

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA PAULA DE AZAMBUJA

CONTRIBUIÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO DE ALTA SENSIBILIDADE NO
ESTUDO DA DOENÇA RESIDUAL MENSURÁVEL EM LEUCEMIAS AGUDAS E
SEU IMPACTO NO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-
TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

CURITIBA

MARÇO DE 2025

ANA PAULA DE AZAMBUJA

CONTRIBUIÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO DE ALTA SENSIBILIDADE NO
ESTUDO DA DOENÇA RESIDUAL MENSURÁVEL EM LEUCEMIAS AGUDAS E
SEU IMPACTO NO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-
TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Medicina Interna e Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pasquini

CURITIBA

2025

A991

Azambuja, Ana Paula de

Contribuição da citometria de fluxo de alta sensibilidade no estudo da doença residual mensurável em leucemias agudas e seu impacto no transplante de células-tronco hematopoiéticas [recurso eletrônico] / Ana Paula de Azambuja. – Curitiba, 2025.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação Medicina Interna e Ciências da Saúde, 2025.

Orientador: Ricardo Pasquini.

Bibliografia: p. 144-166.

1. Neoplasia residual. 2. Leucemia-linfoma linfoblástico de células precursoras. 3. Leucemia mieloide aguda. 4. Transplante homólogo. 5. Transplante de células-tronco hematopoéticas – estatística & dados numéricos. 6. Citometria de fluxo – métodos. 7. Biomarcadores tumorais. I. Universidade Federal do Paraná. II. Pasquini, Ricardo. III. Título.

NLMC: WH 260

Catálogo na fonte elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFPR,
Biblioteca de Ciências da Saúde – SD, com os dados fornecidos pelo autor.
Bibliotecário: Francisco José Cordeiro CRB9/1734.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA INTERNA E
CIÊNCIAS DA SAÚDE - 40001018012P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ANA PAULA DE AZAMBUJA**, intitulada: **Contribuição da Citometria de Fluxo de Alta Sensibilidade no Estudo da Doença Residual Mensurável em Leucemias Agudas e seu Impacto no Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas**, sob orientação do Prof. Dr. RICARDO PASQUINI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 28 de Março de 2025.

Assinatura Eletrônica
17/04/2025 08:51:37.0
RICARDO PASQUINI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
02/04/2025 16:01:58.0
MAURA ROSANE VALÉRIO IKOMA COLTURATO
Avaliador Externo (HOSPITAL AMARAL CARVALHO)

Assinatura Eletrônica
02/04/2025 12:47:47.0
MIRIAM PERLINGEIRO BELTRAME
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
14/04/2025 09:22:58.0
ALEX FREIRE SANDES
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO)

Assinatura Eletrônica
03/04/2025 07:38:06.0
ANA LUCIA VIEIRA MION
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ -UFPR)

Dedico esta tese à minha professora e mestre Mariester Malvezzi, pela infinita
confiança na presença de uma luz em minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, à minha família e aos amigos do Hospital de Clínicas e do laboratório de Citometria de fluxo do CHC-UFPR, minha segunda casa.

Agradeço ao professor Dr. Ricardo Pasquini, pela orientação e guia tanto na residência de hematologia quanto na pós-graduação. Agradeço a postura sempre crítica e sensata nas inúmeras questões da hematologia e do transplante de medula óssea. Agradeço por nos ensinar a ler, interpretar e fazer ciência, nos mostrando a importância do contexto e da forma em todos os passos da medicina, desde uma simples discussão de caso clínico até a leitura e interpretação de artigos e opiniões científicas.

Agradeço às doutoras Mariester Malvezzi, Miriam Perlingeiro Beltrame e Rosana Cattaneo, pelo trabalho realizado no início do laboratório de Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo do CHC-UFPR, desde 1998. Agradeço imensamente por elas terem pavimentado o caminho, pela coragem e persistência, entendendo sempre a importância da citometria de fluxo no diagnóstico e seguimento das doenças onco-hematológicas. Agradeço também às Dras. Mariester e Miriam pela iniciativa de submeter este projeto ao PRONON desde o ano de 2015.

Agradeço à Dra. Carmem Bomfim pelo incentivo, orientação primorosa e rigor científico necessários na evolução deste trabalho. Agradeço à Dra. Vaneuza Araujo Moreira Funke pelo apoio ao meu crescimento científico e amizade sincera nesses anos. Agradeço ao amigo Alberto Lima Cardoso pela ajuda na estatística e no entendimento do trabalho, além do apoio como colega na pós-graduação. Agradeço à Dra. Ana Lucia Mion pelos dados de biologia molecular e por acreditar no meu trabalho. Agradeço às Dras. Elaine Sobral da Costa, Maura Ikoma-Coultrato e Mihoko Yamamoto pelo apoio e orientação remota desde o início da minha trajetória na citometria de fluxo.

Agradeço à equipe do laboratório de Citometria de Fluxo do Hospital de Clínicas pela amizade, paciência e imensa ajuda nestes anos todos de HC. Amigos e amigas do trabalho e da vida, Julie Lilian Pimentel Justus, Noely Silva, Mari Tadeu, Yara Carolina Schluga, Edna Martins, Raisa Merhy, Fabiola Gevert, e tantos outros companheiros no dia a dia do laboratório, pelo incansável trabalho no desenvolvimento da Imunofenotipagem em Curitiba.

Agradeço à Associação dos Amigos do HC, especialmente à Sheila Meneghetti, Diego Ferreira e Tatiane Scrocaro, pelo rigor no trabalho, e principalmente pela dedicação e presteza em auxiliar o desenvolvimento tecnológico e humanitário do CHC-UFPR. Aos médicos e colegas do Transplante de Medula Óssea do HC, pelo apoio na realização dos exames de coleta das medulas ósseas e no desenvolvimento do trabalho.

Um agradecimento mais que especial à Alexandra Cristina Senegaglia que me inclui em inúmeros trabalhos que envolvem a hematopoiese, e por ter me orientado nesses últimos passos da finalização da tese, acreditando tanto na originalidade quanto na importância no contexto do HC-UFPR.

À Universidade Federal do Paraná, ao Hospital de Clínicas e ao Programa de Pós-graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, em nome de seu ex-coordenador Prof. Dr. Emilton Lima Júnior e atual coordenadora Viviane Zéetola, aos quais eu devo toda a minha formação acadêmica e dos quais me orgulho desde 1995.

Aos meus pais, Sissa e Waldy, pela dedicação desde sempre; aos meus filhos a e Augusto pela inspiração, por serem meu propósito e por aguentarem a mãe estudando durante esses quatro longos anos; e ao meu marido Carlos Augusto Dudu, pela paciência e apoio irrestrito no desenvolvimento deste trabalho.

“...As crianças têm que ter muita paciência com as pessoas grandes. Mas, com certeza, para nós, que compreendemos o significado da vida, os números não têm tanta importância”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

A presença de doença residual mensurável (DRM) antes do transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) está associada a piores desfechos em leucemias agudas de alto risco. No entanto, os melhores momentos para avaliação pós-TCTH e o impacto clínico de baixos níveis de DRM ainda são pouco definidos. **Métodos:** Este estudo prospectivo avaliou a DRM por citometria de fluxo multiparamétrica (CFM) de alta sensibilidade antes e após o TCTH (dias +30, +60 e +100), com o objetivo de analisar a cinética de eliminação da doença e sua relação com os desfechos do transplante. Pacientes com leucemia linfoblástica aguda B (LLA-B) foram analisados quanto a características genéticas e fenotípicas, e, nos casos de LLA Philadelphia-positiva (Ph+), a CFM foi comparada à PCR quantitativa (RQ-PCR) para BCR::ABL1. **Resultados:** Foram incluídos 77 pacientes consecutivos sendo que 27 (45,5%) apresentavam DRM negativa <0,01% (DRM-) e 35 (55,5%) DRM positiva >0,01% (DRM+) no momento imediatamente anterior ao TCTH. A presença de DRM+ associou-se à menor sobrevida global (SG: 87,9% DRM- vs. 54,0% DRM+) e menor sobrevida livre de eventos (SLE: 85,3% DRM- vs. 51,1% DRM+), ambas $p = 0,001$. A incidência de recidiva da doença foi maior nos pacientes com DRM+ (17,5% vs. 2,6%; $p=0,049$), assim como a mortalidade não relacionada à recidiva (MNRR: 31,4% DRM+ vs. 12,1% DRM-; $p=0,019$). Oito pacientes DRM+ (22,9%) e três DRM- (7,1%) recaíram após o TCTH ($p=0,02$). A DRM foi reavaliada em 30 pacientes no D+30 (38,9%), 27 no D+60 (35,0%) e 60 no D+100 (77,9%). Análises de risco competitivo revelaram que persistência de DRM no D+100 e doença em estágio avançado estavam associadas a pior SG, SLE e maior risco de recidiva. A MNRR também variou por tipo de leucemia, sendo significativamente mais alta nos pacientes DRM+ (LLA: 50% DRM+ vs. 18,9% DRM-; LMA: 21,7% DRM+ vs. 0% DRM-; $p=0,0158$). Nos casos de LLA Ph+, a CFM apresentou forte correlação com a RQ-PCR ($r=0,7801$; IC95%: 0,69–0,84; $p < 0,001$), com concordância em 88% dos casos ($\kappa=0,761$). A CFM detectou DRM em 82,9% das amostras com transcritos >0,01%. Fenotipicamente, 77,7% dos casos de LLA Ph+ apresentaram blastos CD34+CD38-/fraco vs. 20,2% nos demais subtipos ($p<0,0001$), além de maior expressão combinada de CD66c, CD73 e CD304 ($p < 0,001$). **Conclusões:** A citometria de fluxo de alta sensibilidade demonstrou desempenho comparável ao RQ-PCR, consolidando-se como ferramenta complementar na avaliação da DRM na LLA-B. A DRM pré-TCTH foi associada a pior prognóstico, e persistência de DRM no D+100 previu com alta especificidade a recidiva da leucemia. Esses achados reforçam a importância da incorporação da cinética da DRM peri-transplante por citometria de fluxo no manejo das leucemias agudas.

Palavras-chave: doença residual mínima, doença residual mensurável, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas, citometria de fluxo, biomarcadores.

ABSTRACT

Measurable residual disease (MRD) monitoring is essential for the management of acute leukemias. While *BCR::ABL1* transcript quantification is the gold standard for MRD assessment in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ ALL), multiparametric flow cytometry (MFC) is widely used in other genetic subtypes. The presence of MRD before hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is associated with adverse outcomes in high-risk acute leukemia patients, but the clinical relevance of post-transplant MRD remains unclear. **Methods:** In this prospective real-world study, MRD was evaluated using highly sensitive MFC before and after HSCT (on days +30, +60, and +100) in 77 patients with acute leukemias to investigate MRD kinetics and their impact on outcomes. 106 B-ALL patients were also assessed for genetic subtypes, clinical features, and phenotypic markers. In Ph+ ALL, MFC was compared with *BCR::ABL1* quantification by real-time quantitative PCR (RQ-PCR) to validate its local applicability. **Results:** Pre-transplant MRD was assessed in 77 patients, identifying 42 MRD-negative (MRD-) and 35 MRD-positive (MRD+) individuals. MRD+ status correlated with inferior outcomes: overall survival (OS) was 87.9% in MRD- vs. 54.0% in MRD+ patients, and event-free survival (EFS) was 85.3% vs. 51.1% ($p = 0.001$). Relapse incidence was higher in MRD+ patients (17.5% vs. 2.6%; $p = 0.049$), as was non-relapse mortality (NRM: 31.4% vs. 12.1%; $p = 0.019$). Relapses occurred in eight MRD+ (22.9%) and three MRD- patients (7.1%) post-HSCT ($p = 0.02$). Post-transplant MRD was assessed in 30 patients on day +30, 27 on day +60, and 60 on day +100. Persistent MRD on day +100 and advanced disease status were associated with lower OS and EFS and higher relapse risk. NRM was also higher in MRD+ cases, both in ALL (50.0% vs. 18.9%) and AML (21.7% vs. 0.0%; $p = 0.0158$). In Ph+ ALL, there was strong concordance between MFC and RQ-PCR results. Correlation between blast percentages by MFC and *BCR::ABL1* transcript levels was high ($r = 0.7801$; 95% CI: 0.69–0.84; $p < 0.001$), with 88% agreement ($\kappa = 0.761$). MFC detected MRD in 82.9% of samples with transcript levels $>0.01\%$. Phenotypically, Ph+ ALL cases frequently exhibited CD34+CD38-/dim blasts (77.7% vs. 20.2% in other B-ALL subtypes; $p < 0.0001$) and showed higher expression of CD66c/CD73/CD304 combinations (all $p < 0.001$). **Conclusions:** High-sensitive MFC showed comparable performance to RQ-PCR and can serve as a complementary method for MRD monitoring in acute leukemia, including Ph+ ALL. Pre-HSCT MRD effectively identified patients at high risk of poor outcomes, while MRD persistence on day +100 predicted a relapse. These findings support the importance of incorporating peri-transplant MRD kinetics into the routine management of acute leukemias, particularly in low- and middle-income countries.

