

# Avances en las Guías para el estudio de Enfermedad Residual Medible por Citometría de Flujo Multiparamétrica de Alta Sensibilidad en Leucemia Linfoblástica Aguda del adulto

Advances in the Guidelines for the study of Residual Disease Measurable by High Sensitivity Multiparametric Flow Cytometry in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia

Rodriguez C<sup>1</sup>, Cismondi V<sup>2</sup>, Agriello E<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Oncohematología, Hospital Nacional de Clínicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

<sup>2</sup> Laboratorio de Hematología, sector Citometría de Flujo, Hospital Milstein, CABA

<sup>3</sup> LEB laboratorio, Bahía Blanca

cecirodr@hotmail.com  
cecilia.rodriguez@unc.edu.ar



GUÍAS PARA EL ESTUDIO DE ENFERMEDAD RESIDUAL MEDIBLE (ERM) POR CITOMETRÍA DE FLUJO MULTIPARAMÉTRICA EN LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DEL ADULTO (LLA)

HEMATOLOGÍA  
Volumen 26 Numero Extraordinario  
4tas Jornadas Latinoamericanas de la SAH: 77-82  
Noviembre 2022

**Palabras claves:** citometría de flujo, enfermedad residual medible, estandarización.

**Keywords:** flow cytometry, measurable residual disease, standardization.

*Para la elaboración de estas guías se ha conformado un grupo de trabajo con representantes de la subcomisión de Leucemias Agudas de la Sociedad Argentina de Hematología (SAH), del Grupo Rioplatense de Citometría de Flujo (GRCF) y del Grupo Argentino de Tratamiento de Leucemias Agudas (GATLA)*

## Introducción

La mayoría de los pacientes adultos con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) logran la remisión hematológica con regímenes quimioterápicos estándares, sin embargo muchos de ellos recaen y finalmente fallecen a causa de la leucemia<sup>1,2</sup>. En estos últimos pacientes la recaída ocurre a pesar de haber logrado la remisión morfológica (< 5% de blastos en médula ósea), sugiriendo que niveles bajos de Enfermedad Residual Medible (ERM), denominada previamente “Enfermedad mínima residual” persisten en médulas en remisión<sup>3</sup>.

El uso de métodos sensibles para la cuantificación de ERM permite una mejor estimación de la reducción de la masa tumoral posterior al tratamiento, además de evaluar la respuesta a la terapia en cada paciente. Por tal motivo, la cuantificación de ERM se considera actualmente un factor pronóstico independiente en todos los subtipos de LLA, siendo fundamental para la adecuada decisión terapéutica en los distintos momentos del tratamiento<sup>4</sup>. Además, el desarrollo actual de nuevos blancos terapéuticos (ej, Blinatumomab, inotuzumab, CAR-T cells, etc), los cuales demuestran una alta efectividad en la

erradicación de enfermedad residual, han aumentado aún más la complejidad en la toma de decisiones con respecto a la ERM<sup>5</sup>.

Diversos grupos de estudio de ERM han indicado que la Citometría de Flujo Multiparamétrica (CFM) tiene una especificidad y sensibilidad inferior a los métodos basados en técnicas de PCR<sup>6,7,8</sup>, sin embargo, las nuevas estrategias de CFM de alta sensibilidad, basadas en procedimientos completamente estandarizados propuestos por el grupo Euroflow son aplicables a  $\geq 98\%$  de los pacientes, logrando una sensibilidad similar a la PCR<sup>9</sup>.

Para realizar el estudio de ERM en LLA de Precursores B (LLA-CPB) por CFM se requiere de la discriminación inmunofenotípica entre células leucémicas residuales y precursores B normales/reactivos, los cuales están presentes fundamentalmente durante los períodos de regeneración medular<sup>10,11</sup>. Mientras que en el caso de las LLA de Precursores T (LLA-CPT), el estudio de ERM se basa en el hallazgo de fenotipos tímicos aberrantes en médula ósea.

En la actualidad, no existen en Argentina guías con recomendaciones para la detección de ERM en LLA del adulto. Por tal motivo, el objetivo principal de esta guía es brindar los lineamientos básicos y procedimientos consensuados para el estudio estandarizado de ERM por CFM de alta sensibilidad en pacientes con LLA del adulto.

### CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA

- La muestra de elección es médula ósea (MO) con respecto a sangre periférica (SP), ya que se ha demostrado que los resultados entre ambas pueden ser altamente discordantes, sobre todo en el caso de las LLA-CPB, las cuales pueden presentar niveles de ERM hasta  $10^3$  veces mayores en MO con respecto a SP<sup>12</sup>. En el caso de las LLA-CPT, si bien numerosos estudios clínicos demostraron que los niveles de ERM entre ambas muestras son comparables o solo 1 logaritmo menor en SP con respecto a MO, estos resultados no han sido validados aún, razón por la cual, la MO continúa siendo el tejido de elección<sup>13,14,5</sup>.
- Las muestras de MO se deben obtener de la **primera punción aspirativa** para evitar hemodilución
- El volumen total no debe exceder los 2 ml.
- El anticoagulante recomendado es EDTA (1.5 – 2.2 mg por ml)

- La muestra debe mantenerse a temperatura ambiente hasta su procesamiento, el cual debería realizarse en lo posible antes de las 24 hs. de su extracción.
- No es recomendable refrigerar, congelar, ni utilizar soluciones estabilizadoras (TransFix (Cytomark) TM y Streck Cyto-Chex<sup>TM</sup>) dado que alteran la intensidad de expresión de las proteínas usadas para la identificación celular, aumentando el background (inespecificidad), y afectando las características morfológicas de las células. Además, pueden dificultar la discriminación entre las distintas subpoblaciones celulares.

### PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS Y PANELES

Esta guía sigue los lineamientos del consorcio europeo Euroflow, cuyas publicaciones y protocolos de procedimientos estandarizados (SOPs) para las fases preanalítica y analítica son de libre acceso: [www.euroflow.org](http://www.euroflow.org)

#### • Preparación de la muestra

Brevemente, consiste en realizar un método de concentración celular denominado “bulk lisis” y posterior incubación con los anticuerpos monoclonales según los protocolos de EuroFlow<sup>15-17</sup>. Este procedimiento permite adquirir una mayor cantidad de células y así obtener mayor sensibilidad<sup>18-19</sup>, especialmente cuando se evalúa en las primeras etapas del tratamiento (post inducción) en la que la celularidad de la MO es baja.

La marcación debe ser realizada inmediatamente después de la bulk lisis para evitar la pérdida de la viabilidad celular que ocurre con el paso del tiempo. Se deben adquirir más de 4 millones de células por tubo con lo cual se alcanza una sensibilidad de 0.001% ( $10^{-5}$ ) comparable con los procedimientos de PCR-EMR o NGS-EMR<sup>18</sup>.

#### • Marcación para ERM en LLA-CPB

En este consenso sugerimos el panel de 2 tubos a 8 colores utilizado por el grupo Euroflow, aplicable a  $>98\%$  de los pacientes con una sensibilidad de 0,001% ( $10^{-5}$ )<sup>19</sup>. Para evaluar la maduración ontogénica B o sea, todas las poblaciones normales que se diferencian a lo largo de la linfopoyesis B, se utilizan como marcadores troncales: CD19, CD34, CD10, CD20, CD38, CD45 y CD81.

Algunos de ellos modulan su expresión durante

la terapia de inducción por la acción de los corticoides, tal es el caso de CD19 y CD20 (que son up regulados), mientras CD10 y CD34 (son down regulados)<sup>5</sup>, por lo que debe conocerse la expresión normal de los mismos en MO de sujetos sanos. El panel también consta de marcadores que demostraron conservar su expresión en las células leucémicas: CD66c, CD73, CD123 y CD304 debido a su prevalencia en los fenotipos al diagnóstico y conservando su estabilidad durante el tratamiento<sup>18,20-22</sup> (Tabla 1).

Los clones, fluorocromos y fabricantes sugeridos para los Anticuerpos Monoclonales que se deben utilizar se encuentran disponibles en las SOPs de Euroflow.

