

Utilidad en la práctica clínica de la detección de la enfermedad mínima residual

M. GONZÁLEZ, R. GARCÍA-SANZ, M.C. CHILLÓN, L. MARÍN, R. CORRAL, M.E. ALONSO-SARASQUETE, M. ALCOCEBA, A. BALANZATEGUI, M.B. VIDRIALES, J.F. SAN MIGUEL
Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Clínico Universitario de Salamanca

Introducción

En la actualidad, las estrategias terapéuticas empleadas en el tratamiento de las leucemias y linfomas consiguen una elevada tasa de remisiones completas (RC), definida como la ausencia de células tumorales detectadas mediante técnicas citomorfológicas (límite de detección del 5%). Sin embargo, muchos pacientes van a recaer de su enfermedad debido a la existencia de un pequeño número de células malignas que no son detectadas con la metodología convencional, que es lo que se denomina enfermedad mínima residual (EMR)⁽¹⁻³⁾. Debido a esto, los enfermos son sometidos indiscriminadamente a tratamientos de consolidación, incluido el trasplante de progenitores hematopoyéticos, para eliminar la EMR. Ello hace que algunos pacientes reciban más tratamiento del necesario, mientras que en otros es insuficiente. Por tanto, son necesarias técnicas más sensibles que permitan evaluar la masa residual de forma más precisa, lo que posibilitaría realizar tratamientos de consolidación adaptados a cada enfermo.

Entre las técnicas de estudio de EMR inicialmente utilizadas (cultivos celulares, hibridación *in situ*, contenido de ADN, etc.), las dos que se emplean en la práctica actual son las técnicas de inmunofenotipo mediante citometría de flujo y la técnicas de PCR cuantitativas, ya que presentan las características esenciales de una técnica de ERM (Tabla 1).

En este trabajo se revisaran los aspectos metodológicos de ambas técnicas, así como los resultados clínicos más relevantes en diferentes neoplasias hematológicas donde se utiliza en la toma de decisiones terapéuticas, por lo que su empleo es necesario en la buena práctica clínica.

Tabla 1. Características de las metodologías de estudio de EMR en hemopatías*

● Especificidad: distinción entre célula tumoral y normal
● Aplicabilidad: % de casos en los que se puede emplear el estudio
● Sensibilidad y cuantificación: mínimo número de células tumorales que pueden detectar al menos una célula tumoral en $> 10^4$ células normales
● Reproducibilidad: métodos estandarizados

* Las dos técnicas que cumplen estos requisitos son: el estudio inmunofenotípico mediante citometría de flujo multiparamétrica de 6-8 colores y las técnicas moleculares de PCR cuantitativa en tiempo real.

Aspectos metodológicos. Técnicas moleculares de PCR cuantitativa en tiempo real y de inmunofenotipo por citometría de flujo

Ambas técnicas tienen ventajas e inconvenientes propios que debemos conocer para aplicar la técnica más adecuada en cada caso de acuerdo principalmente con el tipo de enfermedad y de laboriosidad y complejidad del análisis, que depende principalmente de la diana tumoral que se analice (Tabla 2).

Las dos dianas tumorales empleadas con mayor frecuencia en los estudios de PCR cuantitativa son: a) el análisis de los reordenamientos clonales de los genes de las inmunoglobulinas (Igs) y del receptor de célula T (RCT) y b) detección de aberraciones cromosómicas en las que se conocen los oncogenes implicados que dan lugar a regiones quiméricas de fusión características de diferentes enfermedades (ejemplo: BCR/ABL1, en la leucemia mieloide crónica). Estos estudios se pueden realizar bien a partir de ADN, lo que facilita el manejo de las muestras al ser un material estable (estudios de reordenamientos clonales de Igs/RCT y algunas translocaciones cromosómicas, p. ej., BCL1/JH o BCL-2/JH) o bien a partir de ARN en las translocaciones cromosómicas en las que el pun-

Tabla 2. EMR en hemopatías malignas: comparación de las técnicas moleculares (PCR) y citometría de flujo