Keywords: minimal residual disease, acute lymphoblastic leukemia, acute myeloid leukemia, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, flow cytometry, biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Morfologia das Leucemias Linfoblásticas Agudas L1, L2 e L3	p.25
Figura 2	Fatores que podem influenciar a detecção da Doença Residual Mínima / Mensurável nas Leucemias Agudas.	p.33
Figura 3	Cinética da DRM antes e após o Transplante de Células-tronco Hematopoiéticas.	p.38
Figura 4	Métodos para detecção da Doença Residual Mínima / Mensurável nas Leucemias Agudas.	p.40
Figura 5	Estágios de Maturação dos linfócitos B	p.45
Figura 6	Exemplo ilustrativo de DRM negativa e curva de maturação normal	p.46
Figura 7	Exemplo ilustrativo de DRM de LLA-B positiva com LAIP	p.48
Figura 8	Fases de implantação do projeto PRONON	p.52
Figura 9	Correlação Genética e Idade	p.57
Figura 10	Exemplo ilustrativo de DRM de LLA-B negativa	p.59
Figura 11	Exemplo ilustrativo de DRM em material hipocelular	p.60
Figura 12	Correlação entre os citômetros FACSCanto II™ e FACSLyric™	p.63
Figura 13	Correlação entre Citometria de Fluxo e Biologia Molecular	p.68

Manuscripto 1

FIGURE 1	Flow chart of patients included in the study showing peri-transplant MRD kinetic	p. 95
FIGURE 2	Overall survival curves (Kaplan-Meier)	p.96
Supplementary Figure S1	Kaplan-Meier analysis employing a landmark approach at day 100	p. 97

Manuscripto 2

Figure 1	Distribution of available recurrent genetic alterations between children and adult cohorts.	p.110
Figure 2	Heatmap illustrates the correlation between genetic alterations and maturation phenotypes	p.112
Figure 3	Representative MRD flow cytometry plots and APS1 view	p.113
Figure 4	Heatmap illustrating the correlation between genetic alterations and LAIP phenotypes	p.115
Figure 5	Scatter plots show a correlation between the percentage of blasts detected by multiparameter flow cytometry (MFC) and BCR::ABL1 transcript.	p.116
Figure 6	An illustrative example of a positive MRD case where maturation markers and the APS strategy	P.125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anormalidades Genéticas Estruturais e Características Fenotípicas das LLA-B	p.29
Tabela 2: Fatores de risco prognósticos e preditivos na LLA	p.32
Tabela 3: Comparação das metodologias de pesquisa de DRM para leucemias agudas	p.42
Tabela 4: Pannel de anticorpos monoclonais de 8 e 10 cores comparativo das LLA-B	p.62
Tabela 5: Sensibilidade do Método e Limites Inferiores de Detecção e Quantificação	p.65
Tabela 6: Número de células adquiridas por tubo nos diferentes momentos do TCTH.	p.66

MANUSCRITO 1

Table 1: Demographic and clinical characteristics according to pre-HCT MRD- vs MRD+	P.93
Table 2: Post-transplant events according to pre-HCT MRD- vs MRD+	p.94
Table 3: Outcomes according to pre-transplant negative or positive MRD status	p.94
Supplementary Table S1: Flow cytometry staining 8-color tubes panel designed to the leukemia diagnostic type (B-cell, T-cell, and myeloid leukemia).	p.98
Supplementary Table S2: Clinical and biological characteristics of MRD-positive patients	p.99
Supplementary Table S3: Univariate Analysis	p.104
Supplementary Table S4: Contingency table	p.105

MANUSCRITO 2

Table 1. Immunophenotypic differences between Ph+ ALL cases and other B-ALL	p.114
Table 2. Revision of discrepant cases between FCM-MRD and PCR-MRD	p.117
Supplementary Table S1	p.133
Supplementary Table S2	p.134
Supplementary Table S3	p.135
Supplementary Table S4	p.136
Supplementary Table S5	p.136

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AcMo	Anticorpo monoclonal
APC	do inglês “allophycocyanin” ou Fluorocromo Aloficocianina
APC-H7	do inglês “allophycocyanin” ou Fluorocromo Aloficocianina-H7
APS	do inglês “Automatic population separation”
ATG	do inglês “anti-thymocyte-globulin” ou globulina anti-timócito
BCP-ALL	do inglês “B-cell precursor acute leukemia” ou Leucemia de células precursoras linfoides B.
CD	do inglês “Cluster differentiation” ou grupamento de diferenciação
CFA	Ciclofosfamida
CFM	Citometria Fluxo
UFPR	Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
CMV	Citomegalovírus
CTL	Células-Tronco Leucêmicas
CSA	Ciclosporina
CTH	Célula-Tronco Hematopoiética
DECH	Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro
DifN	do inglês “Different from normal” ou diferente do normal
DNA	do inglês “Deoxyribonucleic Acid” ou Ácido desoxirribonucleico
DRM	Doença Residual Mínima ou Mensurável
FACS	do inglês “Fluorescence-Activated Cell Sorter”
FITC	do inglês “Fluorescein Isothiocyanate” ou Isotiocianato de fluoresceína
FSC	do inglês “Forward Scatter” ou dispersão frontal
G-CSF	do inglês Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos
HLA	do inglês “Human Leokocyte Antigens” ou antígeno leucocitária humano
ICR	Incidência Cumulativa de Recaída
ICC	International Consensus Classification
Ig/TCR	do inglês “Immunoglobulin/TCR rearrangement”
IgH	Immunoglobulina cadeia pesada
INCA	Instituto Nacional do Câncer

LA	Leucemia Aguda
LAIP	do inglês <i>Leukemia-associated immunophenotype</i> ou imunofenótipo associado à leucemia
LLA-B	Leucemia Linfoblástica Aguda B
LLA-T	Leucemia Linfoblástica Aguda T
ETP-LLA	do inglês "Early-T", ou leucemia de células T precursoras
LLA Ph+	Leucemia linfoblástica aguda associada ao cromossomo Philadelphia
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
LoD / LID	Do inglês "Limit of detection" ou Limite Inferior de detecção
LLoQ / LIQ	Do inglês "Lower limit of quantification" ou Limite Inferior de quantificação
LSC	do inglês "Leukemic Stem Cell" ou célula-tronco leucêmica
MNRR	Mortalidade não relacionada à recidiva
MO	Medula óssea
MMF	Micofelonato de Mofetila
MTX	Metotrexato
MSC	Do inglês "Mesenchimal Stem Cell" ou célula-tronco mesenquimal
NGS	do inglês "Next Generation Sequency", ou sequenciamento de nova geração
NRM	do inglês "non-relapse mortality" ou mortalidade não relacionada à recaída.
PBS	do inglês "Phosphate-buffered solution" ou tampão salina fosfato
PE	do inglês "Phycoerythrin" ou Fluorocromo Ficoeritrina
PECy7	Fluorocromo Ficoeritrina associado à Cyanina 7
PERCPCy5.5	do inglês "Peridinin-chlorophyll Protein Complex" 5.5
PRONON	Programa Nacional de Apoio à Oncologia
RQ-PCR	do inglês "Polymerase Chain Reaction" ou reação em cadeia da polimerase quantitativa
MS	Ministério da Saúde
Pós-TCTH	Pós transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas
Pré-TCTH	Pré transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas
RC	Remissão Completa

RNA	Ácido Ribonucleico
SG	Sobrevida Global
SLE	Sobrevida Livre de Eventos
SSC	do inglês “Side Scatter” ou dispersão lateral
TCTH	Transplante de Célula-Tronco Hematopoiética
TBI	do inglês “Total Body Irradiation” ou Irradiação Corporal Total
TCR	do inglês “T cell receptor”, ou receptor de célula T
V450	Fluorocromo violeta V450
V500	Fluorocromo violeta V500
VPP	Valor preditivo positivo
VPN	Valor preditivo negativo

LISTA DE SÍMBOLOS

μL	Microlitro
™	Trademark
®	Marca Registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1	LEUCEMIAS AGUDAS	24
2.1.1	Definição e etiologia.....	24
2.1.2	Epidemiologia.....	25
2.1.3	Diagnóstico Laboratorial das Leucemias Agudas.....	25
2.1.3.1	Classificação Imunológica das Leucemias Linfoblásticas Agudas	26
2.1.3.2	Alterações citogenéticas de valor prognóstico na LLA-B.....	27
2.1.3.3	Leucemias Linfoblásticas Agudas Philadelphia Positivo	30
2.2	TRATAMENTO DAS LEUCEMIAS AGUDAS E FATORES DE RISCO	31
2.2.1	Tratamento das Leucemias Agudas	31
2.2.2	Fatores de Risco das Leucemias Agudas	33
2.2.3	Incorporação da DRM nos protocolos de tratamento	34
2.2.4	Momentos para monitoramento da DRM nas Leucemias agudas.....	35
2.2.5	DRM no contexto do Transplante de Células -Tronco Hematopoieticas	36
2.3	DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA – ASPECTOS TÉCNICOS	39
2.3.1	Definição e Sensibilidade	39
2.3.2	Comparação entre os métodos	41
2.3.3	Citometria de Fluxo de Alta Sensibilidade	43
2.3.4	Estratégias de Análise	44
2.3.5	Estratégias de Análise - DifN	44
2.3.6	Estratégias de Análise – LAIP	46
2.3.7	Correlação Imunofenótipo e Alterações Moleculares.....	48
3	JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	50
4	OBJETIVOS	53
5	MATERIAL E MÉTODOS	54
5.1	DESENHO DO ESTUDO E CASUÍSTICA	54
5.1.1	Aspectos éticos	54
5.1.2	Desenho do estudo e População Fonte.....	54
5.1.3	População Estudo Cinética Pré e Pós-TCTH (MANUSCRITO 1).....	55
5.1.4	População do Estudo de Validação (MANUSCRITO 2).....	56
5.2	DEFINIÇÃO DE DOENÇA RESIDUAL MENSURÁVEL	58
5.3	PROCEDIMENTOS TÉCNICOS	61
5.3.1	Padronização dos procedimentos de bancada	61

5.3.2	Padronização da aquisição e performance dos citômetros de fluxo.....	63
5.3.3	Padronização das estratégias de análise imunofenotípica.....	64
5.3.4	Validação da Sensibilidade Analítica	65
5.3.5	Comparação da Citometria de Fluxo com a Biologia Molecular.....	67
5.4	MÉTODOS ESTATÍSTICOS.....	69
6	RESULTADOS.....	70
6.1	MANUSCRITO 1	71
6.2	MANUSCRITO 2	105
5	DISCUSSÃO.....	137
6	CONCLUSÕES.....	143
7	REFERÊNCIAS	144
8	ANEXOS.....	167

1 INTRODUÇÃO

As leucemias agudas são um grupo heterogêneo de doenças hematológicas malignas, caracterizadas pela expansão clonal de células precursoras imaturas do sistema hematopoiético, cujo curso clínico e prognóstico variam dependendo da idade, comorbidades, características genéticas e moleculares (SWERDLOW et al., 2016).

As leucemias agudas são frequentemente tratadas de forma intensiva, com a maioria dos pacientes alcançando remissão completa (RC) após a indução na avaliação morfológica da medula óssea pela microscopia óptica (Shook et al. 2009; Chen and Wood 2022). A persistência de células leucêmicas residuais (blastos) no sangue ou na medula após o tratamento quimioterápico em níveis abaixo da detecção pela morfologia é denominada “**Doença Residual Mínima**” ou mais apropriadamente “**Doença Residual Mensurável**”, a DRM (Campana, 2010; Fuda & Chen, 2018).

Clinicamente a DRM é amplamente reconhecida como fator prognóstico independente, sendo utilizada para caracterizar risco, direcionar o manejo clínico e intensificar o tratamento tanto em pacientes com leucemias linfoblásticas agudas (LLA) (PUI; RELLING; DOWNING, 2004) quanto nas leucemias mieloides agudas (LMA) (SHORT et al., 2020). A detecção de DRM superior a 0,01% ($>10^{-4}$) após indução em LLA tem impacto prognóstico significativo, fato consolidado em uma meta-análise que reuniu mais de 30.000 pacientes com LLA (BERRY et al. 2017).

A detecção da presença de células residuais de leucemias agudas no momento imediatamente anterior ao transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) também tem se mostrado um fator prognóstico independente (BUCKLEY et al., 2017), podendo auxiliar na definição do melhor momento para a realização do procedimento (Czyz & Nagler, 2019). A pesquisa da DRM após o transplante tem sido utilizada na individualização do tratamento e avaliação de risco de recaída (BADER et al., 2019; DíEZ-CAMPELO et al., 2009; SHAH et al., 2014; WANG et al., 2020). No entanto, não há consenso na literatura sobre os melhores momentos para a detecção da DRM pós-transplante e o impacto da alta sensibilidade neste contexto.

Os testes mais frequentemente utilizados para identificar DRM em leucemias agudas são a imunofenotipagem por citometria de fluxo multiparamétrica (CFM) e a amplificação da reação em cadeia da polimerase (PCR) dos genes dos receptores de imunoglobulina (IgH) e do TCR, além da reação em cadeia da polimerase quantitativa (RQ-PCR) realizada para os genes

de fusão, como o *BCR::ABL1*, quando presentes (LADETTO et al., 2019; NEALE et al., 2004; VAN DONGEN et al., 2015). Os métodos moleculares baseados na PCR, embora apresentem alta sensibilidade possuem limitações como alto custo e complexidade técnica, risco de contaminação cruzada e resultados falso-negativos devido à ocorrência de rearranjos secundários (CROSS et al., 2023; SZCZEPARŃSKI et al., 2002).

Embora a quantificação de transcritos *BCR::ABL1* seja o padrão na LLA Philadelphia-positiva (LLA Ph+), a citometria de fluxo multiparamétrica (CFM) é amplamente utilizada para pesquisa de DRM nos outros subtipos genéticos-moleculares de LLA. Entretanto, as limitações encontradas na citometria de fluxo tradicional (com quatro a seis cores) como baixo número de células disponíveis em algumas amostras, a similaridade das células leucêmicas com células normais e com células regenerativas, a modulação de expressão antigênica durante o tratamento, como no uso de corticoide e metotrexato impedem o seu uso como primeira escolha na maioria das leucemias (DWORZAK et al., 2002; GAIPA et al., 2008; LUCIO et al., 2001; ROCHA et al., 2019; VAN DONGEN et al., 2015; VAN WERING et al., 2000). Nos últimos anos, contudo, a citometria de fluxo tem passado por uma evolução significativa, impulsionada por fatores que aumentaram sua sensibilidade, como o uso de citômetros com capacidade de detecção de oito a dez cores, ampliação do número de eventos celulares adquiridos e dos marcadores utilizados (SINGH et al., 2022; THEUNISSEN et al., 2017c).

O grupo EuroFlow™ introduziu em 2017 um método completamente padronizado para detecção de DRM em LLA-B, combinando sete marcadores de maturação (CD19, CD10, CD34, CD20, CD38, CD45 e CD81) e quatro novos marcadores de fenótipo anômalo (CD66c/CD123 e CD73/CD304). Este método apresentou aplicabilidade em mais de 98% dos pacientes avaliados na fase de pós indução de remissão, e foi possível o aumento da sensibilidade semelhante aos métodos moleculares (até 10^{-5} ou até 10^{-6}) quando um número suficiente (maior que 4.000.000 de células viáveis) é analisado (THEUNISSEN et al., 2017a). A implementação dessa abordagem tem favorecido a comparação inter-laboratorial, viabilizando maior reprodutibilidade dos resultados (IKOMA-COLTURATO et al., 2023).

