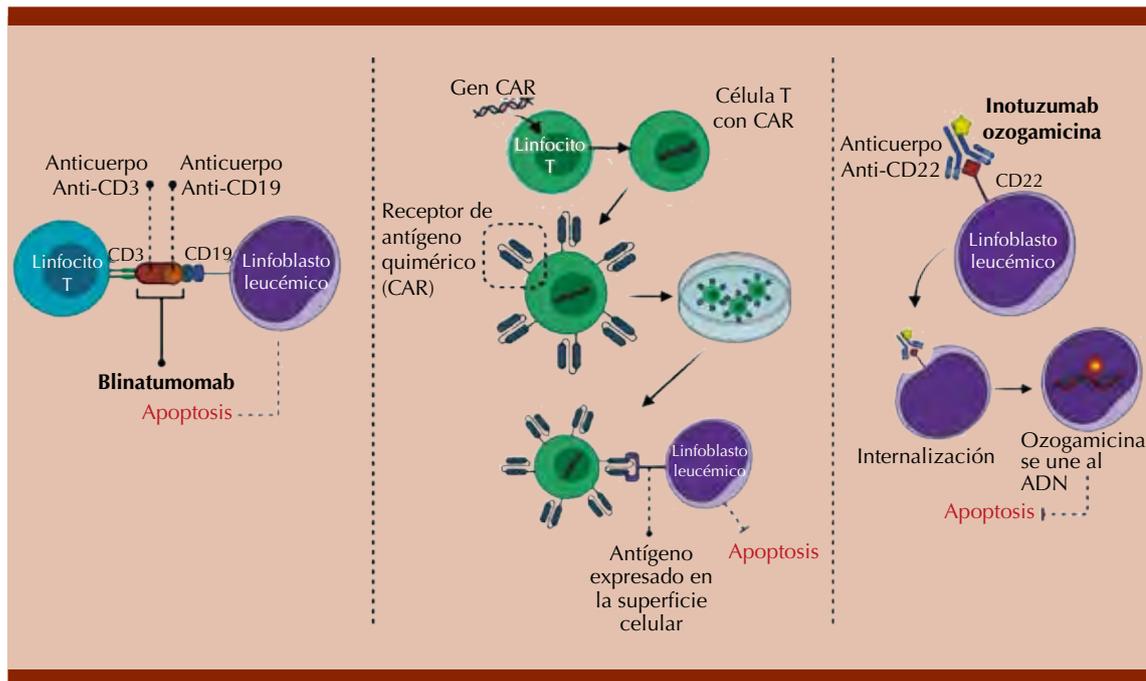


Figura 5. Mecanismos de terapias prescritas en pacientes diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda. Fuente: elaboración propia.

de blastos circulantes tanto en pacientes pediátricos como adultos, lo que origina una tasa de supervivencia alta.^{36,51,55}

CONCLUSIONES

Los principales obstáculos para la detección de enfermedad mínima residual son su complejidad, alto costo y la necesidad de experiencia técnica, que disminuye con la utilización de citometría de flujo; ésta se basa en la identificación de características inmunofenotípicas de la leucemia de fácil interpretación para lograr un análisis exhaustivo de células individuales y otorgar la capacidad de reconocer pequeñas subpoblaciones normales y neoplásicas.

A medida que aumenta la sensibilidad y especificidad en la detección de enfermedad mínima residual, se ha favorecido la estratificación de

riesgo y pronóstico de recaída durante y después del tratamiento oncológico, esto es de suma importancia clínica, especialmente en pacientes positivos y población adulta con tasa de supervivencia baja, debido a que pueden reorientarse rápidamente hacia un tratamiento adecuado y lograr la remisión completa.

REFERENCIAS

1. Instituto Nacional de Salud. Comportamiento epidemiológico de cáncer en menores de 18 años, periodo 2015 a 2020. Colombia. Boletín Epidemiológico Semanal 2021. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2021_Boletin_epidemiologico_semana_5.pdf
2. Villalba CP, Martínez PA, Acero H. Caracterización clínico-epidemiológica de los pacientes pediátricos con leucemias agudas en la Clínica Universitaria Colombia. Serie de casos 2011-2014. *Pediatría (Santiago)* 2016; 49 (1): 17-22.
3. Gacha-Garay MJ, Akle V, Enciso L, Garavito-Aguilar ZV. La leucemia linfoblástica aguda y modelos animales alternativos para su estudio en Colombia. *Rev Colomb*

