

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 Hernandez¹, David Andrés Bernal-Estévez², Claudia Andrea Cruz Baquero³

Resumen

Antecedentes. La citometría de flujo (CMF) es una técnica que permite el análisis multiparamétrico de poblaciones celulares, siendo esencial en la investigación biomédica y como herramienta diagnóstica. Esta técnica rápida tiene una alta sensibilidad, evaluando características en la población de interés como es el caso del tamaño, granularidad, complejidad del citoplasma celular y proteínas de que permiten la clasificación fenotípica y funcional de un gran número de células. Por estas razones, esta técnica ha adquirido importancia en el diagnóstico y seguimiento de enfermedades y anomalías hematológicas, como leucemias, síndromes mielodisplásicos y síndromes mieloproliferativos, entre otras. **Objetivo.** La presente revisión se enfoca en los avances en la implementación de la CMF en la Enfermedad Mínima Residual (EMR) presente en la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), la cual es una población mínima leucémica que se detecta en un paciente después de suministrar un tratamiento oncológico, donde se evalúa su eficacia, el riesgo de una recaída y el proceso de remisión completa. **Metodología.** Se realiza una revisión no sistemática de literatura en bases de datos, de los últimos 15 años, donde evalúen las implicaciones del uso de citometría de flujo en la EMR, de esta revisión se extraen aspectos relevantes al momento de emplear la CMF para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con leucemias. **Resultados.** La CMF es una técnica muy versátil e importante para el diagnóstico y seguimiento de la EMR por su alta sensibilidad para la detección de bajos números de células resistentes a

1. Estudiante de Facultad de Ciencias de la Salud. Programa de Bacteriología y Laboratorio clínico. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

2. Grupo de Investigación en Inmunología y Oncología Clínica, Fundación Salud de los Andes. Bogotá, Colombia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7330-0333>

3. Docente investigadora, Grupo de Investigación REMA, Departamento de Bacteriología. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá, Colombia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1041-9609>

Correspondencia: candreacruz@unicolmayor.edu.co

► <https://doi.org/10.22490/24629448.6593>

Recibido: 17/05/2022
Aceptado: 02/07/2022

la terapia. Adicionalmente se muestra la importancia de la estandarización de protocolos como EUROFLOW para un adecuado procesamiento y análisis clínico de las muestras de pacientes.

Palabras claves: citometría de flujo, neoplasia residual, diferenciación fenotípica, neoplasia hematológica, leucemia.

Abstract

Background. Flow cytometry (FCM) is a technique that allows multiparametric analysis of cell populations, and is essential in biomedical research and as a diagnostic tool. This fast technique has a high sensitivity, evaluating characteristics in the population of interest such as the size, granularity, and complexity of the cell cytoplasm and proteins that allow the phenotypic and functional classification of a large number of cells. For these reasons, this technique has gained importance in the diagnosis and monitoring of diseases and hematological abnormalities, such as leukemia, myelodysplastic syndromes, and myeloproliferative syndromes, among others. **Objective.** This review focuses on advances in the implementation of CMF in Minimal Residual Disease (MRD) present in Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL), which is a minimal leukemic population that is detected in a patient after supplying an oncological treatment, where its efficacy, the risk of relapse and the complete remission process are evaluated. **Methodology.** A non-systematic literature review is carried out in databases, from the last 15 years, where the implications of the use of flow cytometry in EMR are evaluated, and relevant aspects are extracted from this review when using the CMF for the diagnosis and monitoring of patients with leukemia. **Results.** CMF is a very versatile and important technique for the diagnosis and monitoring of EMR due to its high sensitivity for the detection of low numbers of cells resistant to therapy. Additionally, the importance of standardizing protocols such as EUROFLOW for proper processing and clinical analysis of patient samples is shown.

Keywords: flow cytometry, neoplasm residual, phenotypic differentiation, hematological neoplasms, leukemia.

Introducción

Cualquier tipo de cáncer que afecte a la médula ósea (como la leucemia y el linfoma) se considera como 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 de acuerdo con datos de GLOBOCAN y Sivigila en 2020 (1); esta enfermedad se caracteriza por la anormalidad en el proceso de proliferación y diferenciación celular a nivel del linaje linfóide o mieloide, siendo aguda o crónica de acuerdo a la etapa en la que se encuentra (2-5). La leucemia es una enfermedad que se puede clasificar en leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica (LLC) y leucemia mieloide crónica (LMC) (6). Sin embargo, la LLA tiene una especial relevancia clínica y diagnóstica puesto que se trata de una neoplasia maligna con un reporte en el Boletín Epidemiológico Semanal del Instituto Nacional de Salud del 75 % en población pediátrica (2) y un 20 % en población adulta (7), con una recaída reportada entre el 40-55 % de los pacientes en proceso de remisión (2, 3).

La LLA es una enfermedad heterogénea de células neoplásicas del sistema hematopoyético (2, 7) con ciertas propiedades celulares que permiten su diferenciación y clasificación, las cuales incluyen tamaño, granularidad, proteínas membranales y citoplasmáticas y complejidad del citoplasma

celular, entre otros. Dichas características favorecen su detección por métodos altamente específicos, sensibles, reproducibles y aplicables como es 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). Estas técnicas se implementan de diferentes formas para el diagnóstico y seguimiento terapéutico de la leucemia aguda, la cual en el año 2020 reportó 893 casos pediátricos (54.3 % de todos los casos) (1). En el proceso de tratamiento y seguimiento de pacientes con LLA, es importante definir la efectividad de la terapia, la cual puede no ser efectiva para destruir todas las células leucémicas. La aparición de células blásticas con una baja frecuencia es la causante de recaídas de la enfermedad. Dada esta baja frecuencia se denomina Enfermedad Mínima Residual (EMR) a esta aparición de células blásticas por debajo del 5 % en médula ósea (MO) (8), haciéndolas difíciles de detectar por técnicas tradicionales como frotis de sangre periférica y médula ósea, lo cual ha llevado a considerar nuevos métodos más sensibles para su detección.