	Técnicas moleculares	Citometría de flujo
Rapidez	2-3 días (hasta semanas)	Rápida: 1-2 horas
Diana	ADN o ARN (ARN es inestable)	Proteínas/células
Aplicabilidad	Depende de la enfermedad (alteraciones cromosómicas, mutaciones genéticas etc.)	Mayoría de las enfermedades (aberrancias fenotípicas, asincronismos madurativo, etc.)
Sensibilidad	Alta ($>1 \times 10^{-4-6}$)	Alta ($>1 \times 10^{-4-5}$)
Exactitud	Cualitativa/cuantitativa	Cuantificación
Información	Todas las células de la muestra (o se precisa purificación celular previa)	Cualquier subpoblación
Complejidad	Laboratorios especializados (Lab pre-PCR y PCR, equipos, etc.)	Laboratorios estándar (+ citómetro)

Tabla 3. EMR en Hemopatías. Aplicabilidad de las dianas de estudio por técnicas de biología molecular (PCR cuantitativa en tiempo real)

Dianas tumorales	Neoplasias linfoides (LLA, LNH, etc.)	LMA*	LMC
Igs y RCT	90%	-	-
Traslocaciones** (ADN, genes de fusión)	30-40%	30-40%	BCR/ABL (100%)

* Otros marcadores: expresión de genes (WT-1, EVI1, FLT3, NPM1), quimerismo hematopoyético en alotrasplante. ** Traslocaciones cromosómicas. LLA-precursores B: BCR/ABL/t(9;22) -en adultos-, ETV6/RUNX1/t(12;21) -en niños- E2A/PBX1/t(1;19), MLL-AF4/t(4;11) y otras alteraciones de MLL (11q23); LLA-precursores T: SIL/TAL1, HOX 11L2 (t(5;14)); LNH-B: BCL2/JH/t(14;18), BCL1/JH/t(11;14); LMA: RUNX1-MTG8-t(8;21)-, CBFβ-MYH11-inv(16)/t(16;16)-, PML-RARA-t(15;17); otras: MLLT3/MLL-t(9;11)-, DEK/NUP214-t(6;9)-, RPN1/EVI1-inv(3)/t(3;3)-, RBM15/MLK1-t(1;22)-.

to de rotura es muy variable y no es posible su detección a nivel ADN, pero que si es intrónico el punto de corte, la traslocación da lugar a la generación de genes híbridos (p. ej., BCR/ABL; PML/RAR α , etc.) que se encuentran en marco de lectura, lo que permite su detección a partir de ARN tras su transformación a cADN mediante técnica de transcriptasa inversa seguida de reacción de PCR (técnica de RT-PCR)⁽¹⁻³⁾. Metodológicamente, la primera estrategia es más compleja, ya que precisa, para ser específica y suficientemente sensible ($>1 \times 10^{-4}$), la secuenciación de las regiones clono específicas *V(D)J* de cada paciente y posterior diseño de oligonucleótidos específicos de las regiones hipervariables CDRIII. Estos oligonucleótidos serán empleados en el estudio de la EMR, bien como sondas clono específicas o bien como primer alelo-específico en una reacción de PCR (ASO-PCR)⁽²⁾. Otra limitación del empleo de este marcador es la presencia de mutaciones somáticas en los genes de Igs en los pacientes con síndromes linfoproliferativos crónicos (p. ej., linfoma folicular o mieloma múltiple) que dificulta la hibridación correcta de los *primers* consenso. Por el contrario, en los estudios de las traslocaciones cromosómicas leucémicas específicas, sólo se requiere realizar una o dos reacciones de PCR (PCR anidada) empleando *primers* consenso para todos los pacientes. Sin embargo, la primera metodología es más específica (menor riesgo de falsos positivos por contaminación), ya que no es sólo un marcador tumor específico si no también paciente-específico debido a que las secuencias *V(D)J* son propios de cada clon celular de cada paciente. Las técnicas iniciales de PCR eran cualitativas (presencia o no del marcador tumoral) y no daban información precisa del número de células tumorales/transcritos, por lo que hoy en día la técnica de elección son las técnicas de PCR cuantitativa en tiempo real, existiendo protocolos para cada uno de los marcadores tumorales empleados. La aplicabilidad de estos dos marcadores es diferente, así mientras que la mayoría de las