- Cancerol 2017; 21 (4): 212-224. <https://doi.org/10.1016/j.rccan.2016.10.001>.
4. 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. doi: 10.1182/blood-2016-03-643544.
 5. Grimwade LF, Fuller KA, Erber WN. Applications of imaging flow cytometry in the diagnostic assessment of acute leukaemia. *Methods* 2017; 112: 39-45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jymeth.2016.06.023>.
 6. Berry DA, Zhou S, Higley H, Mukundan L, Fu S, Reaman GH, 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. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.0580.
 7. Moorman AV. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2016; 101 (4): 407-16. doi: 10.3324/haematol.2015.141101.
 8. Sabath DE. Minimal residual disease. *Leuk Lymph* 2018; 1 (35).
 9. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J* 2017; 7 (6): e577. doi: 10.1038/bcj.2017.53.
 10. Tan SH, Bertulfo FC, Sanda T. Leukemia-initiating cells in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Front Oncol* 2017; 7: 218. doi: 10.3389/fonc.2017.00218.
 11. Fattizzo B, Rosa J, Giannotta JA, Baldini L, Fracchiolla NS. The pathophysiology of T-cell acute lymphoblastic leukemia: Focus on molecular aspects. *Front Oncol* 2020; 10: 273. doi: 10.3389/fonc.2020.00273.
 12. Genescà E, Morgades M, Montesinos P, Barba P, Gil C, Guàrdia R, et al. Unique clinico-biological, genetic and prognostic features of adult early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2020; 105 (6): e294-7. doi: 10.3324/haematol.2019.225078.
 13. Heikamp EB, Pui C-H. Next-generation evaluation and treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr* 2018; 203: 14-24.e2. doi: 10.1016/j.jpeds.2018.07.039.
 14. Sentís I, Gonzalez S, Genescà E, García-Hernández V, Muñoz F, Gonzalez C, et al. The evolution of relapse of adult T cell acute lymphoblastic leukemia. *Genome Biol* 2020; 21 (1): 1-24. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02192-z>.
 15. Iacobucci I, Mullighan CG. Genetic basis of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2017; 35 (9): 975-83. <https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2016.70.7836>.
 16. Van Dongen JJM, Van Der Velden VHJ, Brüggemann M, Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: Need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood* 2015; 125 (26): 3996-4009. doi: 10.1182/blood-2015-03-580027.
 17. Wu J, Jia S, Wang C, Zhang W, Liu S, Zeng X, et al. Minimal residual disease detection and evolved IGH clones analysis in acute B lymphoblastic leukemia using IGH deep sequencing. *Front Immunol* 2016; 7: 403. doi: 10.3389/fimmu.2016.00403.
 18. Del Príncipe MI, De Bellis E, Gurnari C, Buzzati E, Savi A, Consalvo MAI, et al. Applications and efficiency of flow cytometry for leukemia diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2019; 19 (12): 1089-97. <https://doi.org/10.1080/14737159.2019.1691918>.
 19. Azad A, Rajwa B, Pothen A. Immunophenotype discovery, hierarchical organization, and template-based classification of flow cytometry samples. *Front Oncol* 2016; 6: 1-20. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00188>.
 20. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol* 2017; 37 (2): 163-76. doi: 10.3109/07388551.2015.1128876.
 21. Tembhare P, Badrinath Y, Ghogale S, Patkar N, Dhole N, Dalavi P, et al. A novel and easy FxCycle™ violet based flow cytometric method for simultaneous assessment of DNA ploidy and six-color immunophenotyping. *Cytom Part A* 2016; 89 (3): 281-91. doi: 10.1002/cyto.a.22803.
 22. Kalina T, Lundsten K, Engel P. Relevance of antibody validation for flow cytometry. *Cytom Part A* 2020; 97 (2): 126-36. doi: 10.1002/cyto.a.23895.
 23. Belder L, Ferrando A. The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2016; 16 (8): 494-507. doi: 10.1038/nrc.2016.63.
 24. DiGiuseppe JA, Wood BL. Applications of flow cytometric immunophenotyping in the diagnosis and posttreatment monitoring of B and T lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Cytom Part B Clin Cytom* 2019; 96 (4): 256-65. doi: 10.1002/cyto.b.21833.
 25. Dong M, Zhang X, Yang Z, Wu S, Ma M, Li Z, et al. Patients over 40 years old with precursor T-cell lymphoblastic lymphoma have different prognostic factors comparing to the youngsters. *Sci Rep* 2018; 8 (1): 1-7. doi: 10.1038/s41598-018-19565-x.
 26. Sun J, Wang L, Liu Q, Tárnok A, Su X. Deep learning-based light scattering microfluidic cytometry for label-free acute lymphocytic leukemia classification. *Biomed Opt Express* 2020; 11 (11): 6674. <https://doi.org/10.1364/BOE.405557>.
 27. Loghavi S, Kutok JL, Jorgensen JL. B-acute lymphoblastic leukemia/lymphoblastic lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2015; 144 (3): 393-410. <https://doi.org/10.1309/AJCPAN7BH5D-NYWZB>.
 28. Noronha EP, Codeço Marques LV, Andrade FG, Santos Thuler LC, Terra-Granado E, Pombo-De-Oliveira MS. The profile of immunophenotype and genotype aberrations in subsets of pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Front Oncol* 2019; 9: 1-10. doi: 10.3389/fonc.2019.00316.
 29. Rocha JMC, Xavier SG, Souza ME de L, Murao M, de Oliveira BM. Comparison between flow cytometry and standard PCR in the evaluation of MRD in children with acute lymphoblastic leukemia treated with the GBTLI LLA-2009 protocol. *Pediatr Hematol Oncol* 2019; 36 (5): 287-301. doi: 10.1080/08880018.2019.1636168.