En tal sentido, se realizó una recopilación de información publicada con el fin de profundizar sobre el rol de los inmunofenotipos detectables por el método de citometría de flujo (CMF), teniendo en cuenta los dife-

rentes parámetros de calidad como el factor de impacto (IF >3) y el cuartil (Q1, Q2, Q3 o Q4), los cuales se calculan empleando la página Bioxbio y SCImago respectivamente. Con estos datos se seleccionó la literatura producida durante el periodo de enero de 2011 a mayo de 2022, utilizando las palabras clave: “Enfermedad mínima residual” y “Leucemia linfoblástica aguda” o sólo “enfermedad mínima residual” o “Citometría de flujo para detección de enfermedad mínima residual” y “Métodos de diagnóstico de enfermedad mínima residual”. Finalmente se seleccionaron 70 referencias bibliográficas para su análisis y se gestionaron en formato PDF utilizando Mendeley como software de gestión de referencias.

Generalidades

El término de enfermedad mínima residual (EMR) (MRD, por sus siglas en inglés) surgió en la década de 1980, cuando se usó por primera vez para su detección la microscopia de inmunofluorescencia, que permitió el monitoreo de disminución y recrecimiento de células malignas en pacientes diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda (LLA), este reconocimiento de células emergentes hace 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 desarrollo de nuevas técnicas como la CMF, hace posible la

identificación de esta población aberrante con una sensibilidad de 10^{-3} a 10^{-5} y una aplicabilidad >90% tanto en el linaje B (LLA-B) y linaje T (LLA-T), ayudando a establecer la etapa de diferenciación/madurez celular y dando lugar la clasificación o estratificación de riesgo de recaída como bajo (0 %), riesgo normal (47 %) y riesgo alto (94 %), donde la persistencia $>10^{-4}$ de linfoblastos neoplásicos hace referencia a enfermedad mínima residual (EMR) positivo (9, 16–19).

El método de CMF es fundamental en la determinación de la presencia o ausencia de células neoplásicas, dando como resultado una EMR positiva o negativa, el principio que emplea es la identificación de características ópticas y de fluorescencia de células marcadas con anticuerpos acoplados a moléculas fluorescentes. Un equipo convencional de CMF está conformado por tres sistemas: (i) sistema de fluidos (transporte de las células a través de una solución salina tamponada con fosfato); (ii) sistema óptico (Transmisión de la dispersión de luz, luz emitida por los fluorocromos y filtro de longitudes de onda); y (iii) sistema electrónico/digital (detección y procesamiento de señales) (18, 20, 21). Los sistemas altamente sensibles y la especificidad en el análisis celular con el uso de anticuerpos monoclonales fluoromarcados asociados a una alta velocidad de recolección y análisis de un gran número de células ayuda al análisis clínico que permite

predecir una recaída, y así tomar decisiones terapéuticas como intensificar el tratamiento si el paciente así lo requiere. En ese marco, la introducción de este método propició el empleo de diferentes principios inmunológicos, biológicos y físicos, favoreciendo la innovación por medio del empleo de paneles de anticuerpos monoclonales y fluorocromos como marcadores inmunológicos esenciales en la identificación precisa de poblaciones de células hematopoyéticas cancerígenas (18–22) y permitiendo la aparición de la inmunofenotipificación moderna, capaz de detectar múltiples parámetros en una sola célula, es así como la CMF se ha convertido en un paso crucial en el diagnóstico de la EMR en LLA (18).

La mayoría de los anticuerpos que son utilizados en CMF, están dirigidos contra antígenos específicos expresados en la superficie celular, proteínas de membrana o intracitoplasmáticas, adicionalmente, permite evaluar estados de fosforilación, contenido de DNA (para determinar fase del ciclo celular), entre otras muchas opciones (22–24). La LLA exhibe típicamente inmunofenotipos de células precursoras, se clasifican principalmente en dos subtipos LLA-T (CD3+) y LLA-B (CD19/CD20+) (25), de esta forma, la detección de la EMR por CMF en un análisis de 1 célula leucémica por 105 leucocitos (26, 27) donde la expresión de antígenos como CD10, CD3, CD7, CD19, CD20, CD34, CD38, CD45, cCD3+ y TdT en células leucémicas puede predecir la aparición

de la EMR (24, 27–29). 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 durante los 2 años posteriores al diagnóstico, con una tasa de supervivencia inferior del 25% (9, 10, 25, 30). Por esta razón, 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 EMR. Dichos paneles se seleccionan de acuerdo con la historia clínica del cada paciente y la morfología presentada en un frotis de médula ósea (MO) (21), con el fin de encontrar una línea fenotípica acertada; sin embargo, hay paneles como CD34+, CD45 bajo y TdT+ que siempre se deben utilizar ya que resaltan la presencia de una población de blastos en la muestra estudiada (24).

Muestras óptimas

La muestra de médula ósea (MO) es la más utilizada para el diagnóstico, clasificación y detección de la EMR en la LLA (10, 16, 17, 25–27, 31); sin embargo, estudios realizados usando sangre periférica, lo cual, demostraron que los niveles de EMR en sangre en pacientes diagnosticados con LLA-T eran compatibles o 1 log más bajo que en MO y en pacientes con LLA-B se detectaron en sangre 1 a 3 log más bajos que en MO (16, 17, 31–33). En consecuencia, lo más conveniente para monitorear la enfer-

medad mínima residual independiente del origen T o B, es la muestra de médula ósea o aspirado medular, donde se recomienda recolectar un volumen entre 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, 34). La muestra de MO debe ser obtenida 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 (35), ésta se debe recolectar en un tubo lila con EDTA (etilendiaminotetraacético) que actúa como quelante de calcio y de esta manera como anticoagulante (17, 21, 34, 36) para posteriormente ser conservadas a temperatura ambiente. De acuerdo con el protocolo, estas muestras se deben incubar 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 incubar con los respectivos fluorocromos (34–40).