proliferaciones linfoides agudas y crónicas, tienen uno o los dos marcadores (reordenamiento clonotípico en $> 85\%$ y/o traslocaciones cromosómicas el 30-40% de los casos), en las neoplasias mieloides, a excepción de la leucemia mieloide crónica (presencia de BCR/ABL1 en casi el 100% de los casos), sólo el 30-40% poseen traslocaciones cromosómicas que pueden emplearse como marcador de estudio de EMR. Esto hace que en las neoplasias mieloides se necesiten marcadores de EMR alternativos, como son la expresión de genes aberrantes o bien genes expresados de forma aberrante (hiper- o hipoexpresados) o técnicas de quimerismo hematopoyéticos en los enfermos que han recibido un alotrasplante (Tabla 3). La principal limitación de los estudios de PCR cuantitativa es la laboriosidad y complejidad de la metodología, por lo que el resultado se puede demorar días (en el caso de los reordenamientos de Igs/RCT) y además exige la necesidad de contar con laboratorios especializados.

En relación con la citometría de flujo, sus principales ventajas son: i) su rapidez, ya que permite realizar el análisis en horas; ii) que realiza un análisis multiparamétrico sobre cada una de las poblaciones de la muestra; iii) que almacena los datos para posteriores análisis, y iv) que es aplicable en la mayoría de los casos, ya que con frecuencia las células neoplásicas presentan fenotipos aberrantes que pueden considerarse “marcadores leucémicos asociadas” (Tabla 4). Sin embargo, esta metodología presenta una serie de limitaciones, como son la ausencia de antígenos tumorales específicos y la posibilidad de que se produzcan cambios fenotípicos asociados a cambios madurativos o la presencia de varios clones con fenotipo diferente durante el tratamiento y evolución de los pacientes, lo que dificultaría la identificación de la células tumorales. Otro problema añadido es el empleo de terapia con anticuerpos monoclonales (p. ej. rituximab -Ac Mo anti-CD20- en síndromes linfoproliferativos), por lo que deben diseñarse nuevas combinaciones de marcadores monoclonales para el seguimiento de estos pacientes. Además, las estrategias de CMF empleadas inicialmente tenían menos sensibilidad de identificación de células tumorales que las técnicas moleculares de PCR. Sin embargo, la mejoras técnicas y metodológicas han permitido superar estas deficiencias: nuevos citómetros, el incremento del número de fluorocromos (6-8 colores), nuevos y más potentes *software* de análisis, la adquisición de un número mayor de eventos (hasta un millón), posibilidad de utilizar anticuerpos frente a proteínas de fusión quimérica (Proyecto EuroFlow)⁽⁴⁾.

De cualquier forma, independiente de la técnica que se elija, un requisito imprescindible es que se empleen metodologías estandarizadas, lo que permite además que los resultados en diferentes laborato-

Tabla 4. EMR mediante citometría de flujo. Características fenotípicas que se pueden utilizar para identificar "fenotipos leucémicos"

Expresión aberrante de línea		Fenotipos aberrantes	
Asincronismo madurativo		Ags sobre-/infraexpresados	Light scatter anormales
Ags linfoides en LMA	CD13+/CD19+/79a+	CD10+++	Células de tamaño anormal
Ags mieloides en LLA	MPO+/CD19+	CD34+++	
Fenotipos ectópicos		Proteínas tumor-específicas	
Linfos B CD10+ en SP		Proteína de fusión BCR/ABL	
Células CD10+/CD19+ en LCR			

rios sean comparables, aspecto éste básico en los estudios multicéntricos y cuando del resultado de EMR se derive un cambio en la actitud terapéutica. En relación con las técnicas moleculares, los proyectos europeos de estandarización de detección de genes de fusión por PCR cualitativa (Biomed-1), cuantitativa (EAC program) y de los reordenamientos clonales de los genes de Igs y RCT (Biomed-2 y ESG-MRD-ALL)^(3,5,6,7) y los estudios de estandarización en LMC (uso de la International Scale [IS], recomendaciones del European LeukemiaNet, estudio EUTOS: "European treatment and outcome study")⁽⁸⁾ son ejemplos de esfuerzos que se han realizado para estandarizar estos estudios. Igualmente, a nivel de citometría existen diferentes iniciativas para estandarización de la metodología (Clinical Cytometry Society, Clinical Laboratory Standards Institute, European LeukemiaNet) y desarrollo de paneles de anticuerpos (Euro-Flow Consortium)^(4,9). Sin duda, estos esfuerzos de estandarización permitirán armonizar todos los estudios de EMR y aportar guías para la interpretación correcta de sus resultados^(1,10).