#### • Marcación para ERM LLA-T

Para analizar precursores T en MO, se consideran marcadores esenciales: Tdt, CD3 citoplasmático (CD3cit), CD3 de membrana, CD5, CD7, CD1a, CD44, CD45RA y CD99<sup>23</sup>. La expresión de CD3cit junto con la de CD7 se observa en la mayoría de las LLA de precursores T (LLA-CPT) por lo que se utilizan como marcadores troncales para la selección de los blastos<sup>15</sup>. El CD45RA se expresa en la mayoría de las células T inmaduras y parcialmente en las células T maduras<sup>24</sup>. El CD99 se expresa fuertemente en células inmaduras T y no presenta modulación después del tratamiento por lo que es muy útil para la detección de blastos T residuales, ya sea en MO o en SP<sup>25-26</sup>.

Se sugiere utilizar antígenos de inmadurez como CD10, CD34, CD117, además de CD56 y de otros linajes como CD13 y CD33 especialmente en el estudio de LLA-CPT con fenotipo early T.

#### ESTRATEGIAS DE ANÁLISIS

El grupo Euroflow cuenta con una base de datos para EMR de LLA-CPB por lo que se sugiere la utilización del análisis automatizado con el software Infinicyt que toma como referencia la misma. Para la realización de este tipo de análisis se requiere de un citometrista experimentado dado que la selección

previa de las poblaciones a comparar con esta base debe ser realizada de manera manual, guiándose por los patrones fenotípicos y marcadores que definen la ontogenia B.

Se debe conocer la expresión normal de los antígenos celulares en los diferentes estadios de maduración de una MO normal y durante el tratamiento (por ej: MO post trasplante).

En el caso de no realizarse análisis automatizado, existen algunos lineamientos a seguir para un análisis estandarizado. De esta manera, al realizar el análisis fenotípico se podrá detectar la presencia de blastos residuales dado que estos presentan características **fenotípicas diferentes** de su contrapartida normal.

Para el análisis de EMR en LLA-CPB se debe comenzar haciendo gate en CD19, excepto en pacientes tratados con anti-CD19. Se deben analizar los patrones de maduración normales utilizando diferentes combinaciones para los marcadores CD20, CD38, CD10, CD81 y CD22, evaluando sus intensidades de fluorescencia, sincronización en la maduración y sus proporciones relativas dentro del gate teniendo en cuenta la etapa del tratamiento.

Además, se debe confirmar la negatividad de expresión para marcadores aberrantes como CD123, CD73, CD304 y CD66c. Es conveniente excluir desde el principio del análisis las células plasmáticas por la expresión de CD38 fuerte.

Es importante conocer todas las subpoblaciones de la ontogenia B como los precursores tempranos que no expresan CD19 pero si son CD10+ CD34+ CD45+débil<sup>11,22</sup>.

En el caso de las LLA-CPT, el primer gate puede realizarse en células con expresión de CD3cit o CD7. Luego se pueden excluir las células T maduras que expresan CD3 en superficie, CD45 fuerte, CD5 heterogéneo y CD45RA parcial. Las células NK se excluyen del gate CD7 utilizando la positividad para CD56+CD16.

El resto de los marcadores sugeridos para el panel T se expresan en células inmaduras por lo que la presencia de estos en células de MO o SP es indicati-

**Tabla 1.** Panel validado para el estudio de LLA-CPB.

LLA-CPB	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PE-CY7	APC	APC-A750
<b>Tubo 1</b>	CD20	CD45	CD81	CD66c+CD123	CD34	CD19	CD10	CD38
<b>Tubo 2</b>	CD20	CD45	CD81	CD73 + CD304	CD34	CD19	CD10	CD38

va de ERM positiva.

Al finalizar el análisis se deben excluir los dobletes y detritus celulares (debris) utilizando dot plots de FSC-H vs FSC-A, y de SCC vs FSC. Se puede evaluar la estabilidad de la adquisición en un dot plot de tiempo vs CD19 o vs CD3cit.

#### • Pacientes tratados con anti-CD19

En los últimos años se comenzaron a usar nuevas terapias en determinados grupos de LLA-CPB, las cuales incluyen agentes dirigidos contra antígenos de las células B como CD19, CD20 y CD22 o células CART-19. Especialmente, en los pacientes tratados con anti-CD19, la terapia puede dificultar el estudio de ERM basada en la “*estrategia de gating por CD19*”. Para ello se han desarrollado nuevas estrategias de análisis, sin el uso de CD19 como marcador específico B, pero utilizando el mismo panel de anticuerpos propuesto por el grupo Euroflow<sup>27</sup>. También, Cheria y col. han propuesto otras formas alternativas de análisis incorporando al panel CD22 y CD24<sup>28</sup>.