Embora a via de maturação das células B seja bem descrita em crianças e adultos normais e após quimioterapia para leucemias agudas, há poucos estudos na literatura sobre a regeneração de células B após o transplante, assim como poucos estudos detalhando o microambiente da medula óssea em regeneração neste cenário (BENGTTSSON et al., 1989; TEMBHARE et al., 2020).

Neste contexto, o presente trabalho se propõe à **introdução e padronização da técnica de citometria de fluxo de alta sensibilidade** (oito a 10 cores) no nosso meio, permitindo a uniformização dos métodos diagnósticos e de monitoramento das doenças hematológicas malignas nos pacientes avaliados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR).

O estudo consiste na avaliação da presença de Doença Residual Mínima / Mensurável (DRM) nos momentos após o tratamento de indução, antes e após o transplante de células-tronco hematopoiética (TCTH).

O objetivo principal foi avaliar o impacto da presença de DRM positiva na sobrevida global e recaída pós-transplante nos subgrupos tratados, tanto em leucemia linfoblástica como leucemias mieloides agudas. Paralelamente o foco deste trabalho foi o aumentar a sensibilidade do método nos casos de LLA-B, e validar localmente a técnica comparando com o método de biologia molecular disponível (PCR para BCR::ABL1 nos casos de LLA Ph+).

2.1 LEUCEMIAS AGUDAS

2.1.1 Definição e etiologia

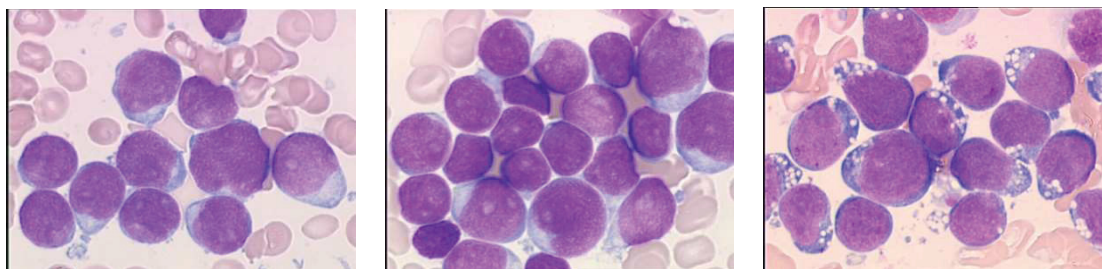
As leucemias agudas são neoplasias da linhagem hematopoiética que surgem da expansão clonal desregulada de células progenitoras linfoides ou mieloides, as quais são bloqueadas em um determinado estágio de maturação ou diferenciação celular (BÉNÉ, 2005). Estas patologias são causadas por alterações genéticas derivadas de rearranjos cromossômicos estruturais, aneuploidia ou mutações cooperativas em genes que codificam fatores de transcrição que regulam o desenvolvimento linfoide, supressores de tumores, proteínas de progressão do ciclo celular e modificadores epigenéticos (MRÓZEK; HEEREMA; BLOOMFIELD, 2004; SHIBA, 2023).

A mutações levam à transformação de uma célula normal em uma célula clonal, a qual perde a capacidade de morrer (*apoptose*) ou de amadurecer (*diferenciação*). As células anômalas passam a se multiplicar infinitamente gerando populações de células clonais que não são capazes de exercer sua função normal, e infiltram a medula óssea (MO), sangue periférico (SP) ou outros tecidos (por exemplo, linfonodos do mediastino e timo). Os diversos subtipos genéticos e moleculares gerados se relacionam com as características clínicas, morfológicas e fenotípicas que determinam o comportamento e diferenciação celular (BAIN; ESTCOURT, 2013), e que em última instância se relacionam com o prognóstico da doença (SWERDLOW et al., 2016).

As leucemias agudas podem se originar de células precursoras linfoides B (Leucemia Linfoblástica Aguda B: LLA-B) ou T (Leucemia Linfoblástica Aguda T: LLA-T) (GÖKBUGET et al., 2024; TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017), ou ainda de células precursoras da linhagem mieloide (Leucemia Mieloide Aguda: LMA) (DÖHNER et al., 2017). A morfologia varia pouco entre os tipos de leucemias agudas B e T, sendo mais prevalente os subtipos L1 e L2. O subtipo L3, com vacúolos e citoplasma mais basofílico ocorre predominantemente na LLA madura, associada à translocação (8;14), ou seja, na forma leucêmica do Linfoma de Burkitt.

A figura 1 ilustra o padrão morfológico dos subtipos de LLA.

Figura 1: Morfologia das Leucemias Linfoblásticas Agudas L1, L2 e L3



Fonte: Autor do trabalho. Fotografias de imagens de microscópio óptico (aumento 1000x) de casos de leucemia linfoblástica aguda L1, L2 e L3.

2.1.2 Epidemiologia

O número estimado de casos novos de leucemia para o Brasil segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) é de 11.540 casos para cada ano no triênio de 2023 a 2025, o que corresponde a 5,33 casos por 100 mil habitantes. Apesar de relativamente rara, já que correspondem a cerca de 2,5% das neoplasias, as leucemias são responsáveis por uma alta taxa de mortalidade/letalidade. Ainda segundo o INCA, em 2020, ocorreram no Brasil 6.738 óbitos por leucemia (3,18 por 100 mil) (INCA, 2022).

Embora a LLA seja mais comum em crianças, esta representa aproximadamente 20% das leucemias agudas em adultos (BROWN et al., 2021). A LLA-B representa 75% a 80% dos casos de LLA, e a LLA-T ocorre em 20% a 25% das leucemias linfoblásticas agudas em adultos ou crianças. A LLA associada ao cromossoma Philadelphia (LLA Ph+) é observada em 2–5% dos casos pediátricos e 15–25% dos adultos (FOÀ; CHIARETTI, 2022). As leucemias mieloides agudas (LMA) constituem um subgrupo ainda mais heterogêneo da doença que pode ocorrer em qualquer idade, mas é mais prevalente em adultos e idosos (SHUMILOV et al., 2018).

2.1.3 Diagnóstico Laboratorial das Leucemias Agudas

Assim como o tratamento, os métodos utilizados para diagnóstico e as formas de acompanhamento das neoplasias do sistema hematopoiético tem evoluído rapidamente nos últimos anos. A distinção entre os subtipos de leucemias é realizada classicamente pela microscopia óptica com o auxílio de técnicas de citoquímica como a pesquisa de mieloperoxidase (MPO), além da expressão de marcadores fenotípicos individuais que foram inicialmente avaliados por técnicas microscópicas básicas como a imunofluorescência direta (Béné 2005).

Desde a década de 1990, porém, a imunofenotipagem por citometria de fluxo tornou-se uma ferramenta fundamental para o diagnóstico, classificação, estadiamento e monitorização da resposta ao tratamento de doenças hematológicas e imunológicas(ROBINSON et al., 2023; VAN DONGEN; ORFAO, 2012). Isto porque a compreensão detalhada dos padrões fenotípicos de diferenciação celular permite uma classificação mais precisa dos subtipos de leucemia do que quando se utiliza apenas a morfologia(BAIN; ESTCOURT, 2013; ORFAO et al., 2019).

As classificações das leucemias agudas baseadas na diferenciação da célula de origem utilizadas frequentemente são limitadas no seu valor prognóstico(KULIS et al., 2022). A citogenética e a genética molecular parecem ser mais específicas para identificar doenças com prognóstico e comportamento clínico distinto tanto em LLA(DUFFIELD; MULLIGHAN; BOROWITZ, 2023), quanto em LMA (DÖHNER et al., 2022; JEHA et al., 2021; KIM et al., 2023b).

Assim, a Organização Mundial da Saúde (OMS) define os subtipos de leucemia com base nas aberrações genéticas específicas, particularmente translocações cromossômicas, aneuploidias e rearranjos intersticiais que criam genes de fusão(ALAGGIO et al., 2022; SWERDLOW et al., 2016), classificando os pacientes conforme as alterações clonais com significância prognóstica (CREE, 2022).

2.1.3.1 Classificação Imunológica das Leucemias Linfoblásticas Agudas

Diferentemente da avaliação morfológica padrão, a imunofenotipagem permite uma discriminação mais confiável e específica das células progenitoras normais (hematogônias) vistas na recuperação pós quimioterapia da medula óssea, em comparação com os progenitores leucêmicos anômalos (linfoblastos) que representam a persistência da doença(COUSTAN-SMITH et al., 2011). Esta técnica utiliza a estratégia de comparação da maturação normal das células hematopoiéticas com fenótipos caracteristicamente anômalos (ORFAO et al., 2019; OUYANG et al., 2019).

O conhecimento da hematopoese normal e dos padrões de expressão antigênica dos diversos marcadores celulares permite a diferenciação entre células normais versus as células patológicas. Os precursores normais dos linfócitos, também conhecidos como hematogônias, passam por um processo natural de maturação caracterizado por modificações sequenciais na expressão de antígenos celulares. No entanto, em casos de neoplasia, esses padrões normais são interrompidos, resultando em perfis fenotípicos distintos daqueles observados na medula óssea saudável (ORFAO et al., 2019).

Baseado nestes perfis, a classificação das leucemias agudas, estabelecida pelo grupo EGIL em 1999 (Béné, 2005; Duffield et al., 2023), categoriza a LLA-B em quatro estágios de diferenciação com base na expressão de marcadores de maturidade nas células avaliadas por citometria de fluxo: LLA pró-B (BI), LLA-B comum (BII), LLA pré-B (BIII) e LLA-B madura (BIV).

No caso da LLA-T, a classificação subdivide a doença considerando a expressão dos marcadores CD3 citoplasmático e de membrana, CD7. Outros marcadores de superfície, como CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5 e CD8 e os receptores de TCR $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ podem ser expressos em intensidades variáveis. A classificação em pró-T (TI), pré-T (TII), T cortical (TIII) e T madura (TIV) no subtipo LLA-T é baseada nesses marcadores. Um subtipo específico, a LLA-T precursora (Early T-Precursor – ETP), caracteriza-se pela expressão fraca ou ausente de CD5, acompanhada da presença de pelo menos um marcador mieloide, como CD34, CD117, CD65 ou CD11c (Swerdlow et al., 2016). A ETP apresenta um prognóstico bastante sombrio, sendo considerada de alto risco na maioria dos protocolos avaliados (Wood et al. 2023).

As leucemias agudas de fenótipo misto (do inglês mixed phenotype leukemia, MPAL) são caracterizadas pela expressão de marcadores de linhagens distintas, sendo definida pela presença simultânea de mieloperoxidase e forte expressão de CD79a/CD19 (B/Mieloide) ou mieloperoxidase citoplasmática e CD3 (T/Mieloide) na mesma célula neoplásica (SWERDLOW et al., 2016).

2.1.3.2 Alterações citogenéticas de valor prognóstico na LLA-B

As anormalidades citogenéticas favoráveis (baixo risco) associadas à LLA de precursores B são a hiperdiploidia (presença de mais de 50 cromossomos) e a translocação t(12;21) com expressão do transcrito ETV6::RUNX1, além das mutações nos genes *DUX4* e *PAX5*. A hiperdiploidia parece aumentar a sensibilidade dos blastos à quimioterapia, levando à apoptose quando acumulam altas doses de metotrexato (QIU et al., 2021). Em contraste, a translocação t(1;19) / fusão *E2A::PBX1*, que se caracteriza por expressar a cadeia pesada da imunoglobulina citoplasmática (cyIgM) além do CD10, e parece ter um prognóstico ruim com dose convencional de quimioterapia. Entretanto, foram observados excelentes resultados quando utilizados esquemas agressivos de quimioterapia, com sobrevida livre de eventos maior que 90% em vários estudos (HUNGER; MULLIGHAN, 2015).

As leucemias linfoblásticas agudas pró-B (BI) são caracterizadas pela perda de expressão de CD10 e CD20, expressão anômala de CD15 e ganho da proteína 7.1 (Ng2),

representam cerca de 5% dos casos de LLA pediátrica. Este subtipo está associado à presença da translocação t(4;11), que leva a fusão *MLL::AF4* ou *KMT2A::AF4*, e é indicativa de muito pior diagnóstico em crianças abaixo de 1 ano, comparando com as acima de 1 ano de idade (MEYER et al., 2018; POPOV et al., 2023a). Pacientes adultos com alterações relacionadas ao *KMT2A* também se caracterizam por altíssimo risco se não forem submetidos ao transplante de células-tronco (MEYER et al., 2023).

Para além desses subtipos clássicos mais frequentes, a introdução de técnicas avançadas de sequenciamento de DNA permitiu a identificação de novas alterações genéticas como *IKZF1*, *ZNF384* e *PAX5*. Esta técnica tem proporcionado a expansão da aplicabilidade da genética molecular nessa patologia (ALGHANDOUR; SAKR; SHAABAN, 2023; HIRABAYASHI et al., 2017). O termo LLA “Philadelphia-like” ou “*BCR::ABL-like*” (LLA Ph-like) foi introduzido para descrever um subtipo de LLA que apresenta diferentes alterações moleculares, como deleções no gene *IKARUS* e rearranjos entre o gene *CRLF2* e proteínas quinase, como *JAK2* e *ALK*. Embora não expresse o gene de fusão *BCR::ABL*, a LLA *Ph-like* comporta-se de forma semelhante aos verdadeiros casos positivos para *BCR::ABL1*, sendo que a maioria dos casos está associada a uma elevada contagem de glóbulos brancos ao diagnóstico, a presença de DRM detectada após a terapêutica de indução e a uma alta taxa de recaída (TASIAN; LOH; HUNGER, 2017).

A Tabela 1 mostra as anormalidades genéticas estruturais mais frequentes em LLA-B e as características fenotípica associadas.