Aplicaciones clínicas de los estudios de enfermedad mínima residual

En esta sección se revisarán por enfermedades las principales aportaciones de los estudios de EMR, haciendo especial hincapié en aquellas enfermedades donde su uso y aplicación tiene implicaciones en la práctica clínica diaria.

En la **leucemia linfoblástica aguda**, los estudios de EMR por técnicas moleculares han mostrado, primero en series pediátricas y posteriormente confirmado en serie de adultos, que son útiles en la predicción de recaída identificando grupos de enfermos con pronóstico diferente, siendo, además, el riesgo de recaída proporcional al nivel de EMR. Estudios posteriores empleando técnicas de citometría de flujo han mostrado que ambas metodologías obtienen resultados similares, si bien la sensibilidad de la técnica de PCR es superior. Sin embargo, con la mejora en las técnicas de citometría, la sensibilidad en algunos es-

tudios es similar⁽¹¹⁾. En la mayoría de los análisis, el nivel de EMR es un factor pronóstico independiente, si bien su presencia se correlaciona con subtipos citogenéticos/moleculares y, en menor medida, con datos clínicos a la presentación. En consecuencia, los estudios de EMR en la actualidad constituyen una herramienta fundamental para identificar pacientes con un alto riesgo de recaída y, por tanto, ser subsidiario de medidas terapéuticas diferentes (p. ej., cambio de régimen quimioterápico incluido el empleo de trasplante de progenitores hematopoyéticos, utilización de nuevas drogas o bien empleo preventivo de infusión de linfocitos en pacientes sometido a alotrasplante). Igualmente, estos estudios también identifican pacientes con bajo riesgo de recaída y, por tanto, que no deben recibir tratamientos intensivos innecesarios. Sin embargo, es necesario confirmar estos resultados en estudios clínicos aleatorizados con estudios de EMR analizada mediante técnicas estandarizadas⁽¹²⁾. En este sentido, en la actualidad existen varios estudios prospectivos en marcha que estratifican a los pacientes de acuerdo al nivel de EMR y se les asigna un tratamiento distinto según su grupo de riesgo, lo que, de confirmarse su utilidad, permitirá, en un futuro, administrar tratamientos individualizados y mejorar el pronóstico de estos pacientes.

En las **leucemias mieloblásticas agudas**, el marcador guía empleado como diana tumoral en la mayoría de los estudios de EMR, ha sido el análisis mediante RT-PCR de las traslocaciones cromosómicas más frecuentes^(1,13) (Tabla 3). Estos estudios han mostrado la utilidad de la EMR para identificar pacientes con peor supervivencia y detectar de forma precoz la recaída molecular antes de que se produzca la recaída clínica, lo que permite aplicar tratamiento preventivo. Además también han mostrado cómo la cinética de recaída es diferente según la translocación (más rápida en LMA t(15;17) que en inv⁽¹⁶⁾ o t(8;21)⁽¹⁴⁾. Sin embargo, estas traslocaciones permiten el estudio en el 30-40% de todas las LMA. Esto hace que se necesiten métodos de EMR alternativos, entre los que se encuentran los estudios de mutaciones tumorales (p. ej., mutaciones del *NPM1*) o bien expresión de genes que, o bien no son expresados en células he-

matopoyéticas normales (p. ej., gen *PRAME*) o bien las células tumorales presentan hiperexpresión de los mismos (p. ej., gen *WT1*)^(1,14) (Tabla 2). Los estudios preliminares empleando estas dianas tumorales identifican pacientes con pronóstico diferente, sin embargo estos resultados deben validarse en otras series de pacientes. Las técnicas de citometría de flujo también se han demostrado útiles para identificar pacientes con diferente pronóstico, si bien el número de estudios es claramente inferior y los resultados son menos consistentes debido, en parte, a la dificultad de identificar de forma específica los blastos mieloides⁽³⁾. Sin duda, los esfuerzos de estandarización del grupo de Euro Flow^(4,9) y las mejoras técnicas de la CMF aumentarán el valor predictivo de la CMF en LMA.