También se puede realizar una lisis osmótica de los hematíes y sus lavados pertinentes para concentrar un número mínimo de 500.000 células nucleadas de la muestra en la que se requieran recuentos celulares con bajo nivel de detección por el citómetro, de esta manera detallar la presencia y la cantidad de células neoplásicas en la muestra antes de su marcaje inmunofluorescente (bulk

lysis del Grupo EuroFlow) logrado por la eliminación de interferencias provocadas por los hematíes facilitando una mejor adherencia de los anticuerpos y sus respectivos fluorocromos a las células de interés, aumentando la sensibilidad en la técnica de citometría de flujo para el pronóstico y seguimiento de la EMR (41–44). Tener en cuenta, los casos en que la muestra sea difícil realizar lisis o exista una contaminación en la muestra por células necróticas, estromales o de grasa pueda interferir con la interpretación de los resultados como un líquido cefalorraquídeo; la separación o enriquecimiento celular por gradiente de densidad es una buena opción (41, 42). Sin embargo, existen muchas soluciones de lisis como la FACS Lysis, QuickLysis, VersaLyse, entre otros que están siendo investigados y evaluados para su utilización en el mercado (45).

Análisis de citometría de flujo

El estudio de cada muestra se analiza mediante una combinación de anticuerpos y colorantes de viabilidad (intercalantes de DNA o ligandos de proteínas asociadas a apoptosis), la combinación de la expresión de diferentes marcadores en células viables permite diferenciar las células normales de las anormales y definir así su frecuencia (38). Dada la baja frecuencia de las células anormales en la EMR se requiere una relación señal-ruido (intensidad de marcación de las poblaciones) alta para permitir

la separación completa de las poblaciones anormales de baja frecuencia de las células normales de inmunofenotipo similar (40).

En el proceso de análisis se inicia con una exclusión de células no viables y detritos celulares para disponer de una población de blastos encontrada en las regiones seleccionados (*gates*) y pasar a la caracterización inmunofenotípica de acuerdo con la presencia de antígenos celulares determinados por la

unión de anticuerpos específicos a los antígenos presentes y la excitación de los fluorocromos utilizados como FITC (isotiocianato de fluoresceína), PE (ficoeritrina), APC (aloficocianina), entre otros (40) acoplados a dichos anticuerpos. Dando como partida la comparación entre el marcador CD45 y granulosidad celular (SSC) para diferenciar las células blásticas maduras e inmaduras que se encuentran en la médula ósea (24, 28, 38, 39), Figura 1.

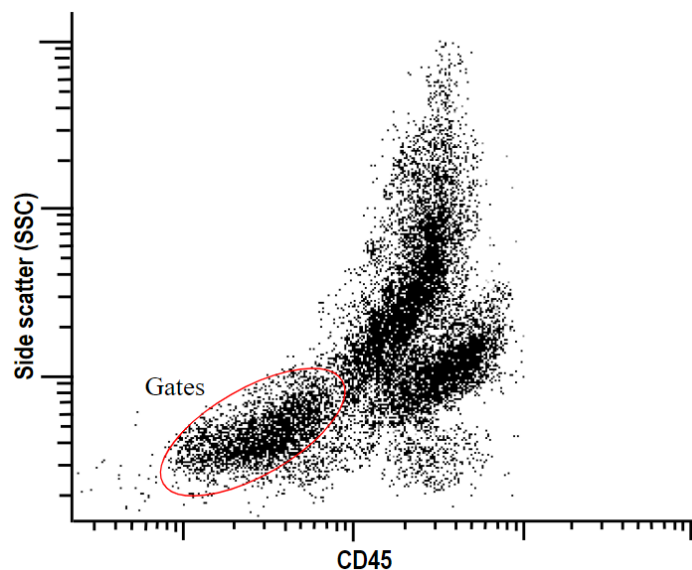


Figura 1. Gráfica de dispersión de puntos (Dotplot) entre los parámetros de SSC y CD45 en la muestra de MO total.

Fuente. Autores.

Otros marcadores útiles para identificar poblaciones de linfoblastos son CD34, CD10, CD20 y CD79a que se expresa en una gran mayoría de casos de LLA-B comparado con los casos de LLA-T (24, 46–49); el marcador CD4 se puede usar en casos con expresión débil o negativa de la expresión de TdT

(46). Dado que el TdT y CD19 se encuentra positivo en al menos el 95 % de los casos de leucemia linfoblástica B y en una menor proporción de leucemia linfoblástica T (24, 48, 49). Estos inmunofenotipos característicos son esenciales en la detección de LLA-B (Tabla 1), por ende, son primordia-

les en la identificación de poblaciones mínimas de EMR ya que poseen una relación de expresión aumentada frente a la mayoría de

los precursores de células B normales inmaduras, figura 2.

Tabla 1. Principales marcadores inmunológicos presentes en la leucemia linfoblástica.

Marcadores inmunológicos	LLA-B	LLA-T
CD20	+	-
CD10	+	-
CD19	+	+
CD79a	+	-
CD45	+/-	+
CD34	+	+
CD58	+	-
CD22	+	-
CD20	+	-
HLA-DR	+	+
TdT	+	+/-
CD5	-	+
CD7	-	+
CD99	-	+
CD3	-	-
cCD3	-	+