Tabela 1: Anormalidades genéticas estruturais e características fenotípicas mais comuns em LLA-B

Transcrito	Função	Especificidades	Fenótipo associado*
Baixo risco			
t(12;21)(q21;q23) ou ETV6::RUNX1 (antiga TEL::AML1)	Regulação da transcrição e fosforilação	LLA de baixo risco em crianças, responde bem à asparaginase	Pré-B comum CD10++ com CD73+ e CD304+ eventual; ausência de CD9, CD20 e CD66c.
Alta hiperdiploidia trissomias do 4, 11, 8 etc.	iAMP21 comum	Baixo risco pois responde bem a altas doses de metotrexate.	Pré-B comum CD10++ e CD123+
Risco intermediário			
t(1;19)(q23;p13) ou E2A::PBX1 ou TCF3::PBX1	Fator de transcrição	LLA risco intermediário em crianças, responde bem a doses altas de quimioterapia	Pré-B CD10+ e cyIgM+; CD9++ e CD34++ fortes, e negativos para CD73 e CD304
Alto risco			
t(4;11)(q21;q23) ou MLL::AF4 ou KMT2A	Regulação da transcrição celular	LLA altíssimo risco em crianças menores de um ano; possibilidade de switch para linhagem monocitoide.	Pró-B com CD10 e CD20; negativos, CD15+ e Ng2+; CD66c+
t(9;22)(q34;q11) ou BCR::ABL1 e1a2/p190 ou e13-e14a2/p210	Atividade tirosina quinase dependente de ciclina	Alto risco, comum em adultos, frequente associação do p190 com LMC-CB	Pré-B comum CD10+ com expressão anômala variável de CD25, CD66c, CD304, CD123 e CD73
Hipodiploidia: Várias deleções em uma única célula	Desregula apoptose	Deleções e mutações em vias de mal prognóstico como proto-oncogenes (p53, p16)	Pré-B
IKZF1 deleções / fusões CRLF2: Várias mutações e deleções como cromossoma 14, 7, 22, etc.	Deleções em vias de quinase (ABL e JAK) e translocação com CRLF2	Atividade tirosina-quinase ABL ou JAK, com pior resposta à quimioterapia convencional. Prevalente em adultos	CRLF+

Legenda: * Marcadores variáveis nos diversos estudos. Fonte: da Autora.

2.1.3.3 Leucemias Linfoblásticas Agudas Philadelphia Positivo

As LLA positivas para o gene *BCR::ABL1*, conhecido como cromossoma "Philadelphia" (LLA Ph⁺), são consideradas leucemias de altíssimo risco (KIM et al., 2023b). Entretanto, a introdução dos inibidores de tirosina-quinase (TKI) como terapia alvo modificou essa perspectiva (FOÀ; CHIARETTI, 2022). Em crianças as LLA Ph⁺ foram reclassificadas recentemente como doenças de risco intermediário (JEHA et al., 2021), e em adultos os esquemas livres de quimioterapia em adultos estão sendo testados com ótimo resultado (VAN DER SLUIS et al., 2023).

A maioria das quebras genômicas associadas ao cromossoma Philadelphia ocorre em duas regiões do BCR - Major e Minor - levando às proteínas de fusão p210 (e13a2 ou e14a2) e p190 (e1a2), respectivamente. Esta diferença parece estar associada à diferenciação biológica entre as LLA Ph⁺ "de novo" e a crise blástica de Leucemia Mieloide Crônica (LMC-CB). Ambas, no entanto parecem estar associadas ao subtipo fenotípico LLA-B comum, com CD10+ forte.

Um estudo recente de perfil molecular identificou três subtipos transcriptômicos distintos na LLA-B *BCR::ABL1*-positiva, cada um representando um bloqueio maturacional em um estágio da diferenciação dos progenitores B, com eventos genômicos específicos em cada ponto de transição no desenvolvimento das células B. Os bloqueios mais precoces foram associados à plasticidade de linhagem, refratariedade ao tratamento e piores desfechos clínicos, enquanto os bloqueios tardios foram correlacionados à fidelidade de linhagem, remissões duradouras e melhor prognóstico (KIM et al., 2023a; SHI et al., 2022).

2.2 TRATAMENTO DAS LEUCEMIAS AGUDAS E FATORES DE RISCO

2.2.1 Tratamento das Leucemias Agudas

As leucemias agudas são geralmente tratadas de forma intensiva com protocolos que incorporaram a terapêutica adaptada ao risco biológico (PUI; EVANS, 2013; ZLOTNICKI; HASTINGS, 2023), nos quais o transplante alogênico pode ser utilizado como consolidação nos pacientes de alto risco (PAVLŮ et al., 2019a; ROCHA et al., 2021). No entanto, a ampla aplicação do TCTH é limitada pela alta incidência de mortalidade relacionada ao tratamento (chegando a 40%) e pelas elevadas taxas de doença do enxerto contra o hospedeiro aguda e crônica (GYURKOCZA; REZVANI; STORB, 2010; SIMIONE et al., 2023).

Os protocolos quimioterápicos adaptados ao risco utilizam uma abordagem personalizada, em que fatores prognósticos relacionados ao paciente, como idade e performance, e relacionados à doença, como características genético-moleculares e relacionados ao tratamento, são utilizados para estimar o risco de recidiva individual e ajustar a intensidade do tratamento (BADER et al., 2019).

Esses protocolos incorporam características dinâmicas da doença, como a velocidade de resposta aos agentes quimioterápicos, como a medida da presença de blastos no sangue periférico no oitavo dia (D8) e na medula óssea no 15º dia da indução. Esta estratégia permite a alocação dos pacientes nos diferentes esquemas de quimioterapia, principalmente no caso dos pacientes pediátricos (DWORZAK et al., 2018; ROCHA et al., 2019; VAN DER SLUIS et al., 2023).

O refinamento da avaliação medular com técnicas muito sensíveis, que evidenciam a presença de células patológicas que não são detectados por morfologia convencional, ou seja, a DRM, tem sido incluída como fator de risco em todos os cenários das leucemias agudas. De fato, como a maioria dos pacientes alcança remissão morfológica completa após a terapia de indução, a avaliação dinâmica da persistência de células leucêmicas residuais ao longo do tratamento tornou-se um pilar fundamental na gestão da LLA (GAO et al., 2023; VAN DONGEN et al., 2015).

A Tabela 2 sumariza os fatores de risco prognósticos na LLA.

Tabela 2: Fatores de risco prognósticos e preditivos na LLA

<i>Fatores</i>	<i>Fatores de risco</i>	<i>Anotações</i>
Relacionados ao paciente		
Idade	Crianças (1-10 anos versus <1 ano)	***
	Adolescentes e adultos jovens (até 30 anos) versus crianças	
	Adultos (>30 anos) versus idosos (>60 anos)	*
Performance (ECOG)	>1	*
Relacionados à doença		
Leucocitose ao diagnóstico	>30 (LLA-B), >100 (LLA-T)	**
Imunofenótipo	Pro-B, Pre-T, Early-T e T-Madura	**
Citogenética e Hibridização in situ (FISH)	t(9;22); t(4;11); hipodiploidia e cariótipo complexo; <i>KMT2Ar</i>	***
Genética molecular	Ph-like, mutações <i>CLRF2/TP53/JAK-STAT</i>	**
Miscelânea	Envolvimento SNC	**
	Atrasos e falhas no tratamento	*
	Farmacogenômica	**
	Microambiente da medula óssea	**
Relacionados ao tratamento		
Sensibilidade ao corticoide (pré-fase)	Mais de 1.000 blastos no sangue periférico D8	&
Clearance precoce dos blastos (medula óssea D15)	D8-D15 ou final da indução > 5% blastos	**
Tempo para resposta completa (número de ciclos)	>1 ciclo (mau respondedor)	**
DRM (molecular ou citometria de fluxo)	DRM positiva no início da indução (D15)	**
	DRM >0,1% ou >0,01% fim da indução (D33-D42)	***
	>=0,01% após consolidação ou pré-TCTH	
	≥0.01% pós-TCTH	

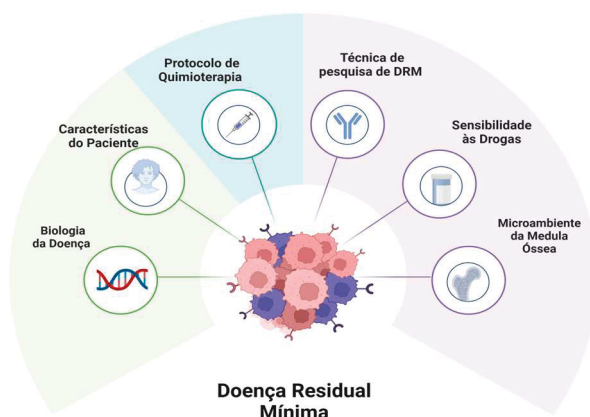
Legenda: * Dado retrospectivo; ** Fatores prognósticos variáveis nos estudos; *** Fatores prognósticos independentes; & Relevância histórica, ocasionalmente considerado. Fonte: da Autora, adaptado de Gao 2023.

2.2.2 Fatores de Risco das Leucemias Agudas

A diversidade na evolução dos pacientes com leucemias agudas tem sido atribuída à resistência às drogas utilizadas ou ao comprometimento de células que possuem anormalidades genéticas específicas (Jeha et al., 2021; Terwilliger & Abdul-Hay, 2017). Além disso, as diferenças biológicas entre crianças e adultos, por exemplo, parecem ter grande importância na evolução clínica e prognóstico (PLASSCHAERT et al., 2004; PUI et al., 2011). Fatores relacionados ao tipo de protocolo utilizado ou até adesão ao protocolo sem falhas ou intolerância (GÖKBUGET et al., 2024) também podem influenciar o prognóstico dos pacientes.

Na prática, todos os fatores prognósticos avaliados em pacientes com leucemias agudas estão inter-relacionados, como ilustrado na Figura 2. Na LLA-B, por exemplo, a presença de DRM após a terapia de indução está frequentemente associada a anomalias citogenéticas de mau prognóstico, como os rearranjos *BCR::ABL1* e *KMT2A* (JEHA et al., 2021).

Figura 2: Fatores que podem influenciar a detecção da Doença Residual Mínima / Mensurável nas Leucemias Agudas.



Fonte: Autor do trabalho. Descrição: Imagem criada com BioRender, demonstrando os diversos fatores que podem influenciar a detecção da Doença Residual Mínima nas leucemias agudas após um tratamento quimioterápico.

2.2.3 Incorporação da DRM nos protocolos de tratamento

Nas leucemias agudas a avaliação de DRM é considerada um poderoso “biomarcador” da presença de doença, tendo aplicação na definição de prognóstico, estratificação de risco, intensificação de tratamento, indicação de transplante e no seguimento clínico (BASSAN et al., 2019; BERRY et al., 2017; BUCKLEY et al., 2017; SHEN et al., 2018; SHORT et al., 2020).

Um estudo retrospectivo do St Jude demonstrou que a sobrevida em cinco anos na população pediátrica aumentou de 21% na década de 1960 para 94% em 2017 com a incorporação dos fatores de risco nos protocolos de tratamento (INABA; MULLIGHAN, 2020). Nos pacientes adultos, no entanto, apesar da inclusão de novas drogas e da incorporação de protocolos com quimioterapia intensiva inspirados nos modelos pediátricos, a taxa de sobrevida tem permanecido entre 65% e 80% (LARSON et al., 1998; THOMAS et al., 2004).

Potter e colaboradores utilizaram o termo Doença Residual Mínima como uma condição que ocorre em um nível subclínico, não sendo detectável por métodos convencionais de avaliação. Esse grupo estabeleceu uma correlação entre a presença de DRM e desfechos clínicos, como o risco de recidivas futuras. Em um estudo retrospectivo envolvendo 14 crianças com LLA-B, a DRM foi avaliada no dia 28, na semana 12 e/ou na semana 20, e ao final do tratamento, por meio da amplificação por PCR da região da cadeia pesada da imunoglobulina (IGH). Dentre as 14 crianças, sete atingiram remissão clínica/morfológica completa, enquanto as outras sete apresentaram recaída. As amostras de medula óssea de todos os pacientes foram positivas para DRM no dia 28. No entanto, nos pacientes que permaneceram em remissão, a DRM tornou-se indetectável ao final do tratamento, ao passo que, nos pacientes que sofreram recaída, os níveis de DRM permaneceram detectáveis (POTTER; STEWARD; OAKHILL, 1993).

Já na década de 1990 a análise da DRM para avaliação da resposta aos tratamentos instituídos foi incluída nos protocolos pediátricos pelo grupo alemão BFM (Berlin-Frankfurt-Munich), tanto em pacientes com LLA recém diagnosticada - ALL-BFM 86 (REITER et al., 1994), ALL-BFM 2000 (LAUTEN et al., 2012) e ALL-BFM 2009 (CAMPBELL et al., 2023), quanto em LLA recaída ou refratária, nos protocolos ALL-REZ BFM 2002e IntReALL 2010(BADER et al., 2009). Nestes protocolos de tratamento a DRM era medida pela quantificação do rearranjo Ig/TCR por técnicas moleculares (VAN DER VELDEN et al., 2007) nos momentos pós indução (D33, D78), pós consolidação (semana 12) ou nas suspeitas de recaída.

A citometria de fluxo como estratégia de pesquisa de DRM vem sendo utilizada desde o início dos anos 2000 por diversos grupos de pesquisa internacionais (CIUDAD et al., 1999; COUSTAN-SMITH et al., 2002a; COUSTAN-SMITH; CAMPANA, 2010; CZUCZMAN et al., 1999; LUCIO et al., 2001; NEALE et al., 2004), porém só foi integrada ao protocolo BFM 2009 (LAUTEN et al., 2012) no D15 e nas suspeitas de recaída após o ano 2010 (DWORZAK et al., 2018). O uso da citometria de fluxo foi mais precoce nos estudos americanos como do grupo Cancer and Oncology Group (COG) (DAVIES et al., 2008) e do hospital Saint Jude já a partir do ano de 2008 (PUI et al., 2010). Apenas a partir de 2017, o grupo EuroFlow™ propôs uma estratégia inovadora para a pesquisa de DRM por citometria de fluxo de alta sensibilidade utilizando um protocolo de 8 cores altamente sensível para DRM de LLA-B. Outros grupos também iniciaram pesquisas com painéis de 8, 10 e 12 cores tanto nas leucemias linfoides (JAFARI et al., 2018; SINGH et al., 2022) quanto mieloides (HEUSER et al., 2021) .

2.2.4 Momentos para monitoramento da DRM nas Leucemias agudas

O monitoramento da DRM é geralmente realizado em momentos diferentes durante a terapêutica das leucemias agudas (ROSSI et al., 2015; RYAN et al., 2009), com especificidades e interpretações diferentes, que são dissecadas a seguir.