En la **leucemia mieloide crónica**, antes de la introducción de los inhibidores tirosin kinasa (ITK), el estudio de EMR estaba restringido a los pacientes sometidos a alotrasplante, ya que en el resto de pacientes la respuesta hematológica y citogenética era suficiente para evaluar a los enfermos⁽¹⁶⁾. Sin embargo, la alta eficacia de tratamiento actual con ITK consigue que la mayoría de los pacientes alcancen la respuesta citogenética lo que obliga a disponer de métodos de cuantificación más sensibles. La cuantificación del gen de fusión *BCR/ABL* mediante PCR cuantitativa en tiempo real ha demostrado en numerosos estudios que la cinética de disminución del transcrito tumoral y el grado de respuesta alcanzada (respuesta molecular mayor y completa) se correlaciona con la supervivencia libre de progresión. Además, permite establecer criterios de respuesta clínica (no respuesta, subóptima y óptima) según el número de transcritos detectados que permite ajustar el tratamiento del paciente a su riesgo (aumento de dosis de ITK, necesidad de emplear ITK de 2.ª generación, indicar alotrasplante, etc.) y orientar la necesidad de llevar a cabo estudios biológicos (p. ej., realizar estudio de mutaciones de *ABL1* si existe un incremento de copias)^(1,8,16). Sin embargo, aún existen algunas deficiencias como variaciones metodológicas entre los diferentes laboratorios o criterios distintos para indicar estudios (cribado de mutaciones si incremento de copias de 10 vs. 2,6 veces), por lo que son necesarias medidas correctoras que validen los resultados de los diferentes laboratorios (p. ej., empleo de la Escala Internacional)⁽⁸⁾.

En los **síndromes linfoproliferativos crónicos**, incluyendo linfomas del manto, folicular, leucemia linfática crónica, tricoleucemia y mieloma múltiple, diferentes estudios han mostrado el valor pronóstico del estudio de EMR analizada por técnica de ASO-PCR^(1,17-20). Más recientemente, las técnicas de citometría de flujo, cuando se emplean al menos 4-8 colores, han mostrado ser de utilidad principalmente en el linfoma del manto, leucemia linfática crónica y

mieloma múltiple⁽¹⁸⁻²⁰⁾ e incluso, en la LLC, dado que es una técnica más simple y emplea una estrategia común y no paciente-específica como la ASO-PCR, se considera la técnica de elección^(8,19).

Conclusiones

En la actualidad, la información proporcionada por los estudios de EMR en algunas hemopatías malignas constituye un factor pronóstico independiente añadiendo valor a otros parámetros clínico-biológicos, tanto en hemopatías agudas como crónicas. Su valor en el seno de estudios clínicos controlados ha hecho que su resultado, obtenido en determinados momentos evolutivos, sea tenido en cuenta para la toma de decisiones terapéuticas en el diseño de los nuevos protocolos terapéuticos en determinadas enfermedades (p. ej., LLA). Así el nivel de EMR permite modular la intensidad y la duración del tratamiento, elegir el momento más adecuado para indicar un auto- o alotrasplante, así como aconsejar ciertos tratamientos que sólo son eficaces cuando el nivel de EMR está por debajo de niveles clínicos. Igualmente permite detectar de forma precoz la reaparición de células neoplásicas, lo que permite utilizar terapias preemtivas que son más eficaces para controlar la enfermedad que cuando la enfermedad ha recaído de forma clínica. Sin embargo, un aspecto imprescindible de estos estudios es la estandarización de la metodología que se está empleando no sólo en cada laboratorio, sino mediante estudios de control de calidad en todos los laboratorios que participan en estos estudios de EMR. Además, en algunas hemopatías es necesario confirmar estos resultados en estudios clínicos aleatorizados con estudios de EMR analizada mediante técnicas estandarizadas. Por otra parte, en algunas hemopatías queda aún por definir de forma clara el nivel de EMR con significación clínica, así como el calendario y tipo de muestra a analizar (MO o SP). En resumen, estos estudios, de manera óptima deberían permitir, en un futuro próximo, individualizar el tratamiento de cada paciente y, así, continuar la terapéutica o modificarla en favor de otras alternativas, cuando se detectaran células residuales, o suspender el tratamiento de mantenimiento con el fin de evitar toxicidad añadida, cuando se pueda demostrar que en un paciente no queda EMR.