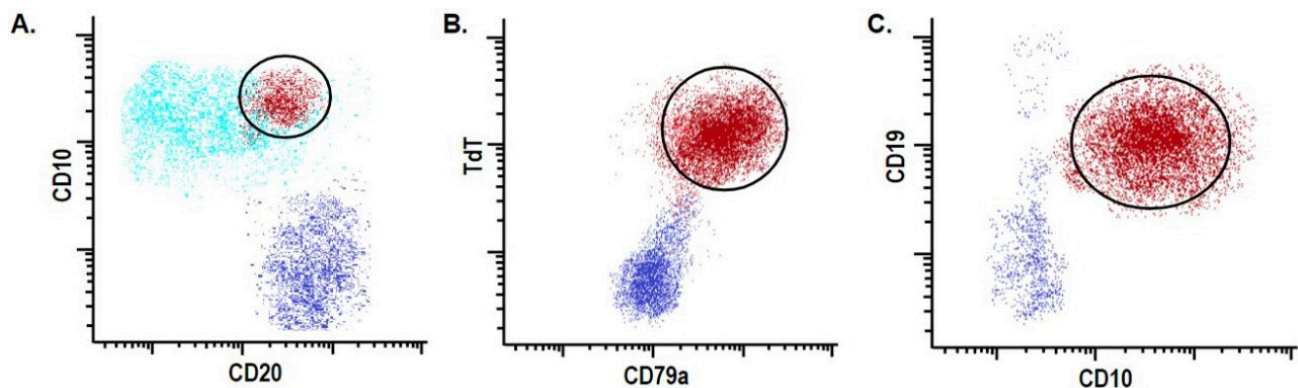


Figura 2. Gráfica de dispersión de puntos que muestran la expresión de inmunofenotipos en linfoblastos leucémicos de linaje B en MO total con CD10+, CD20+ (Panel A), CD79a+ y TdT+ (Panel B), CD19+ y CD10+ (Panel C) presentes en la EMR.

En cuanto a la determinación de EMR 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 (24,38,47,48), tabla 1. Sin embargo, la presencia 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 3.

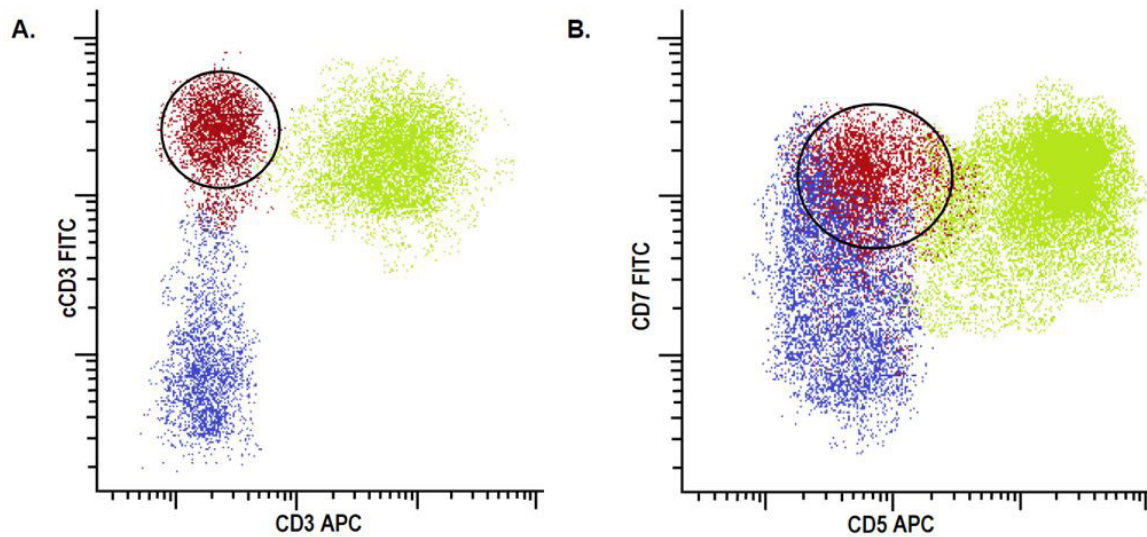


Figura 3. Grafica de dispersión de puntos que muestran la expresión de inmunofenotipos en linfoblastos leucémicos de linaje T en MO total con expresión de cCD3+, CD3- (Panel A), CD7+ y CD5- (Panel B) presentes en la EMR.

Este enfoque de reconocimiento de marcadores inmunológicos (tabla 1) en LLA proporciona facilidad para el desarrollo de estandarización en el método de citometría de flujo que beneficien el diagnóstico y la detección de EMR. De esta forma, se destacan combinaciones de anticuerpos como TdT/CD10/CD34/CD19, CD7/CD3/CD5/CD45 y CD38/CD10/CD3/CD19 (49,50) que son altamente efectivos en casos evaluados para remisión.

Importancia clínica de EMR

La detección de EMR es un factor pronóstico que identifica y permite estratificar los pacientes con alto, mediano o bajo riesgo de fracaso y efectos del tratamiento, y de esta forma dirigir una terapia adecuada (47, 51, 52). Adicionalmente, la detección de

EMR sirve 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 EMR+ que son asociados a un mal pronóstico (51).

Desde una perspectiva clínica, es necesario reconocer el nivel de sensibilidad que puede ser detectada por citometría de flujo para la estratificación del riesgo y mantener una relación entre el protocolo de terapéutico con la tasa de respuesta, de esta forma se debe proporcionar una atención eficiente para evitar recaídas (16, 35, 53). La sensibilidad para la estratificación del riesgo (tabla 2) tiene diferentes niveles (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) los cuales están correlacionados con una tasa de recaída donde incluso un nivel bajo de ERM se asoció con un resultado des-

favorable, esto se puede manifestar con la presencia de > 5% de linfoblastos por mor-

fología o evidencia de enfermedad extramedular (54–56).

Tabla 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	(46, 51, 52, 55–60).
$\geq 10^{-3}$	Riesgo Normal	
$\geq 10^{-4}$ y $\geq 10^{-5}$	Riesgo Bajo	

Así mismo, el riesgo normal se va a estratificar a los pacientes con una EMR $\leq 10^{-2}$ (<0,1%) en el día 15 del tratamiento suministrado; cualquier paciente que tenga mayor de 10% de blastos leucémicos detectados por citometría de flujo en el día 15 de tratamiento se clasifica en el grupo de alto riesgo de recaída, de igual forma, la presencia de EMR en $\geq 10^{-3}$ (0,1 %) en el día 33 y continúe su detección en el día 78 por lo que se clasifican en el grupo de alto riesgo y serán monitoreados después de cada modificación en el tratamiento (47, 53, 54, 56–58, 60).