A DRM detectada após quimioterapia de indução é altamente preditiva de recaída em doentes tratados para LLA (BOROWITZ et al., 2008, 2022; CAVÉ et al., 1998), principalmente quando detectada ao final da terapia de indução de remissão (BASSAN et al., 2014; COUSTAN-SMITH et al., 2002a; DWORZAK et al., 2002; GAIPA et al., 2013; PUI et al., 2004; RAFF et al., 2007; VOLEJNIKOVA et al., 2011). No contexto pediátrico, os pontos temporais iniciais (por exemplo, sangue periférico no dia 8 ou medula óssea no dia 15) são frequentemente avaliados e podem orientar a terapêutica (LAUTEN et al., 2012; PUI et al., 2004; REITER et al., 1994).

A DRM no final da indução também é normalmente avaliada nos protocolos pediátricos e adultos, muitas vezes no dia 29 da terapêutica de indução (BOROWITZ et al., 2015, 2022), sendo preferida amostra de medula óssea devido à sua maior sensibilidade (1-3 logs) em comparação com o sangue (COUSTAN-SMITH et al., 2002b).

Independentemente do método utilizado, vários estudos estabeleceram a importância prognóstica da pesquisa de DRM após a indução na LLA, tanto na população pediátrica como na adulta. Observa-se que o risco de recaída das leucemias agudas é geralmente proporcional ao nível da DRM (BOROWITZ et al., 2015; SCHULTZ et al., 2007). Uma meta-análise avaliou

13.637 pacientes em 39 publicações, sendo 20 estudos na população pediátrica (11.249 pacientes), 16 em adultos (2076 pacientes), e 3 estudos mistos (312 pacientes), confirmando a associação da presença de DRM positiva após a indução com menor sobrevida e sobrevida livre de doença, tanto em populações adultas quanto pediátricas (BERRY et al., 2017). Não surpreendentemente, a técnica de pesquisa de DRM não foi significativamente diferente para o desfecho, confirmando que tanto a análise por biologia molecular quanto a pesquisa de células com imunofenótipo aberrante podem ser utilizadas para identificação de blastos em pacientes com LLA de precursores B ou T (BERRY et al., 2017).

Embora a DRM pós-indução tenha maior implicação prognóstica, o nível de DRM presente em ambos os momentos (pós-indução ou pós consolidação) pode ser utilizado para a estratificação do risco e para a intensificação ou redução da terapêutica, uma vez que ambos os dados têm apresentado significado prognóstico (POPOV et al., 2023b).

Na população adulta a DRM é frequentemente avaliada após a consolidação, podendo ser realizada uma monitorização de rotina com intervalos de cerca de 3 meses durante um período de 3 a 5 anos (LARSON et al., 1998; POPOV et al., 2023b). Neste contexto, o aparecimento de DRM na manutenção da terapia pode ser um indicador precoce de recidiva da doença e identificar os doentes que irão beneficiar de terapêuticas adicionais, que podem incluir terapêuticas dirigidas ou transplante (BASSAN et al., 2012). É importante salientar que, apesar de atingirem uma resposta completa com quimioterapia de indução e consolidação, cerca de 30-58% dos pacientes adultos não atingirão uma DRM negativa e poderão recidivar posteriormente.

A DRM persistente ou recidiva da doença após obtenção de DRM negativa são indicadores de risco alto de recidiva e menor sobrevida global (KRÖGER et al., 2010; MEJSTRÍKOVÁ et al., 2017; ROTHENBERG-THURLEY et al., 2018; SZCZEPARŃSKI et al., 2002).

2.2.5 DRM no contexto do Transplante de Células -Tronco Hematopoieticas

A presença de DRM detectada imediatamente antes do transplante é reconhecida como um fator de risco adverso independente em vários estudos (BADER et al., 2019; SHAH et al., 2014; WANG et al., 2020), e já consolidado em uma meta-análise que incluiu pacientes adultos e crianças (BUCKLEY et al., 2017), tanto na LLA (P. Bader et al. 2002; Balduzzi et al. 2014; Pavlů et al. 2019; Bar et al. 2014) como na LMA (GETTA et al., 2017; LOKE et al., 2021; SROUR et al., 2019).

Vários trabalhos mostram que tanto a DRM quanto o estado avançado da doença no momento do transplante (CR2 ou mais) têm sido associados a maior risco de recidiva e morte (KONOVA et al., 2019; WALTER et al., 2013; ZHANG et al., 2016). Após ajuste para o estado clínico, a DRM negativa antes do procedimento permanece significativamente associada a uma melhor sobrevida, principalmente na LLA. A interpretação prognóstica deste dado, porém, é complexa. Pacientes com DRM positiva ou doença ativa, por exemplo, devem ser considerados para receber um TCTH, uma vez que o efeito enxerto-contra-leucemia pode, em alguns casos, neutralizar a presença de DRM antes do transplante (ZEISER; BLAZAR, 2017).

Uma resposta inadequada no nível de DRM em LLA é um fator de risco comumente aceito para recidiva e, portanto, tem sido utilizado como indicação para TCTH alogênico (BADER et al., 2002; ROCHA et al., 2021; YAFOR et al., 2023). Da mesma forma, evidências sugerem que a DRM detectada por citometria de fluxo ou técnicas moleculares pode ser usada para estratificação de risco em LMA no momento do TCTH (AL HAMED et al., 2022; HEUSER et al., 2021; THOL et al., 2018). Em LMA refratária o uso sequencial de quimioterapia seguido de TCTH tem sido testado em estudos de vida real, e apenas a intensidade do condicionamento e a positividade da DRM pré transplante foram significativas para sobrevida (MEUR et al., 2023).

O nível percentual de doença presente antes do procedimento parece estar associado ao prognóstico (BADER et al., 2019). Um estudo multicêntrico confirmou a observação de que a DRM detectada acima de 0,01% foi preditiva de recaída, mas os autores também notaram que os doentes com DRM indetectável tiveram resultados semelhantes aos dos doentes com baixos níveis de DRM pré-transplante (<0,001%). A detecção de níveis mais elevados de DRM em pacientes pediátricos com LLA antes do transplante pode desencadear intervenções terapêuticas adicionais, com o objetivo de se tornar a DRM negativa (<0,01%). Este mesmo estudo mostrou que o aparecimento de DRM pós-transplante é um indicador de mau prognóstico com maior significado clínico até do que a DRM detectada antes do transplante (BADER et al., 2019; MERLI et al., 2021).

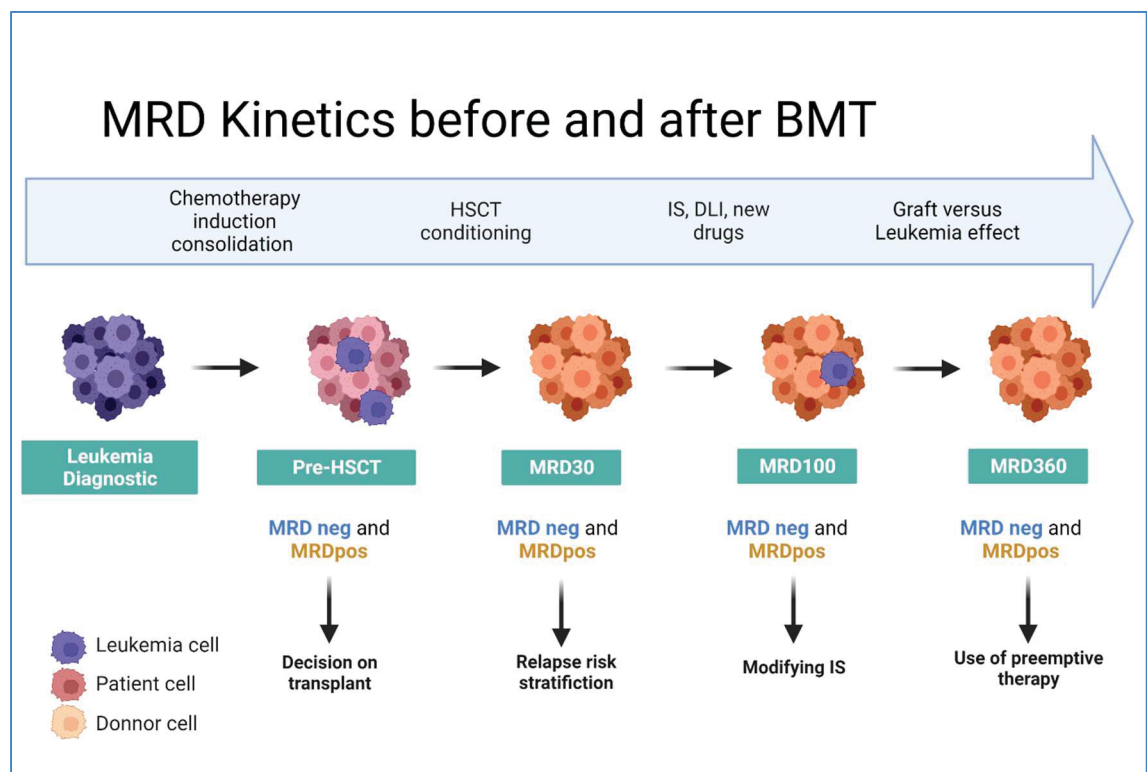
O aparecimento de células residuais após o transplante (DRM pós-transplante) também parece ser informativa para a previsão de recaída eminente em LLA (BADER et al., 2015; ZHAO et al., 2018) e LMA (DÍEZ-CAMPELO et al., 2009; KIM et al., 2018; KLYUCHNIKOV et al., 2022). A DRM pós-transplante tem sido utilizada para individualizar estratégias de tratamento (MUFLY, 2020) tais como a redução precoce da imunossupressão, numa tentativa de aumentar os efeitos da doença do enxerto contra a leucemia (DECL) (DÍEZ-

CAMPELO et al., 2009; SHAH et al., 2014; SUN et al., 2019), administração de infusão de linfócitos e preparo para novo transplante (DÍEZ-CAMPELO et al., 2009).

Apesar de todos estes esforços, não há um consenso definitivo sobre o momento ideal para avaliar a DRM após o TCTH. A avaliação da DRM nos primeiros 100 dias pode fornecer informações sobre a resposta inicial ao transplante e identificar pacientes com risco aumentado de recidiva precoce. Já a avaliação posterior parece ser crucial para determinar a eficácia do procedimento.

A Figura 3 ilustra a cinética da avaliação da DRM antes e depois do transplante de células-tronco hematopoiética nos casos de leucemias agudas.

Figura 3: Cinética da DRM antes e após o Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas.



Fonte: Autor do trabalho. Descrição: Imagem criada com BioRender, com objetivo de demonstrar a cinética de evolução da Doença Residual Mensurável avaliada antes e após o Transplante de Células-Tronco Hematopoiética e possíveis intervenções realizadas em cada fase.

2.3 DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA – ASPECTOS TÉCNICOS

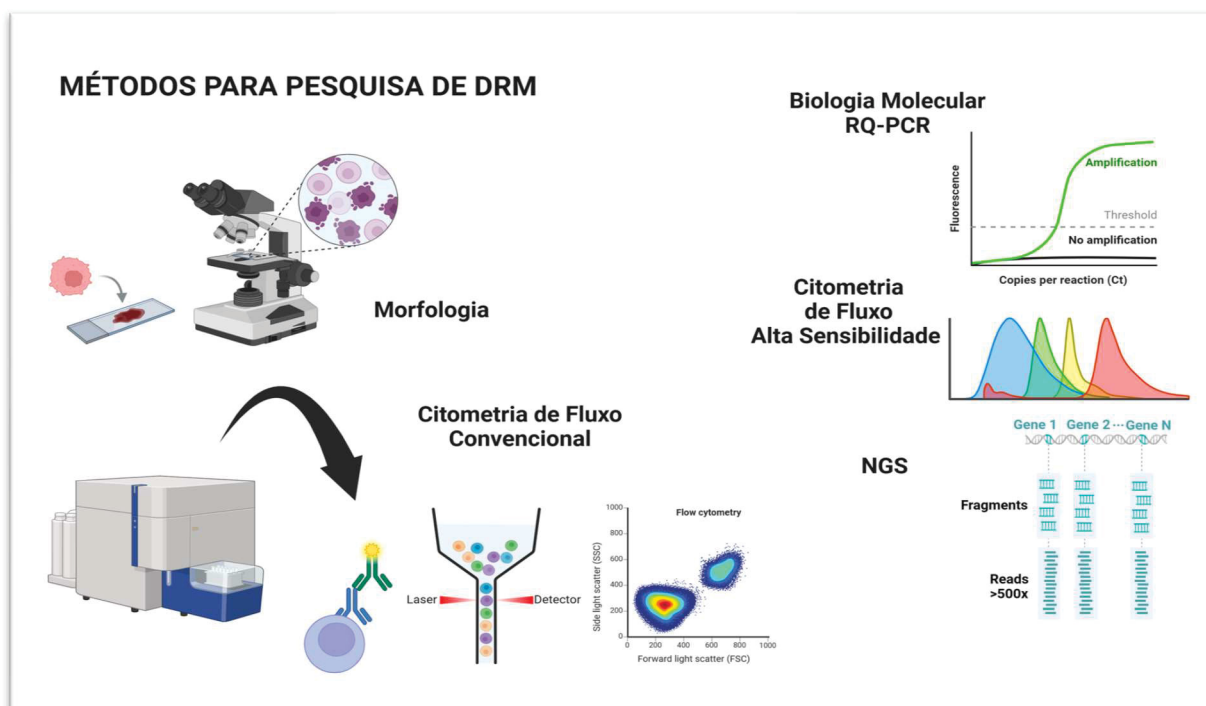
2.3.1 Definição e Sensibilidade

A “Doença Residual Mínima” ou “Doença Residual Mensurável” (DRM) em leucemias agudas é definida como presença de doença persistente pós-terapia detectada quando se utiliza métodos que são simultaneamente mais sensíveis e mais específicos do que a avaliação morfológica (Fuda & Chen, 2018). Enquanto os métodos morfológicos padrão são capazes de detectar populações leucêmicas com uma sensibilidade de 5% de células anormais, a DRM permite atingir níveis de sensibilidade de 10^{-4} a 10^{-6} (0,01% a 0,0001%) de células anormais, dependendo do método empregado (Jacques J.M. Van Dongen et al. 2015; Gao et al. 2023; Tembhare et al. 2020; Arumugam et al. 2022).