Referencias bibliográficas

1. Béné MC, Kaeda JS. How and why minimal residual disease studies are necessary in leukemia: a review from WP10 and WP12 of the European LeukaemiaNet. *Haematologica* 2009; 94:1135-1150.

2. van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, Hancock J, Bader P, Panzer-Grumayer ER et al. European Study Group on MRD detection in ALL (ESG-MRD-ALL). Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*. 2007; 21:604-11.
3. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 2008; 111:3941-3967.
4. Weerkamp F, Dekking E, Ng YY, van der Velden VHJ, Wai H, Böttcher S, et al. On behalf of the EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). Flow cytometric immunobead assay for the detection of BCR-ABL fusion proteins in leukemia patients. *Leukemia*, 2009, 23:1106-1117.
5. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 1999 ;13:1901-28.
6. Van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender L et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations. Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003;17:2257-2317.
7. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia*. 2003 ;17:2318 .
8. Müller MC, Cross NC, Erben P, Schenk T, Hanfstein B, Ernst T et al. Harmonization of molecular monitoring of C.ML therapy in Europe. *Leukemia* 2009; 23: 1957-1963.
9. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, A et al. : EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*, 2011 (en prensa).
10. Østergaard M, Nyvold CG, Jovanovic JV, Andersen MT, Kairisto V, Morgan YG et al . Development of standardized approaches to reporting of minimal residual disease data using a reporting software package designed within the European LeukemiaNet. *Leukemia* 2011, 1-6.
11. Campana D. Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology, Am Soc Hematol Educ Program*, 2010: 7-12.
12. Brüggemann M, Schrauder A, Raff T, Pfeifer H, Dworzak M, Ottmann OG, et al, on behalf of the European Working Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (EWALL) and the International Berlin-Frankfurt-Münster Study Group (I-BFM-SG). Standardized MRD quantification in European ALL trials: Proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18-20 September 2008. *Leukemia*, 2010, 24, 521-535.
13. Santamaria C, Chillón MC, Fernández C, Martín-Jiménez P, Balanzategui A, García Sanz R et al. Using quantification of the PML-RARalpha transcript to stratify the risk of relapse in patients with acute promyelocytic leukemia. *Haematologica*. 2007; 92:315-22.
14. Ommen HB, Schnittger S, Jovanovic JV, Ommen IB, Hasle HH, Østergaard M et al. . Strikingly different molecular relapse kinetics in NPM1c, PML-RARA, RUNX1-RUNX1T1, and CBFβ-MYH11 acute myeloid leukemias. *Blood*. 2010; 115:198-205.
15. Hokland P, Ommen H B. Towards individualized follow-up in adult acute myeloid leukemia in remission. *Blood*. 2011; 117:2577-2584).
16. Hughes TP, Branford S. Monitoring disease response to tyrosine kinase inhibitor therapy in CML. *Hematology, Am Soc Hematol Educ Program*, 2009: 477-487.
17. Ladetto M, De Marco F, Benedetti F, Vitolo U, Patti C, Rambaldi A, et al. Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo (GITMO); Intergruppo Italiano Linfomi (IIL). Prospective, multicenter randomized GITMO/IIL trial comparing intensive (R-HDS) versus conventional (CHOP-R) chemoimmunotherapy in high-risk follicular lymphoma at diagnosis: the superior disease control of R-HDS does not translate into an overall survival advantage. *Blood*. 2008 ;111:4004-13
18. Pott C, Hoster E, Delfau-Larue MH, Beldjord K, Böttcher S, Asnafi V, et al. Molecular remission is an independent predictor of clinical outcome in patients with mantle cell lymphoma after combined immunochemotherapy: a European MCL intergroup study. *Blood*. 2010; 115:3215-23.
19. S Böttcher S, Stilgenbauer S, Busch R, Brüggemann M, Raff T, Pott C, et al on behalf of the German CLL study group. Standardized MRD flow and ASO IGH RQ-PCR for MRD quantification in CLL patients after rituximab-containing immunochemotherapy: a comparative analysis. *Leukemia* (2009) 23, 2007-2017.
20. Sarasquete ME, García-Sanz R, González D, Martínez J, Mateo G, Martínez P, et al. . Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica*. 2005;90:1365-72.