30. Rytting ME, Jabbour EJ, O'Brien SM, Kantarjian HM. Acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults. *Cancer* 2017; 123 (13): 2398-403. doi: 10.1089/jayao.2021.0033.
31. Ministerio de salud y Protección Social. Guía de práctica clínica para la detección, tratamiento y seguimiento de leucemias linfoblásticas y mieloide en población mayor de 18 años. *Circulation* 2017; 126: 37.
32. Wu J, Jia S, Wang C, Zhang W, Liu S, Zeng X, et al. Minimal residual disease detection and evolved IGH clones analysis in acute B lymphoblastic leukemia using IGH deep sequencing. *Front Immunol* 2016; 7: 403. doi: 10.3389/fimmu.2016.00403.
33. Keegan A, Charest K, Schmidt R, Briggs D, Deangelo DJ, Li B, et al. Flow cytometric minimal residual disease assessment of peripheral blood in acute lymphoblastic leukaemia patients has potential for early detection of relapsed extramedullary disease. *J Clin Pathol* 2018; 1-6. doi: 10.1136/jclinpath-2017-204828.
34. Fossat C, Roussel M, Arnoux I, Asnafi V, Brouzes C, Garnache-Ottou F, et al. Methodological aspects of minimal residual disease assessment by flow cytometry in acute lymphoblastic leukemia: A french multicenter study. *Cytom Part B - Clin Cytom* 2015; 88 (1): 21-9. doi: 10.1002/cyto.b.21195.
35. Thulasi Raman R, Anurekha M, Lakshman V, Balasubramaniam R, Ramya U, Revathi R. Immunophenotypic modulation in pediatric B lymphoblastic leukemia and its implications in MRD detection. *Leuk Lymphoma* 2020; 61 (8): 1974-80. <https://doi.org/10.1080/10428194.2020.1742902>.
36. Ravandi F, Jorgensen JL, O'Brien SM, Jabbour E, Thomas DA, Borthakur G, et al. Minimal residual disease assessed by multi-parameter flow cytometry is highly prognostic in adult patients with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2016; 172 (3): 392-400. doi: 10.1111/bjh.13834.
37. Li HF, Meng WT, Jia YQ, Jiang NG, Zeng TT, Jin YM, et al. Development-associated immunophenotypes reveal the heterogeneous and individualized early responses of adult B-acute lymphoblastic leukemia. *Med (United States)* 2016; 95 (34). doi: 10.1097/MD.0000000000004128.
38. Li SQ, Fan QZ, Xu LP, Wang Y, Zhang XH, Chen H, et al. Different effects of pre-transplantation measurable residual disease on outcomes according to transplant modality in patients with Philadelphia chromosome positive ALL. *Front Oncol* 2020; 10 1-13. doi: 10.3389/fonc.2020.00320.
39. Keeney M, Hedley BD, Chin-Yee IH. Flow cytometry—Recognizing unusual populations in leukemia and lymphoma diagnosis. *Int J Lab Hematol* 2017; 39: 86-92. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12666>.
40. Marsán-Suárez V, Macías-Abraham C, Díaz-Domínguez G, Morales-Garrido Y, Lam-Díaz RM, Machín-García S, González-Otero A, et al. Expresión del antígeno CD45 en la Leucemia Linfocítica aguda pediátrica. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2017; 33 (2).
41. Wood BL. Principles of minimal residual disease detection for hematopoietic neoplasms by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2016; 90 (1): 47-53. doi: 10.1002/cyto.b.21239.
42. Chatterjee T, Mallhi RS, Venkatesan S. Minimal residual disease detection using flow cytometry: Applications in acute leukemia. *Med J Armed Forces India* 2016; 72 (2): 152-6. doi: 10.1016/j.mjafi.2016.02.002.
43. Chen X, Wood BL. Monitoring minimal residual disease in acute leukemia: Technical challenges and interpretive complexities. *Blood Rev* 2017; 31 (2): 63-75. doi: 10.1016/j.blre.2016.09.006.
44. Wenzinger C, Williams E, Gru AA. Updates in the pathology of precursor lymphoid neoplasms in the Revised Fourth Edition of the WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. *Curr Hematol Malig Rep* 2018; 13 (4): 275-88. doi: 10.1007/s11899-018-0456-8.
45. Xia M, Zhang H, Lu Z, Gao Y, Liao X, Li H. Key markers of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2016; 38 (6): 418-22. doi: 10.1097/MPH.0000000000000624.
46. Popov A, Henze G, Verzhbitskaya T, Roumiantseva J, Lagoyko S, Khlebnikova O, et al. Absolute count of leukemic blasts in cerebrospinal fluid as detected by flow cytometry is a relevant prognostic factor in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol* 2019; 145 (5): 1331-9. doi: 10.1007/s00432-019-02886-3.
47. McShane LM, Smith MA. Prospects for minimal residual disease as a surrogate endpoint in pediatric acute lymphoblastic leukemia clinical trials. *JNCI Cancer Spectrum* 2018; 2 (4): pky070. <https://doi.org/10.1093/jncics/pky070>.
48. Karawajew L, Dworzak M, Ratei R, Rhein P, Gaipa G, Buldini B, et al. Minimal residual disease analysis by eight-color flow cytometry in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2015; 100 (7): 935-44. doi: 10.3324/haematol.2014.116707.
49. Bruggemann M, Kotrova M. Minimal residual disease in adult ALL: Technical aspects and implications for correct clinical interpretation. *Blood Adv* 2017; 1 (25): 2456-66. doi: 10.1182/asheducation-2017.1.13.
50. Walter RB, Gooley TA, Wood BL, Milano F, Fang M, Sorrow ML, et al. Impact of pretransplantation minimal residual disease, as detected by multiparametric flow cytometry, on outcome of myeloablative hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2011; 29 (9): 1190-7. doi: 10.1200/JCO.2010.31.8121.
51. Gökbüget N. How should we treat a patient with relapsed Ph-negative B-ALL and what novel approaches are being investigated? *Best Pract Res Clin Haematol* 2017; 30 (3): 261-74. doi: 10.1016/j.beha.2017.07.010.
52. Tembhare PR, Narula G, Khanka T, Ghogale S, Chatterjee G, Patkar NV, et al. Post-induction measurable residual disease using multicolor flow cytometry is strongly predictive of inferior clinical outcome in the real-life management of childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: A study