Os métodos disponíveis para a detecção de DRM em leucemias agudas na prática clínica são estão ilustrados na Figura 4:

- I. **Reação em cadeia da polimerase (PCR)** das regiões de rearranjo clonal dos genes do rearranjo das imunoglobulinas (IgH), leucemias B derivadas (DARZENTAS et al., 2023; KAVESH et al., 2020), ou do receptor de células T (TCR) nas leucemias T derivadas (WILLEMSE et al., 2002; WOOD et al., 2023),
- II. Detecção dos transcritos quiméricos (RNA mensageiro - mRNA) resultantes de translocações cromossômicas através de **reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa quantitativa (RQ-PCR)** para translocações recorrentes, como o *BCR::ABL1* (BASSAN et al., 2014; JONES et al., 2008a; LUTHRA; MEDEIROS, 2006; ZHANG et al., 2016; ZHAO et al., 2018; ZUNA et al., 2022);
- III. **Sequenciamento de nova geração (NGS)** é um método que detecta com maior especificidade os marcadores moleculares nas leucemias agudas (Svaton et al. 2023).
- IV. **Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo Multiparamétrica (CFM)** das células neoplásicas utiliza combinações específicas de anticorpos monoclonais para detecção do clone leucêmico (P. Theunissen, Mejstrikova, Sedek, Van Der Sluijs-Gelling, Gaipa, Bartels, Sobral da Costa, et al. 2017).

Figura 4: Métodos para detecção da Doença Residual Mínima / Mensurável nas Leucemias Agudas.



Fonte: Autor do trabalho, inspirado em Van Dogen et al., 2015. Descrição: Imagem criada com BioRender, com demonstrando os métodos utilizados para pesquisa de DRM nas doenças hematológicas.

A sensibilidade da detecção da DRM varia conforme o método utilizado. Os limites inferiores de quantificação (LIQ) e de detecção (LID) dependem do número de eventos celulares viáveis adquiridos ou da quantidade de material genético analisado na amostra. Esses limites são definidos por equações que consideram o número de células viáveis avaliadas em cada tubo. Quanto maior o número de células ou material genético analisado, maior a sensibilidade do teste (Fuda & Chen, 2018).

Embora a DRM seja uma medida direta da carga da doença e da resposta ao tratamento, em alguns casos, como na LLA, podem existir santuários para essas células neoplásicas, como os testículos e o sistema nervoso central (SNC), que podem não ter sido adequadamente avaliados. Além disso, a ausência de DRM detectável por qualquer método não é sinônimo de cura, pois a sensibilidade varia, e pequenas quantidades de células leucêmicas abaixo do limite de detecção podem persistir e escapar à resposta imunológica, contribuindo para uma possível recaída. Uma vez que nenhum ensaio é absolutamente perfeito, a escolha do método de detecção da DRM deve considerar o conhecimento técnico do centro de referência e a viabilidade de implementação das diferentes tecnologias disponíveis.

2.3.2 Comparação entre os métodos

Os métodos clássicos baseados em PCR têm como vantagem sua alta sensibilidade (10^{-4} a 10^{-6}) e padronização (DARZENTAS et al., 2023; KAVESH et al., 2020). Entretanto, limitações como o alto custo, complexidade técnica, possibilidade de falso-negativos devido a rearranjos secundários e risco de contaminação cruzada limitam a utilização deste método (Cross et al., 2023; Szczepański et al., 2002).

A pesquisa de rearranjos clonais dos genes da imunoglobulina ou TCR (Ig/TCR) requer frequentemente acesso a uma amostra de diagnóstico para documentar um marcador clonal e demoram um longo tempo (dias a semanas) para ter o resultado (LI et al., 2023; SVATON et al., 2023; VAN DONGEN et al., 2015), sendo sua aplicação limitada a centros especializados devido à necessidade de conhecimento técnico e instrumentação específica.

A detecção de transcritos de fusão permite a identificação sensível e específica de blastos, possibilitando intervenções terapêuticas oportunas (JONES et al., 2008b; ZUNA et al., 2022). A reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR) é amplamente utilizada para detectar e quantificar transcritos quiméricos de translocações citogenéticas associadas à leucemogênese, como o gene *BCR::ABL1* na LLA ou o gene *PML-RARA* nas leucemias promielocíticas agudas (ALGHANDOUR; SAKR; SHAABAN, 2023; BASSAN et al., 2014; JONES et al., 2008a; LUTHRA; MEDEIROS, 2006; ZHANG et al., 2016; ZHAO et al., 2018; ZUNA et al., 2022).

Em pacientes com LLA Ph⁺, por exemplo, os transcritos encontrados são específicos da doença (Raff et al., 2007), porém sua aplicabilidade clínica é limitada, sendo detectados em apenas 50% dos casos (VAN DONGEN et al., 1999). Apesar da alta sensibilidade, a detecção de transcritos de fusão pode gerar resultados falso-negativos devido à formação de rearranjos secundários e ao risco de contaminação cruzada (CROSS et al., 2023; SZCZEPARŃSKI et al., 2002). Embora a quantificação de transcritos *BCR::ABL1* seja o padrão na LLA Philadelphia-positiva (LLA Ph⁺), a citometria de fluxo multiparamétrica (CFM) é amplamente utilizada para pesquisa de DRM nos outros subtipos genéticos-moleculares.

O sequenciamento de próxima geração (*next generation sequency* - NGS) do IgH/TCR foi introduzido recentemente para a detecção de DRM nas leucemias agudas (LI et al., 2023; SVATON et al., 2023). Estudos sugerem que essa abordagem molecular avançada poderia melhorar a estratificação de risco em crianças com LLA tratadas por protocolos adaptados ao risco (Svaton et al. 2023). Apesar de suas vantagens, o NGS enfrenta desafios como complexidade técnica, falta de validação para DRM, necessidade de bibliotecas genéticas

abrangentes e, no Brasil, limitações relacionadas ao custo e à disponibilidade (DA ROSA et al., 2023; IKOMA-COLTURATO et al., 2023).

A Tabela 3 apresenta um resumo das principais metodologias atuais para pesquisa de DRM em leucemias agudas, incluindo suas características, sensibilidade, aplicabilidade, vantagens e desvantagens.

Tabela 3: Comparação das metodologias de pesquisa de DRM para leucemias agudas

Técnica DRM	RQ-PCR IgH/TCR	RT-PCR transcritos de fusão	NGS	Citometria de Fluxo
SENSIBILIDADE	10^{-4} - 10^{-5}	10^{-4} - 10^{-6}	10^{-4} - 10^{-6}	3-4 cores: 10^{-3} - 10^{-4}
				6-8 cores: 10^{-4}
				8-10 cores: 10^{-4} - 10^{-6}
APLICABILIDADE	LLA-B: 95%	LLA-B: 25-40%	LLA: 90-95%	LLA: >90%
	LLA-T: 90-95%	LLA-T: 10-15%		
		LMA: 40%	LMA: 65%	LMA: 80%
VANTAGENS	Padronizada	Relativamente fácil Sensível	Alta sensibilidade Não depende do primer do diagnóstico Potencial para identificar hematopoiese clonal	Rápida e relativamente fácil Análise a nível celular Guarda a informação de todas as populações celulares
DESVANTAGENS	Demorada, cara e laboriosa Requer amostra do diagnóstico e experiência do laboratório	Aplicável apenas a subgrupos específicos. Risco de contaminação	Caro e demorado Bioinformática complexa Padronização limitada Difícil discriminação do background normal	Sensibilidade variável, aumentando com o uso de 8 a 10 cores. Mudanças de fenótipo Requer experiência do analista

Fonte: da autora, adaptado de Van Dongen et al. 2015.

2.3.3 Citometria de Fluxo de Alta Sensibilidade

Comparada aos métodos moleculares, a citometria de fluxo convencional apresenta vantagens, como rapidez na obtenção de resultados, menor custo, ampla aplicabilidade clínica (>90% dos casos) e dispensabilidade de uma amostra de diagnóstico prévio para comparação. Ademais, pode ser implementada em laboratórios de rotina, desde que haja analistas experientes para a interpretação dos dados (HEUSER et al., 2021; THEUNISSEN et al., 2017a; VAN DONGEN et al., 2015). No entanto, essa abordagem possui limitações, como o número restrito de células disponíveis em algumas amostras, a semelhança fenotípica entre células leucêmicas e células normais regenerativas da medula óssea (hematogônias), e a modulação da expressão antigênica ao longo do tratamento, especialmente com o uso de fármacos como corticoides e metotrexato (DWORZAK et al., 2002; GAIPA et al., 2008; LUCIO et al., 2001; ROCHA et al., 2019; VAN DONGEN et al., 2015; VAN WERING et al., 2000), além da falta de padronização (VAN DONGEN et al., 2015).

A sensibilidade da citometria de fluxo convencional em relação aos métodos moleculares é muito baixa (uma célula leucêmica em 10.000 células normais, 10^{-4} ou 0,01%), quando comparada com as técnicas moleculares comuns que chegam a 10^{-6} (GAIPA et al., 2013). Nos últimos anos, entretanto, este cenário da citometria de fluxo está sendo modificado rapidamente com a introdução de alguns fatores que têm contribuído para incrementar a sensibilidade deste método.

Em primeiro lugar, a evolução tecnológica de citômetros de fluxo de quatro cores para oito cores ou mais (KALINA et al., 2012; MATTHES et al., 2019), e o uso de novos marcadores celulares (COUSTAN-SMITH et al., 2011), como o CD66c, o CD81, o CD73 e o CD304 (GUDAPATI et al., 2020) que aumentaram a capacidade de discriminação entre células normais, reativas e anormais (SEDEK et al., 2019) e o uso de técnicas de lise total (*bulk-lysis*), que permitem aquisição de grande número de eventos (EUROFLOW CONSORTIUM, 2018). Além disso, a evolução nas estratégias de análise com programas e técnicas estatísticas modernas (PEDREIRA et al., 2008) potencializaram a sensibilidade de detecção de DRM nas leucemias agudas.

Assim, diversos grupos vêm introduzindo métodos de pesquisa de DRM por CFM de oito a 12 cores na LLA-B cuja sensibilidade foi comparada às técnicas moleculares atuais (SINGH et al., 2022; TEMBHARE et al., 2020; THEUNISSEN et al., 2017b; ZHAO et al., 2018).

2.3.4 Estratégias de Análise

A imunofenotipagem por citometria de fluxo utiliza combinações específicas de anticorpos monoclonais (AcMo) para identificar células com fenótipo anômalo para identificação do clone leucêmico, que permitem a diferenciação das células precursoras normais (hematogônias) através da observação dos padrões de maturação normal das células hematopoiéticas (CHERIAN; SOMA, 2021; DIGIUSEPPE; WOOD, 2019).

Duas abordagens principais podem ser utilizadas:

a) A avaliação da maturação celular, designada por abordagem "**diferente do normal**", ou estratégia *different-from-normal* (DifN): consiste na construção de um perfil imunofenotípico da medula óssea normal e na detecção de fenótipos que se desviam das células normais ao longo do seguimento (LUCIO et al., 2001; MCKENNA et al., 2001).

b) A detecção de imunofenótipo caracteristicamente anômalos, também chamado de **imunofenótipo associado à leucemia** (*leukemia-associated immunophenotype* – LAIP): Os LAIPs são fenótipos anômalos que permitem diferenciar células leucêmicas (blastos) de células precursoras normais ou hematogônias (ARABI et al., 2023).

O uso destas duas abordagens em conjunto permite identificar os blastos leucêmicos e diferenciá-los de suas contrapartidas normais com maior precisão, especificidade e sensibilidade (FUDA; CHEN, 2018b).

2.3.5 Estratégias de Análise - DifN

O desenvolvimento normal das células B na medula óssea é um processo rigorosamente controlado no qual os precursores das células B seguem um caminho de diferenciação em através de estágios de maturação determinados pela expressão fenotípica progressiva de marcadores celulares de membrana ou citoplasma, assim como pelo rearranjo das cadeias pesadas da imunoglobulina (IgH) (VAN ZELM et al., 2007).

Os precursores linfoides B se diferenciam através das fases pró-B, pré-B-I, pré-B-II, até se tornarem células precursoras B *naïve*, as quais expressam um receptor de célula B (BCR) funcional (DRIESSEN et al., 2011), e finalmente liberar uma população de células B maduras no sangue periférico (VAN ZELM et al., 2007). Estes linfócitos são então liberados para o sangue periférico como linfócitos B maduros (LB) de transição ou transicionais que podem

amadurecer nos tecidos linfoides e no baço desde LB *naïve* até se tornarem LB efetores ou LB de memória (BLANCO et al., 2018).

A análise da maturação celular após tratamento quimioterápico pode sofrer modulação no fenótipo causada por drogas (metotrexato e corticoide) ou outros fatores na recuperação hematológica após o tratamento quimioterápico. Por exemplo, parece ocorrer alterações nos níveis de intensidade de fluorescência de marcadores expressos por blastos leucêmicos nos dias 15 e 33 em comparação com os níveis no momento do diagnóstico (BALDZHIEVA et al., 2023), como diminuição na expressão de CD10, CD19 e CD34, e aumento no CD20 após a indução. A presença de hematogônias e células precursoras mieloides CD34 positivas também parece ter implicação prognóstica em pacientes adultos com DRM não detectada (LIAO et al., 2019).

A Figura 5 ilustra os estágios de maturação da linhagem linfóide B e os possíveis imunofenótipos associados à leucemia (LAIP) e alterações de maturação (DifN) que auxiliam a diferenciação de blastos e células B precursoras normais.