#### CUANTIFICACIÓN DE ERM (LLOD y LOQ)

Con el fin de lograr resultados más informativos con respecto a la sensibilidad en la detección de ERM en cada paciente, es fundamental que en el informe se incluyan los *límites de detección y cuantificación* usados en cada ensayo. Estos límites se basan en cuatro parámetros: 1) N° total de eventos analizados, 2) N° de células neoplásicas detectadas, 3) el menor N° de eventos requeridos para **detectar** reproduciblemente

una población neoplásica y 4) el menor N° de eventos requeridos para **cuantificar** reproduciblemente una población neoplásica

El mínimo porcentaje de células detectables por encima del background se denomina *Límite inferior de detección (LLOD)* y se calcula de la siguiente manera:

**LOD:  $20 \times 100 / N^{\circ}$  de células viables adquiridas**

Se recomienda un mínimo de 50 células viables con el fin de cuantificar una población patológica, por lo tanto el “*límite inferior de cuantificación*” (LLOQ) se calcula:

**LLOQ:  $50 \times 100 / N^{\circ}$  de células viables adquiridas<sup>29,30</sup>**

Estos parámetros se han incorporado a fin de mejorar los criterios de calidad de las muestras evaluadas y se propone sean agregados al informe para determinar la calidad del análisis.

#### INFORME

Respecto al informe, este debe ser claro y concluyente, donde se especifiquen todos los datos solicitados del paciente estudiado, además del momento del tratamiento en el que se encuentra y el panel de anticuerpos utilizado.

El resultado debe contener, el porcentaje (%) de “células patológicas detectadas”, sus características fenotípicas, los valores de LOD y LLOQ alcanzados. En la interpretación final especificar si la ERM es **detectable y cuantificable o no detectable**, estando explícitamente aclarado en la conclusión.

**Conflictos de interés:** Las autoras declaran no poseer conflictos de interés.

#### Bibliografía

1. Sive JI, Buck G, Fielding A, y col. Outcomes in older adults with acute lymphoblastic leukaemia (ALL): results from the international MRC UKALL XII/ECOG2993 trial. Br J Haematol. 2012;157:463-471.
2. Bruggemann M, Raff T, Kneba M. Has MRD monitoring superseded other prognostic factors in adult ALL? Blood. 2012;120:4470-4481.
3. Short N, Jabbour E y col. Recommendations for the assessment and management of measurable residual disease in adults with acute lymphoblastic leukemia: A consensus of North American experts. Am J Hematol. 2019;94:257-265.
4. Beldjord K, Chevret S, Asnafi V, et al. Oncogenetics and minimal residual disease are independent outcome predictors in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2014;123(24):3739-3749.