Por esto, conocer los inmunofenotipos y estratificar cada caso de recaída por presencia de concentraciones mínimas de linfoblastos neoplásicos hace que se establezca tratamientos indicados para cada paciente y llegar a una remisión completa. Dado a la estandarización de algunos anticuerpos que expresan estas células en la mayoría de los pacientes, la inmunoterapia es una opción muy exitosa ya que se puede combinar con la radioterapia y quimioterapia (9). Sin embargo, la persistencia de la EMR después del

tratamiento por quimioterapia intensiva es indicativa de la recaída al tratamiento y justifica enfoques terapéuticos alternativos que incluyen el trasplante alogénico de células madre, blinatumomab o terapias en investigación como inotuzumab ozogamicina o células T receptoras de antígenos quiméricos (CAR-Ts); es probable que estos agentes desempeñen un papel cada vez mayor en la erradicación de la EMR (9, 53, 59).

Los pacientes con mayor riesgo de recaída deben recibir una terapia adaptada a este riesgo, como los anticuerpos de doble especificidad blinatumomab los cuales 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 el que las propias células T de un paciente están modificadas genéticamente para expresar un receptor quimérico que les permite reconocer las células leucémicas, lo que induce una respuesta inmunitaria antileucémica (9, 53, 55, 59–64). También, el conjugado anticuerpo anti-CD22-fármaco

Inotuzumab Ozogamicina que se unen a las células leucémicas, se internalizan y liberan una citotoxina que destruye la célula leucémica (53, 55, 59, 60, 63), Figura 4. Por el contrario, los pacientes con menor riesgo de

recaída pueden beneficiarse de la reducción del tratamiento, lo que potencialmente ahorra de tratamientos innecesarios y toxicidades relacionadas (9, 53, 61–64).

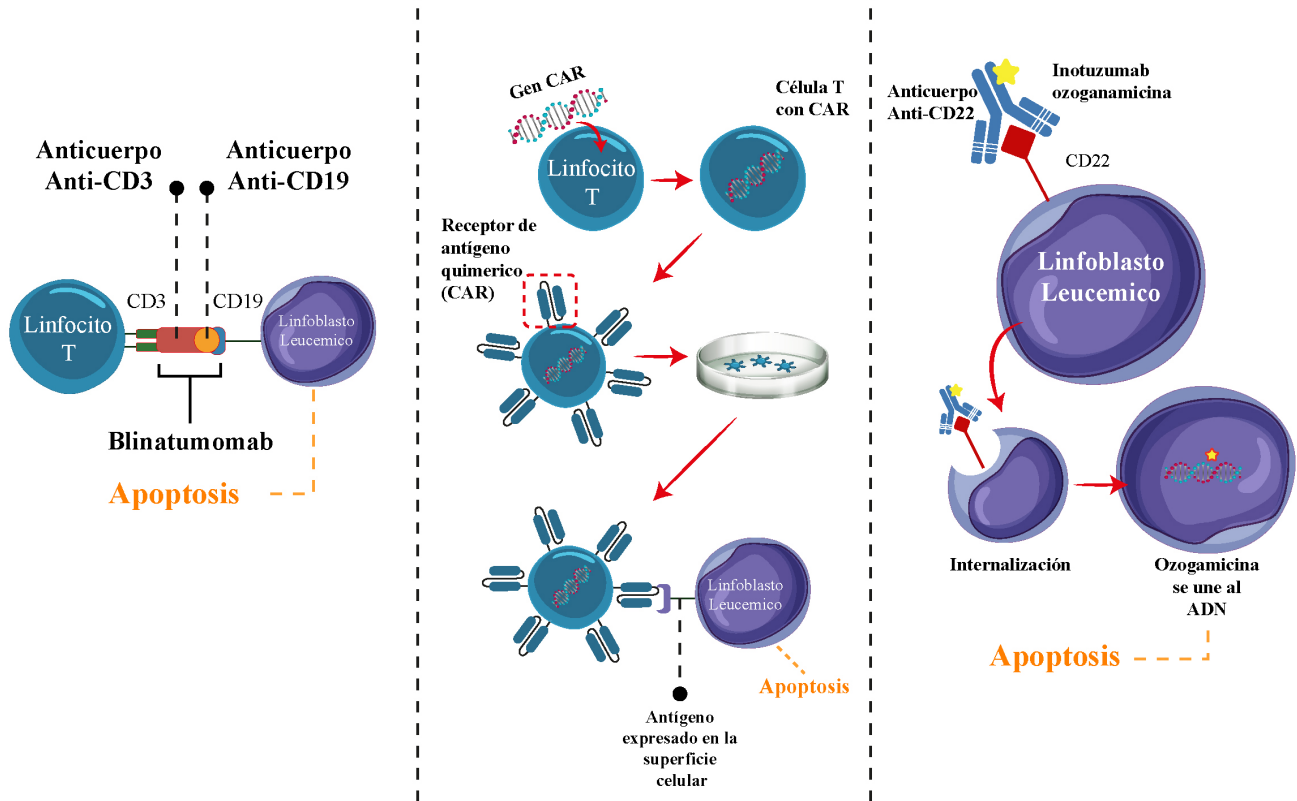


Figura 4. Mecanismos de terapias en pacientes diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda. Blinatumomab se une al anticuerpo monoclonal biespecíficos (CD3 y CD19) que activa los linfocitos T provocando apoptosis al linfoblasto leucémico (Panel A). Linfocitos T modificados genéticamente para expresar el receptor de antígeno quimérico (CAR) que reconoce células leucémicas (Panel B). Conjugado anticuerpo anti-CD22-fármaco Inotuzumab Ozogamicina que conduce a la apoptosis del linfoblasto leucémico (Panel C).

Después de proporcionar el tratamiento adecuado, se debe lograr una remisión completa que requiere la presencia de hematopoyesis de las tres líneas celulares (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) con <5% de blastos en la muestra de médula ósea y recuperación celular en el hemograma periférico con ausencia de blastos circulantes tanto en

pacientes pediátricos como adultos, la recuperación de estos factores se asocia con una tasa de supervivencia alta (35, 55, 59).