Figura 5 – Estágios de Maturação da Linhagem Linfóide B

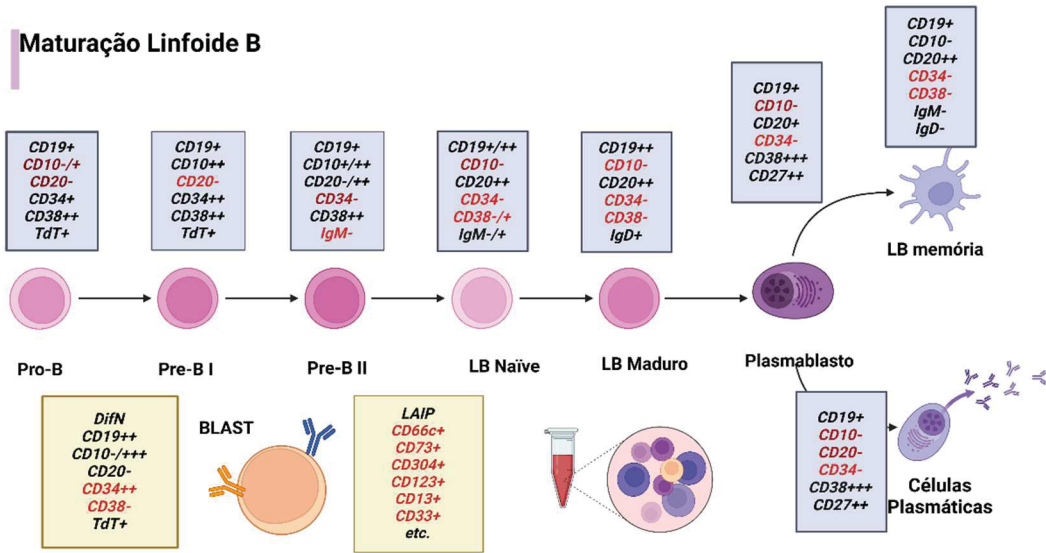


Figura 5: Quadros em azul demonstrando os estágios de maturação das células linfóides B precursoras até formar um linfócito B maduro (LB) ou uma célula plasmática. Em laranja uma sugestão de fenótipo de blastos linfóides com alterações na maturação (DifN) e imunofenótipo associado à leucemia (LAIP). Fonte: a autora. Figura desenvolvida com o Biorender.

A Figura 6 ilustra um exemplo de DRM de LLA-B negativa com maturação normal na linhagem linfóide B e discreta modulação antigênica.

Figura 6: Exemplo ilustrativo de DRM negativa e curva de maturação normal:

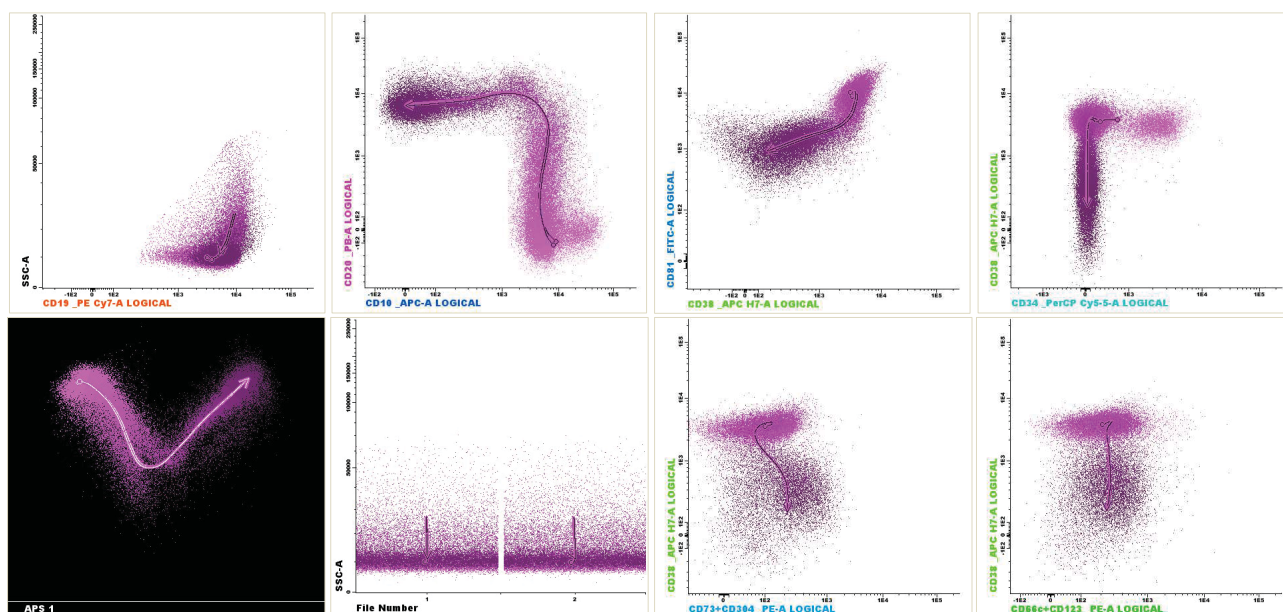


Figura 6: Exemplo ilustrativo de DRM negativa e curva de maturação normal: “gate” na janela de CD19 positiva e dotplots com CD20 vs CD10, CD80 vs CD38, CD38 vs CD34, CD38 vs CD304+CD73 e CD38 vs CD66C+CD123. O gráfico do tempo com os dois tubos analisados em merge e curva de maturação normal nos demais dot-plots. Imagem do APS mostrando curva de maturação normal das células linfóides B. A discreta variação na intensidade de fluorescência dos linfócitos B maduros no dotplot CD38 vs CD73+CD304 foi considerada normal.

2.3.6 Estratégias de Análise – LAIP

A expressão aberrante de marcadores de outras linhagens nas células linfóides B contribui para aumentar a especificidade dos métodos de análise e pode estar associada a diversas alterações moleculares, sendo, portanto, característica de células anormais. Estudos iniciais apontaram que marcadores mielóides, como CD13, CD33 e CD66b, típicos da linhagem mielóide, podem ser expressos aberrantemente em até 90% dos casos de LLA-B (GRIESINGER et al., 1999). Posteriormente, a expressão aberrante tanto de marcadores de células B quanto de outras linhagens foi conceituada como “imunofenótipos associados à leucemia” (LAIPs), que se consolidaram como ferramenta útil na detecção de doença residual mínima (DRM) nessa patologia (TETTERO et al., 2022). Três características principais

distinguem os blastos (células patológicas) dos progenitores normais de células B (hematogônias):

1. **Expressão anômala de marcadores durante a maturação hematopoiética:** Os blastos podem apresentar expressão muito elevada de CD34 e/ou CD10, combinada com baixa expressão de CD45 e CD38(GAIPA et al., 2008).
2. **Maturação “assíncrona” dos blastos em relação ao desenvolvimento normal das células B:** Um exemplo é a presença de marcadores como CD21 em estágios de desenvolvimento nos quais sua expressão não é esperada (PLACEK et al., 2024).
3. **Expressão aberrante de marcadores de outras linhagens hematopoiéticas:** Inclui marcadores como CD13, CD33 e CD66b (associados à linhagem mieloide) ou CD2, CD56, CD11c e CD11b (associados a monócitos)(BOCCUNI et al., 1998; GUILLAUME et al., 2011; HIRABAYASHI et al., 2017).

Na busca por novos marcadores para análise da DRM por citometria de fluxo, Coustan-Smith et al. realizaram estudos de expressão gênica em linfoblastos de 270 pacientes com LLA-B e em células B precursoras de quatro doadores saudáveis e identificaram 30 genes diferencialmente expressos, dos quais 22 foram validados por citometria de fluxo. Entre os marcadores identificados estavam CD44, BCL2, HSPB1, CD73, CD24, CD123, CD72, CD86, CD200, CD79b, CD164, CD304, CD97, CD102, CD99, CD300a, CD130, PBX1, CTNNA1, ITGB7, CD69 e CD49f. Destes, CD72, CD79b e CD102 apresentaram desregulação, enquanto os demais foram regulados positivamente em LLA-B comparados às células precursoras normais (COUSTAN-SMITH et al., 2011).

Os painéis diagnósticos utilizados na LLA-B em geral incluem marcadores para avaliar a maturação e identificar fenótipos aberrantes, como CD10, CD20, CD34, CD45, CD22, CD9, CD13 e CD33. Estudos recentes propuseram novos marcadores, como CD66c, CD123 (BOCCUNI et al., 1998; BRAS et al., 2019; GUILLAUME et al., 2011; KIYOKAWA et al., 2014), CD73 e CD304 (GUDAPATI et al., 2020; SEDEK et al., 2019), entre outros. Todos estes antígenos têm sido relacionados a fenótipos anômalos em casos de LLA-B, e sua utilização possibilitou um aumento da especificidade que é crítico nos momentos pós-terapia, onde a hematopoiese de fundo pode ser afetada com o aumento do número de células precursoras regeneradoras normais (CHATTERJEE et al., 2021a, 2022).

A Figura 7 demonstra um exemplo de DRM de LLA-B com fenótipo aberrante.

Figura 7: Exemplo ilustrativo de DRM de LLA-B positiva com LAIP

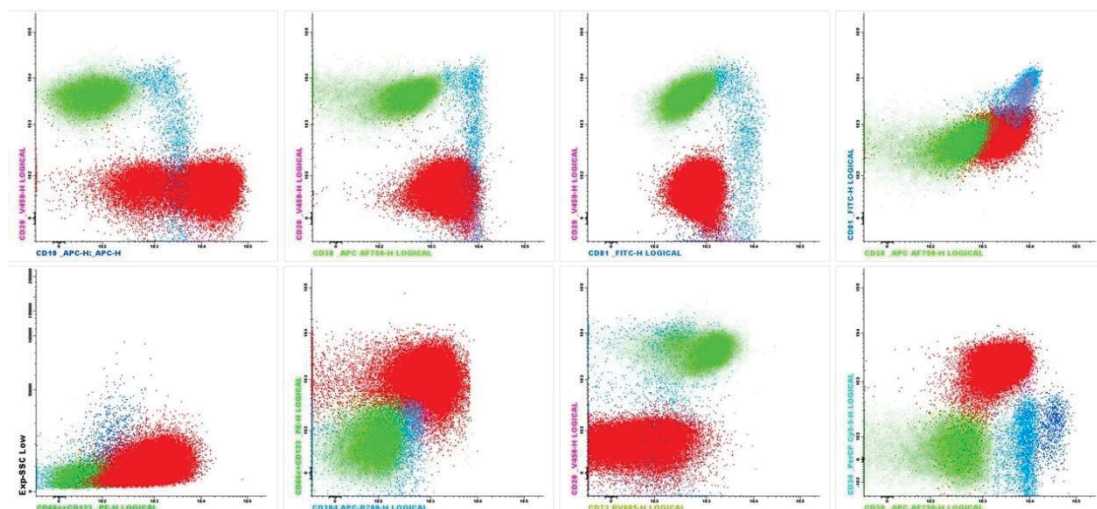


Figura 7: Exemplo ilustrativo de caso DRM de LLA-B positiva com blastos em vermelho (CD10-/++, CD20-, CD34-, CD38++, CD81+ fraco) e maturação normal dos linfócitos B na medula óssea pós-tratamento de indução (linfócitos B maduros verde e células precursoras linfoides B em azul). A marcação no citômetro de 10 cores permitiu diferenciar a positividade para CD66c/CD123 no fluorocromo PE, CD304 positivo no fluorocromo R700 e CD73 negativo no BV605.

2.3.7 Correlação Imunofenótipo e Alterações Moleculares

Algumas das alterações fenotípicas descritas nos blastos linfoides B comumente pesquisados na DRM são possivelmente associados às anormalidades citogenéticas e moleculares, as quais podem e eventualmente podem ser reconhecidas por fenótipos dos blastos associados às fases de maturação.

A hiperdiploidia e a LLA com t(12;21) estão associadas à expressão forte do CD10 e diagnóstico de LLA-B comum (BII), representando aproximadamente 60% dos casos de LLA-B em crianças. A forte expressão para o marcador CD25, por exemplo, parece estar associada aos casos de translocação t(9;22); negatividade de CD10, CD20 e CD24 associada à positividade do CD15 nas LLA com translocações envolvendo o gene *MLL* (v;11q23 - rearranjo *MLL*); ausência de expressão de CD9, CD20 e forte expressão do CD10 na translocação t(12;21); a positividade do CD34, forte expressão do CD10 e negatividade do CD45 nos casos de hiperdiploidia; e a superexpressão de CD9 e CD34 na translocação t(1;19)(KULIS et al., 2022). O anticorpo 7.1 (proteoglicano de sulfato de condroitina, NG2) é um marcador bem estabelecido de rearranjos *KMT2A*/11q23.

Os marcadores CD66c, CD123, CD73 e CD304, selecionados no painel EuroFlow™, aumentaram a especificidade do método, também parecem estar associados à presença de alterações genético moleculares específicas.

O CD66c (molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembrionário) é altamente expresso em células mieloides, mas não em linfócitos, sendo encontrado em até 81% dos pacientes com LLA-B (36–81% nos diversos estudos). A expressão de CD66c tem sido correlacionada, embora não exclusivamente, à LLA-B *BCR::ABL1*-positiva e a casos de hiperdiploidia, não sendo geralmente observada em pacientes com t(12;21) e com rearranjo *KMT2A*(GUILLAUME et al., 2011).

O CD123 (cadeia alfa do receptor de interleucina-3) é um marcador crucial para a proliferação e diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas, sendo expresso em células B precursoras normais CD34-negativas, mas não em células CD34-positivas. No entanto, a expressão aberrante de CD123 tem sido observada em blastos de 85% dos pacientes com LLA-B, a maioria expressando tanto CD34 quanto CD123. Frequências semelhantes foram relatadas em outros estudos, (SEDEK et al., 2019), consolidando o CD123 como um marcador relevante para a avaliação da DRM). Os níveis de CD123 foram significativamente mais elevados em pacientes com translocação *BCR::ABL1* ou cariótipo hiperdiplóide(BRAS et al., 2019; DJOKIC et al., 2009).

A superexpressão de CD73 (ecto-5'-nucleotidase), uma enzima de superfície presente em diversos tipos celulares, foi encontrada em 42% a 70% dos pacientes com LLA-B em comparação com células precursoras normais. A expressão de CD73 aumenta durante a maturação das células B, e permanece estável durante o tratamento(DJOKIC et al., 2009) e está potencialmente associada a rearranjos *ETV6-RUNX1* e inversamente relacionada à presença do gene de fusão *TCF3-PBX1*.

O CD304/neuropilina-1, um correceptor envolvido na sinalização do receptor de tirosina quinase, é altamente expresso em células dendríticas plasmocitoides, e está superexpresso em 40-59% dos pacientes com LLA-B em comparação com as células B precursoras normais. Além do gene *ETV6::RUNX1*, estudos recentes indicam que CD304 é frequentemente expresso na LLA-B em adultos com presença do gene *BCR::ABL1*(CHATTERJEE et al., 2021b).