- of 256 patients. *Front Oncol* 2020; 10: 577. doi: 10.3389/fonc.2020.00577.
53. Schrappe M. Detection and management of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Hematol (United States)* 2014; 2014 (1): 244-9. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2014.1.244>.
54. Kruse A, Abdel-Azim N, Kim HN, Ruan Y, Phan V, Ogana H, et al. Minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Int J Mol Sci* 2020; 21 (3). doi: 10.3390/ijms21031054.
55. Abou Dalle I, Jabbour E, Short NJ. Evaluation and management of measurable residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Ther Adv Hematol* 2020; 11: 204062072091002. doi: 10.1177/2040620720910023.
56. Hoelzer D, Bassan R, Dombret H, Fielding A, Ribera JM, Buske C, et al. Acute lymphoblastic leukaemia in adult patients: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2016; 27: v69-82. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw025>.
57. Pui C-H, Pei D, Raimondi SC, Coustan-Smith E, Jeha S, Cheng C, et al. Clinical impact of minimal residual disease in children with different subtypes of acute lymphoblastic leukemia treated with Response-Adapted therapy. *Leukemia* 2017; 31 (2): 333-9. doi: 10.1038/leu.2016.234.
58. Campana D, Pui C. Evidence-based focused review minimal residual disease – guided therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia case presentations. *Blood* 2017; 129 (14): 1913-9. doi: 10.1182/blood-2016-12-725804.
59. Jabbour E, O'Brien S, Konopleva M, Kantarjian H. New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 2015; 121 (15): 2517-28. doi: 10.1002/cncr.29383.
60. Raetz EA, Teachey DT. T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Hematology* 2016; 2016 (1): 580-8. doi: 10.1182/asheducation-2016.1.580.