Avances tecnológicos

La introducción de diferentes tecnologías en la citometría de flujo de color hace que

se acerque a la estandarización de esta técnica, ampliando la inmunofenotipificación de diferentes líneas celulares dando una mayor especificidad en la detección y monitoreo de anomalías hematológicas. Desde este objetivo, se crea el Consorcio EuroFlow en el año 2006, protocolo operativo estándar que utiliza un mínimo de paneles de 8 o más colores que permite el uso de marcadores de columna dirigidos a una población celular de interés y marcadores de anticuerpos de dichas células (42, 45, 65–69), tabla 3, estos se fusionan a las herramientas de señales detectados por las diferentes ópticas

del sistema y cálculos de expresión del inmunofenotipo para caracterizar las células en estudio (42, 45, 65). Los instrumentos donde se usa este consorcio deben equiparse con láseres azul (488 nm), violeta (405 nm) y rojo (633–640 nm) y al menos dos a cuatro detectores para cada línea de excitación para lograr el ajuste estandarizado de valores de cada fluorocromo a utilizar; esto es importante ya que existen muchos citómetros que cuentan con estas características, lo cual, hace que potencialmente pudiese implementarse fácilmente en laboratorios de diagnóstico (45, 65).

Tabla 3. Panel del grupo EuroFlow de 8 Anticuerpos estandarizados.

LLA-B	CD45	CD10	CD20	CD34	CD19	CD38	CD123	CD79a
LLA-T	CD45	TdT	CD7	CD3 Citoplasmático	CD3 superficie	CD34	CD99	CD5
Opcional	CD58	CD66c	CD15	CD13	CD33	CD73	CD304	CD81

Cytognos, empresa de biotecnología en España dedicada a diseñar, desarrollar y comercializar reactivos, dispositivos y software para laboratorios de citometría de flujo para mejorar la eficiencia en el diagnóstico y así mejorar la atención al paciente, este cuenta con un catálogo extenso que contiene desde soluciones de lisis y anticuerpos individuales hasta paneles estandarizados de EuroFlow para diversas enfermedades oncohematológicas y también para investigaciones (67, 68, 70), Tabla 4. También en colaboración de EuroFlow, ayuda a los laboratorios a cumplir

todas las necesidades del laboratorio desde la preparación de la muestra hasta la automatización del citómetro con el análisis de los datos y evaluando la calidad de cada reactivo e instrumento implementado en esta técnica, el cual, ayudo a la creación de una metodología totalmente estandarizada con una alta reproducibilidad entre los laboratorios. A partir de la alianza con EuroFlow, Cytognos implemento un citómetro de flujo Omnicyt CE-IVD que combina la precisión, rendimiento y reproducibilidad para el análisis celular que se complementa con el softwa-

re Infinicyt, herramienta para el análisis multidimensional confiable y eficiente que se acopla a muchos de los anticuerpos

y fluorocromos de uso importante como los paneles de EuroFlow (67, 68).

Tabla 4. Tubo de orientación de Leucemia Aguda (ALOT) con los fluorocromos recomendado por Cytognos (A). Panel de EMR en leucemia linfoblástica aguda de células B precursoras (BCP-ALL MRD) realizada en colaboración de EuroFlow con Cytognos (B).

A								
Anticuerpos	CyCD3	CD45	CyMPO	CyCD79a	CD34	CD19	CD7	SmCD3
Fluorocromo	Pacific Blue	OC515	FITC	PE	PerCP	PE-Cyanine7	APC	APC-C750
B								
Anticuerpos Tubo 1	CD20	CD45	CD81	CD66c + CD123	CD34	CD19	CD10	CD38
Anticuerpos Tubo 2	CD20	CD45	CD81	CD73 + CD304	CD34	CD19	CD10	CD28
Fluorocromo	Pacific Blue	OC515	FITC	PE	PerCP	PE-Cyanine7	APC	APC-C750

Fuente: CYT-ALOT Acute Leukemia Orientation Tube. Cytognos (2022) y CYT-BCP-ALL-MRD, B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Minimal Residual Disease (2022).

Conclusión

Los principales obstáculos para la detección de EMR es la detección baja de linfoblastos leucémicos por métodos convencionales, y la necesidad de una experiencia técnica, los cuales, disminuyen con el uso de la citometría de flujo, que se basa en la identificación de características inmunofenotípicas de la leucemia y su fácil interpretación para lograr un análisis exhaustivo de células individuales para fortalecer la capacidad de reconocer pequeñas subpoblaciones normales y neoplásicas.

A medida que aumenta la sensibilidad y especificidad en la detección de EMR, se ha favorecido la estratificación de riesgo y pronósticos de recaída durante y después del tratamiento oncológico, esto es de suma im-

portancia clínica, especialmente para pacientes con EMR en donde la población adulta presenta una tasa de supervivencia baja, al direccionar los esfuerzos hacia un tratamiento adecuado y lograr una remisión completa. Desde el pilar fundamental para el diagnóstico y seguimiento a través de la inmunofenotipificación se ha avanzado en paneles de anticuerpos estandarizados para lograr una mejor detección de la enfermedad mínima residual que conduce a la creación de protocolos con altos niveles de reproducibilidad por medio de EuroFlow que sigue siendo un desafío pero que cada vez se acerca a ser completamente estandarizado.

Existen mejoras en los diversos paneles proporcionados por EuroFlow, OneFlow, Cytognos, BD con resultados similares que

brinda más posibilidades al laboratorio a acceder a cualquiera de estos sin afectar la detección y orientación en el diagnóstico, el cual, el paso clave y requisito previo fue la selección de los anticuerpos y fluorocromos apropiados para el desarrollo de los paneles de 8 o más colores, teniendo en cuenta que los marcadores primordiales tanto para LLA-T y LLA-B son CD45, CD19, CD20, CD34. Además, de una recopilación de datos experimentales, literatura enfocada en los inmunofenotipos expresados y el reto de implementarlo en cualquier citómetro de flujo, es el pilar fundamental para el avance continuo en los paneles creados, el cual, el pionero es el Consorcio EuroFlow que estandarizó muchos de los paneles que se usan actualmente y es aplicable en 98 % de los pacientes con sensibilidad mayor de detección de la EMR.