5. van Dongen JJ, van der Velden VH, Brüggemann M, Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood*. 2015;125: 3996-4009.
6. Ryan J, Quinn F, Meunier A, y col. Minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukaemia patients at multiple time-points reveals high levels of concordance between molecular and immunophenotypic approaches. *Br J Haematol*. 2009;144:107-115.
7. Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, y col. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2017;129: 347-357.
8. Thorn I, Forestier E, Botling J, y col. Minimal residual disease assessment in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a Swedish multi-centre study comparing real-time polymerase chain reaction and multicolour flow cytometry. *Br J Haematol*. 2011;152:743-753.
9. Sarmiento Palao H, Tarín F, Martirena F, y col. A reproducible strategy for analysis of minimal residual disease measured by Standardized multiparametric flow cytometry in b acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*. 2019 Jan;96:12-15.
10. Sędek Ł, Bulsa J, Sonsala A, y col. The immunophenotypes of blast cells in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: how different are they from their normal counterparts? *Cytometry B Clin Cytom*. 2014 Sep;86:329-39.
11. Theunissen PMJ, Sedek L, De Haas V, y col. EuroFlow Consortium. Detailed immunophenotyping of B-cell precursors in regenerating bone marrow of acute lymphoblastic leukaemia patients: implications for minimal residual disease detection. *Br J Haematol*. 2017 Jul;178:257-266.
12. van der Velden, V.H.; Jacobs, D.C.; Wijkhuijs, y col. 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, 1432-1436.
13. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, y col. Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002;100(7): 2399-2402.
14. van Dongen JJ, van der Velden VH, Brüggemann M, Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood*. 2015 Jun 25;125(26):3996-4009.
15. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH, y col. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. 2012;26:1986-2010.
16. EuroFlow SOP for Sample Preparation Version 1.5 - 19 August 2019. Disponible en: <https://www.euroflow.org/protocols>.
17. EuroFlow SOP for bulk lysis in MRD panels Version 1.3 - 25 June 2018. Disponible en: <https://www.euroflow.org/protocols>.
18. Jain S, Mehta A, Kapoor G, y col. Evaluating New Markers for Minimal Residual Disease Analysis by Flow Cytometry in Precursor B Lymphoblastic Leukemia. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2018 Jan;34(1):48-53.
19. Dworzak MN, Gaipa G, Schumich A, y col. Modulation of antigen expression in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia during induction therapy is partly transient: Evidence for a drug-induced regulatory phenomenon. Results of the AIEOP-BFM-ALL-FLOW-MRD-Study Group. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010; 78:147-53.
20. Bras AE, de Haas V, van Stigt A y col. CD123 expression levels in 846 acute leukemia patients based on standardized immunophenotyping. *Cytometry B*. 2019;96B:134-42.
21. Tang GS, Wu J, Liu M, y col. BCR-ABL1 and CD66c exhibit high concordance in minimal residual disease detection of adult B-acute lymphoblastic leukemia. *Am J Transl Res*. 2015;7:632-9.
22. Sedek L, Theunissen P, Costa ES, y col. Differential expression of CD73, CD86 and CD304 in normal vs. leukemic B-cell precursors and their utility as stable minimal residual disease markers in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Immunol Methods*.
23. Tembhare PR, Chatterjee G, Khanka T, y col. Eleven-marker 10-color flow cytometric assessment of measurable residual disease for T-cell acute lymphoblastic leukemia using an approach of exclusion. *Cytometry B Clin Cytom*. 2021;100:421-433.
24. Schiavone EM, Pardo CL, Di Noto R, y col. Expression

- of the leucocyte common antigen (LCA,CD45) isoforms RA and RO in acute haematological malignancies: possible relevance in the definition of new overlap points between normal and leukaemic haemopoiesis. *B J Haem.* 1995;91:899-906.
25. Dworzak MN, Fröschl G, Printz D, y col. CD99 expression in T-lineage ALL: implications for flow cytometric detection of minimal residual disease. *Leukemia.*2004;18:703-708.
26. Dworzak MN, Buldini B, Gaipa G, y col. AIEOP-BFM consensus guidelines 2016 for flow cytometric immunophenotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cytom.* 2018 Jan;94:82-93.
27. Verbeek MWC, Buracchi CH, Laqua A, y col. Flow cytometric minimal residual disease assessment in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia patients treated with CD19-targeted therapies - a EuroFlow study. *Br J Haematol.* 2022 Apr;197:76-81.
28. Cherian S, Miller V, McCullouch V, Dougherty K, Fromm JR, Wood BL. A novel flow cytometric assay for detection of residual disease in patients with B lymphoblastic leukemia/lymphoma post anti-CD19 therapy. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018;94:112-20.
29. Arroz M, Came N, Lin P, Chen W, Yuan C, Lagoo A, Monreal M, de Tute R, Vergilio JA, Rawstron AC, Pava B. Consensus guidelines on plasma cell myeloma minimal residual disease analysis and reporting. *Cytometry B Clin Cytom.* 2016; 90:31-9.
30. Buccisano F, Palmieri R, Piciocchi A, y col. Clinical relevance of an objective - limit of detection - limit of quantification - based flow cytometry approach for measurable residual disease assessment in acute myeloid leukemia. A post-hoc analysis of the GIMEMA AML1310 trial. *Haematologica.* 2022 Mar 17.



**Atribución – No Comercial – Compartir Igual (by-nc-sa):** No se permite un uso comercial de la obra original ni de las posibles obras derivadas, la distribución de las cuales se debe hacer con una licencia igual a la que regula la obra original. Esta licencia no es una licencia libre.