Referencias

1. Instituto Nacional de Salud. Comportamiento epidemiológico de cáncer en menores de 18 años , periodo 2015 a 2020 , Colombia [Internet]. Boletín Epidemiológico Semanal. 2021. Available from: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2021_Boletin_epidemiologico_semana_5.pdf
2. Villalba Toquica C del P, Martínez Silva 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)* [Internet]. 2016;49(1):17–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rcpe.2016.01.002>
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* [Internet]. 2017;21(4):212–24. Available from: <https://www.revistacancercol.org/index.php/cancer/article/view/182>
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* [Internet]. 2016;127(20):2391–405. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/127/20/2391/35255/The-2016-revision-to-the-World-Health-Organization>
5. Grimwade LF, Fuller KA, Erber WN. Applications of imaging flow cytometry in the diagnostic assessment of acute leukaemia. *Methods* [Internet]. 2017;112:39–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.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* [Internet]. 2017;3(7):1–9. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamaoncology/fullarticle/2626509>
7. Moorman A V. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* [Internet]. 2016 Apr;101(4):407–16. Available from: <http://www.haematologica.org/lookup/doi/10.3324/haematol.2015.141101>
8. Sabath DE. Minimal Residual Disease. *Leuk Lymphoma Soc* [Internet]. 2018;(35). Available from: https://www.ills.org/sites/default/files/National/USA/Pdf/Publications/FS35_MRD_Final_2019.pdf
9. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J* [Internet]. 2017;7(6):e577. Available from: <https://www.nature.com/articles/bcj201753>
10. Tan SH, Bertulfo FC, Sanda T. Leukemia-initiating cells in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Front Oncol* [Internet]. 2017;7(SEP). Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2017.00218/full>
11. Fattizzo B, Rosa J, Giannotta JA, Baldini L, Fracchiolla NS. The Physiopathology of T- Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Focus on Molecular Aspects. *Front Oncol* [Internet]. 2020;10(February):1–11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.00273/full>

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* [Internet]. 2020 Jun;105(6):e294–7. Available from: <https://haematologica.org/article/view/9459>
13. Heikamp EB, Pui C-H. Next-Generation Evaluation and Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Pediatr* [Internet]. 2018 Dec;203:14-24.e2. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022347618309442>
14. Sentís I, Gonzalez S, Genescà E, García-Hernández V, Muiños F, Gonzalez C, et al. The evolution of relapse of adult T cell acute lymphoblastic leukemia. *Genome Biol* [Internet]. 2020;21(1):1–24. Available from: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-020-02192-z>
15. Iacobucci I, Mullighan CG. Genetic basis of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* [Internet]. 2017;35(9):975–83. Available from: <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* [Internet]. 2015;125(26):3996–4009. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/125/26/3996/34323/Minimal-residual-disease-diagnostics-in-acute>
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* [Internet]. 2016 Oct 4;7(October):1–11. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00403>
18. Del Principe 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* [Internet]. 2019;19(12):1089–97. Available from: <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* [Internet]. 2016;6(AUG):1–20. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2016.00188/full>
20. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol* [Internet]. 2017;37(2):163–76. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/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* [Internet]. 2016;89(3):281–91. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cyto.a.22803>
22. Kalina T, Lundsten K, Engel P. Relevance of Antibody Validation for Flow Cytometry. *Cytom Part A* [Internet]. 2020;97(2):126–36. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cyto.a.23895>
23. Belver L, Ferrando A. The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2016;16(8):494–507. Available from: <http://dx.doi.org/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* [Internet]. 2019;96(4):256–65. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/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* [Internet]. 2018;8(1):1–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/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* [Internet]. 2020;11(11):6674. Available from: <https://www.osapublishing.org/boe/fulltext.cfm?uri=boe-11-11-6674&id=441886>

27. Loghavi S, Kutok JL, Jorgensen JL. B-acute lymphoblastic leukemia/lymphoblastic lymphoma. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2015;144(3):393–410. Available from: <https://academic.oup.com/ajcp/article/144/3/393/1760791>
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* [Internet]. 2019;9(APR):1–10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2019.00316/full>
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* [Internet]. 2019;36(5):287–301. Available from: <https://doi.org/10.1080/08880018.2019.1636168>
30. Rytting ME, Jabbour EJ, O'Brien SM, Kantarjian HM. Acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults. *Cancer* [Internet]. 2017;123(13):2398–403. Available from: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cncr.30624>
31. Ministerio de salud y Protección Social. Guía de práctica clínica para la detección, tratamiento y seguimiento de leucemias linfoblásticas y mielode en población mayor de 18 años [Internet]. Vol. 126, *Circulation*. 2017. 37 p. Available from: http://gpc.minsalud.gov.co/gpc_sites/Repositorio/Conv_563/GPC_Leucemia_Mayores_18años/LEUCEMIAS - profesionalesDIC29_WEB.pdf
32. 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* [Internet]. 2018;1–6. Available from: <https://jcp.bmj.com/content/71/7/653>
33. 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* [Internet]. 2015;88(1):21–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/cyto.b.21195>
34. 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* [Internet]. 2020;61(8):1974–80. Available from: <https://doi.org/10.1080/10428194.2020.1742902>
35. 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* [Internet]. 2016;172(3):392–400. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bjh.13834>
36. 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)* [Internet]. 2016;95(34). Available from: https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2016/08230/Development_associated_immunophenotypes_reveal_the.18.aspx
37. 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* [Internet]. 2020;10(March):1–13. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.00320/full>
38. Keeney M, Hedley BD, Chin-Yee IH. Flow cytometry—Recognizing unusual populations in leukemia and lymphoma diagnosis. *Int J Lab Hematol* [Internet]. 2017;39(January):86–92. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ijlh.12666>
39. Marsán Suárez V, del Valle Pérez LO, Díaz Domínguez G, Macías Abraham C. Metodología y aplicaciones de la citometría de flujo para el inmunofenotipaje de las leucemias agudas Methodology and applications of flow cytometry for immunophenotyping of acute leukemias. *Rev Cuba Hematol, Inmunol y Hemoter* [Internet]. 2015;31(3):242–53. Available from: <http://scielo.sld.cu>
40. Wood BL. Principles of minimal residual disease detection for hematopoietic neoplasms by flow cytometry. *Cytom Part B - Clin Cytom* [Internet]. 2016;90(1):47–53. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/cyto.b.21239>

41. Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, Van Der Sluijs-Gelling AJ, Gaipa G, Bartels M, et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* [Internet]. 2017;129(3):347–57. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/129/3/347/36021/Standardized-flow-cytometry-for-highly-sensitive>
42. Arriaga-Pizano L, Ramírez-Ramírez D, Prieto-Chávez J, Pelayo R, Ruiz-Argüelles A. Report of the First National Consensus Meeting for Acute Leukemias Immunophenotyping. *Gac México* [Internet]. 2019;155(1):4–10. Available from: https://www.gacetamedicademexico.com/frame_esp.php?id=245
43. Consorcio EuroFlow. Standardized EuroFlow Protocols. EuroFlow [Internet]. 2018;1. Available from: <https://euroflow.org/protocols/>
44. Cytognos SL. Bulklysis™ Para uso diagnóstico in vitro. Cytognos [Internet]. 2022;1. Available from: <https://www.cytognos.com/products/cyt-bl/>
45. Kalina T, Velden VHJ Van Der, Bo S. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. 2012;(January):1986–2010. Available from: <https://www.nature.com/articles/leu2012122>
46. Chatterjee T, Mallhi RS, Venkatesan S. Minimal residual disease detection using flow cytometry: Applications in acute Leukemia. *Med J Armed Forces India* [Internet]. 2016;72(2):152–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mjafi.2016.02.002>
47. Chen X, Wood BL. Monitoring minimal residual disease in acute leukemia: Technical challenges and interpretive complexities. *Blood Rev* [Internet]. 2017;31(2):63–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2016.09.006>
48. 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* [Internet]. 2018;13(4):275–88. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11899-018-0456-8>
49. 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* [Internet]. 2016;38(6):418–22. Available from: https://journals.lww.com/jpho-online/Abstract/2016/08000/Key_Markers_of_Minimal_Residual_Disease_in.2.aspx
50. 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* [Internet]. 2019;145(5):1331–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00432-019-02886-3>
51. McShane LM, Smith MA. Prospects for Minimal Residual Disease as a Surrogate Endpoint in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Clinical Trials. *JNCI Cancer Spectr* [Internet]. 2018;2(4):5–6. Available from: <https://academic.oup.com/jncics/article/2/4/pky070/5253647>
52. 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* [Internet]. 2015;100(7):935–44. Available from: <https://haematologica.org/article/view/7439>
53. Bruggemann M, Kotrova M. Minimal residual disease in adult ALL: Technical aspects and implications for correct clinical interpretation. *Blood Adv* [Internet]. 2017;1(25):2456–66. Available from: <https://ashpublications.org/hematology/article/2017/1/13/21072/Minimal-residual-disease-in-adult-ALL-technical>
54. Walter RB, Gooley TA, Wood BL, Milano F, Fang M, Sorror 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* [Internet]. 2011;29(9):1190–7. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/Irt/2014/421723/>
55. 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* [Internet]. 2017;30(3):261–74. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1521692617300270?via%3Dihub>

56. Tembhare PR, Narula G, Khanka T, Ghogale S, Chatterjee G, Patkar N V., 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* [Internet]. 2020;10(April):1–13. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.00577/full>
57. Schrappe M. Detection and management of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Hematol (United States)* [Internet]. 2014;2014(1):244–9. Available from: <https://ashpublications.org/hematology/article/2014/1/244/20518/Detection-and-management-of-minimal-residual>
58. 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* [Internet]. 2020;21(3). Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/3/1054/htm>
59. Abou Dalle I, Jabbour E, Short NJ. Evaluation and management of measurable residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Ther Adv Hematol* [Internet]. 2020;11:204062072091002. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2040620720910023>
60. 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* [Internet]. 2016;27(February):v69–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdw025>
61. Pui CH, 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* [Internet]. 2017;31(2):333–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2016.234>
62. Campana D, Pui C. Evidence-Based Focused Review Minimal residual disease – guided therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia Case presentations. *Blood* [Internet]. 2017;129(14):1913–9. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/129/14/1913/35887/Minimal-residual-disease-guided-therapy-in>
63. Jabbour E, O'Brien S, Konopleva M, Kantarjian H. New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* [Internet]. 2015;121(15):2517–28. Available from: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cncr.29383>
64. Raetz EA, Teachey DT. T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Hematology* [Internet]. 2016 Dec 2;2016(1):580–8. Available from: <https://ashpublications.org/hematology/article/2016/1/580/21136/T-cell-acute-lymphoblastic-leukemia>
65. Nováková M, Glier H, Brdičková N, Vlková M, Helena A, Lima M, et al. How to make usage of the standardized EuroFlow 8-color protocols possible for instruments of different manufacturers. *J Immunol Methods* [Internet]. 2019;475. Available from: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S0022175917301394>
66. PETHEMA. Protocolo para el tratamiento de la leucemia aguda linfoblástica de alto riesgo bcr/abl negativa en adultos. *Soc ESPAÑOLA Hematol Y Hemoter*. 2013;1–46.
67. Euroflow and Cytognos. CYT-BCP-ALL-MRD, B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Minimal Residual Disease. 2022;3:1–7. Available from: <https://www.cytognos.com/products/cyt-bcp-all-mrd/>
68. Euroflow and Cytognos. CYT-ALOT Acute Leukemia Orientation Tube. *Cytognos* [Internet]. 2022;3:1–9. Available from: <https://www.cytognos.com/products/cyt-alot/>
69. Theunissen PMJ, Sedek L, Haas V De, Szczepanski T, Der A Van, Mejstrikova E, et al. Detailed immunophenotyping of B-cell precursors in regenerating bone marrow of acute lymphoblastic leukaemia patients : implications for minimal residual disease detection. *Br J Haematol* [Internet]. 2017;178(2):257–66. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bjh.14682>
70. Cytognos SL. Cytognos Products. *Cytognos*. 2022;(3):1–4.