3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Os métodos moleculares de estudo de DRM são caros e de difícil implantação no nosso meio. A imunofenotipagem por citometria de fluxo por outro lado, já é amplamente utilizada para diagnóstico das doenças onco-hematológicas há mais de 20 anos dentro do Laboratório de Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo do CHC-UFPR, cujo corpo clínico e funcional tem expertise, sendo considerada, portanto, um método mais custo-efetivo.

Em 2017 o laboratório foi contemplado com recursos do Programa Nacional de Apoio à Atenção Oncológica do Ministério da Saúde (PRONON-MS), abrindo a possibilidade de adquirir um equipamento citômetro de fluxo de 8 a 10 cores. Como se sabe, estes equipamentos possuem a capacidade de adquirir um número significativamente maior de eventos celulares, aumentando a sensibilidade do método e tornando-o ideal para a detecção de DRM.

Neste contexto, o presente trabalho se propõe à **introdução e padronização da técnica de citometria de fluxo de alta sensibilidade** (oito a 10 cores) no nosso meio, permitindo a uniformização dos métodos diagnósticos e de monitoramento das doenças hematológicas malignas nos pacientes avaliados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR).

Assim, este estudo foi realizado com o apoio da Associação dos Amigos do HC (AAHC), no âmbito do PRONON-MS, como parte do projeto intitulado *"Estudo da Doença Residual Mínima por Citometria de Fluxo de Alta Sensibilidade em Pacientes com Leucemia Aguda e seu Impacto no Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas"*. Trata-se de um estudo prospectivo investiga o papel da citometria de fluxo de alta sensibilidade na detecção da doença residual mensurável (DRM) antes e após o transplante em leucemias agudas de alto risco com objetivo de avaliar a cinética de eliminação da doença e correlacionar a dinâmica da DRM com os desfechos do transplante.

A hipótese central do projeto foi que a implementação de técnicas mais sensíveis para a detecção de DRM aliada ao estabelecimento de protocolos padronizados de coleta de amostras antes e após o transplante, poderia otimizar o monitoramento dos pacientes e identificar aqueles com alto risco de recidiva. Além disso, esta abordagem permitiria uma alocação mais eficiente de recursos, direcionando intervenções terapêuticas adicionais para os casos mais críticos, o que tem o potencial de reduzir custos com tratamentos desnecessários e maximizar o uso de recursos limitados.

O projeto foi desenvolvido em três fases detalhadas a seguir:

Fase I - Implantação e Validação da técnica: após a aquisição dos equipamentos e reagentes foi realizada a implantação e padronização da técnica de citometria de fluxo de oito a dez cores para o diagnóstico e monitoramento das leucemias agudas. Esta etapa resultou na modernização do parque tecnológico do laboratório, uniformização das metodologias laboratoriais e capacitação dos recursos humanos.

Fase II - Inclusão da população fonte: estudo de coorte prospectivo, longitudinal e observacional, que incluiu os pacientes consecutivos com diagnóstico de leucemia mieloide ou linfóide aguda, de qualquer idade, atendidos pelos serviços de hematologia, hematopediatria e transplante do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR) em Curitiba, de junho de 2019 e junho de 2023. Durante o período do estudo, os custos relacionados aos exames foram integralmente cobertos pelo projeto, beneficiando diretamente o CHC-UFPR e seus pacientes.

Fase III - Inclusão da população do estudo: os pacientes que foram submetidos ao TCTH no período do estudo, que cumpriam os critérios de inclusão e exclusão, e aceitaram participar do estudo pós-transplante foram seguidos nas avaliações posteriores da presente tese de doutorado.

O quadro 1 mostra a linha do tempo de execução do projeto.

Figura 8: Fases do Projeto PRONON

- **2017-2018: Submissão do projeto ao PRONON-MS**
- **2018-2019: Trâmites burocráticos e aquisição dos equipamentos**
- **2019-2020: Instalação do citômetro e treinamento da equipe**
 - Computador e software de análise Infinicyt™ 2.0
 - Centrífuga e pipetas
 - Câmara refrigeradora
 - No-break e ar-condicionado.
 - Citômetro 10 cores FACSLytic®
 - Anticorpos monoclonais e reagentes para 36 meses de DRM e Leucemias
- **2019 readequação Protocolo para Doença Residual Mínima no FACSLytic.**
 - Novos insumos, adequação da técnica, treinamento da equipe, padronização da *bulk-lysis*, da análise e do laudo de DRM.
- **2019-2023: Inclusão de pacientes: estendido para 48 meses**
- **2023-2024: Análise dos dados**



Figura 8: Fases de implantação da técnica de citometria de fluxo de alta sensibilidade no CHC-UFPR

4 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Implantar e padronizar a técnica de citometria de fluxo de alta sensibilidade para o monitoramento da doença residual mensurável em todos os pacientes com leucemias agudas atendidos no CHC-UFPR.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o impacto da presença de doença residual mensurável (DRM) detectada antes e depois do TCTH na sobrevida global, sobrevida livre de eventos e taxa de recaída em pacientes com leucemias agudas de alto risco.
- Determinar o melhor momento em que a DRM deve ser detectada após o TCTH (d30, d60, d100) para avaliar a cinética de eliminação da doença e correlacionar a dinâmica da DRM com os desfechos do transplante.
- Estabelecer a técnica de lise total (bulk-lysis) para aumentar a sensibilidade da detecção de DRM e validar o painel de 10 cores para DRM de LLA-B.
- Correlacionar o percentual de blastos detectados por citometria de fluxo com a avaliação quantitativa dos transcritos BCR::ABL1 por RQ-PCR em pacientes com LLA-B Philadelphia-positiva (Ph+) para estabelecer a sensibilidade do método;
- Investigar o papel dos marcadores de maturação e do fenótipo associado à leucemia utilizados no painel de pesquisa de DRM nos pacientes com LLA-B avaliados durante o período do estudo e comparar esses achados com os resultados da genética e biologia molecular.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 DESENHO DO ESTUDO E CASUÍSTICA

5.1.1 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CHC-UFPR em 23/05/2018, sob o número CAAE 84969718.0.000.0096, e pelo Ministério da Saúde/Projeto PRONON (SIPAR 25000.055.356/2015-04). O relatório de CEP, a carta de aprovação do Comitê de Ética e os termos de consentimento e assentimento estão disponíveis nos **Anexos 1, 2 e 3** respectivamente.

As características clínicas e biológicas dos pacientes, assim como os resultados laboratoriais, foram coletados a partir dos prontuários eletrônicos do hospital. O consentimento para o uso de material biológico e acesso aos registros médicos foi obtido por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinado pelos pacientes ou pelos seus responsáveis legais no caso de crianças e adolescentes (Termo de Assentimento - TA).

A indicação de coleta da medula óssea e pesquisa da DRM era feita pelos médicos assistentes conforme o protocolo quimioterápico utilizado, sem intervenção da equipe da pesquisa. Todas as informações pessoais foram mantidas em sigilo e utilizadas apenas pelos investigadores do estudo. Foram utilizados 2 a 3 mL de MO colocados em tubo de EDTA, mantidos em temperatura ambiente e enviados imediatamente para o laboratório de citometria de fluxo para processamento no período de 24 horas, de acordo com as diretrizes da European Leukemia Net(HEUSER et al., 2021).

5.1.2 Desenho do estudo e População Fonte

Estudo de coorte prospectivo longitudinal quantitativo e qualitativo, não intervencionista. A população fonte era constituída por todos os pacientes consecutivos submetidos ao exame de citometria de fluxo para fins de diagnóstico e seguimento de leucemias agudas, de qualquer idade, atendidos pelos serviços de hematologia, hematopediatria e transplante do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR) em Curitiba, de junho de 2019 e junho de 2023.

As coletas incluíram quatro tipos de amostras:

- Amostras de medula óssea no diagnóstico da leucemia aguda;
- Amostras para pesquisa de DRM após os ciclos de indução e consolidação;
- Amostras coletadas antes do TCTH;
- Amostras coletadas após o TCTH.

Nos pacientes incluídos para a avaliação da DRM pré-transplante as amostras foram coletadas imediatamente antes do transplante e em dias específicos do seguimento pós-TCTH (D30, D60, D100 e D180), de acordo com a sobrevida dos pacientes. As análises nos dias D360 e D720 (um e dois anos pós-TCTH) eram opcionais, a critério do médico assistente.

5.1.3 População Estudo Cinética Pré e Pós-TCTH (MANUSCRITO 1)

Os pacientes com leucemias agudas de alto risco, com fenótipo linfoide ou mieloide, de qualquer idade, que atingiram o status de remissão morfológica completa e tinham indicação de TCTH eram selecionados para a análise da DRM antes e depois do transplante.

Critérios de Inclusão

- 1- Pacientes com diagnóstico de leucemias agudas (LLA-B, LLA-T e LMA) em remissão morfológica (<5% de blastos à morfologia);
- 2- Pacientes com indicação clínica de transplante de células-tronco hematopoiéticas;
- 3- Avaliação da DRM realizada com o protocolo de citometria de fluxo de alta sensibilidade antes do TCTH;

Critérios de Exclusão

- 1- Leucemia Promielocítica Aguda e doenças hematológicas crônicas;
- 2- Negativa em assinar o TCLE ou Termo de Assentimento.

Neste estudo, foram incluídos pacientes com LLA-B, LLA-T e LMA em remissão morfológica, submetidos ao TCTH, que possuíam avaliação medular por citometria de fluxo no momento imediatamente anterior ao transplante. Essa inclusão permitiu ampliar o número de casos e obter uma coorte mais robusta.

5.1.4 População do Estudo de Validação (MANUSCRITO 2)

Os pacientes com leucemias linfoblásticas agudas atendidos no período do estudo foram avaliados retrospectivamente quanto aos tipos de alterações genético-moleculares e suas correlações com os aspectos clínicos e fenotípicos.

A detecção de DRM por citometria de fluxo de alta sensibilidade e por RT-PCR foi realizada simultaneamente em 109 amostras, avaliando concordâncias e discrepâncias entre os métodos.

Critérios de Inclusão

- 1- Pacientes com diagnóstico de LLA Philadelphia-positivo ou não, com amostra avaliada por citometria de fluxo no período do estudo.
- 2- Detecção de DRM por citometria de fluxo de alta sensibilidade e por RT-PCR realizada simultaneamente.

Critérios de Exclusão

- 1- Leucemia Linfoblástica Aguda T, Leucemias Mieloides e de fenótipo misto;
- 2- Negativa em assinar o TCLE ou Termo de Assentimento.

Um total de 125 pacientes com LLA foram atendidos entre 2019 e 2023 e selecionados para esta avaliação. Os 19 casos de LLA-T (n=18) e leucemia aguda de fenótipo misto (n=1) foram excluídos, e 106 pacientes com LLA-B foram avaliados retrospectivamente: 27 pacientes LLA-B Ph+, 12 com hiperdiploidia, 5 com ETV6::RUNX1, 2 com E2A::PBX1, 10 com rearranjos KMT2A, 7 com outras anormalidades genéticas, 19 sem metáfases, e 24 com cariótipos normais.

A Figura 9 demonstra as medianas de idade nos diferentes subtipos genéticos avaliados.

Figura 9: Correlação Genética e Idade

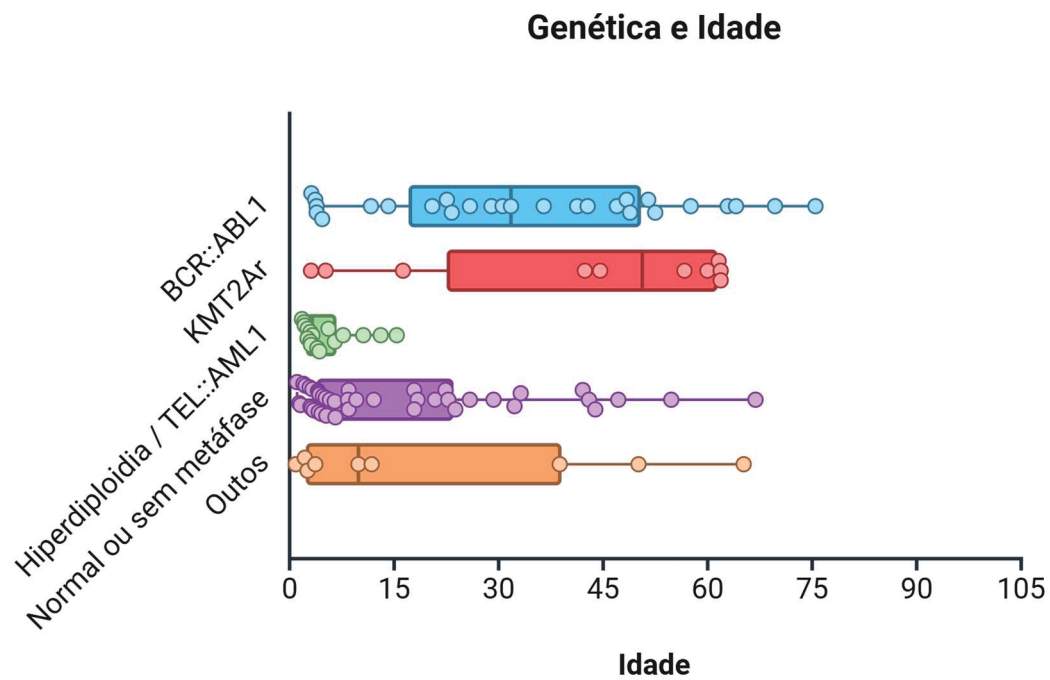


Figura 9: Correlação entre perfil citogenético e idade em 106 pacientes com LLA-B, mostrando mutações de mau prognóstico mais frequentes na população adulta

5.2 DEFINIÇÃO DE DOENÇA RESIDUAL MENSURÁVEL

A população de blastos aberrantes foi quantificada como percentual do total de células nucleadas no sangue. As amostras foram consideradas positivas para DRM se apresentassem pelo menos 20 eventos agrupados (limite de detecção – LID) e pelo menos 50 eventos agrupados (limite inferior de quantificação – LIQ). O LID e o LIQ foram determinados caso a caso, considerando o total de células analisadas por tubo.

Com base nos resultados do teste de DRM antes do TCTH os pacientes foram categorizados em três grupos:

- **DRM positiva (DRM+):** A presença de qualquer nível de células aberrantes na citometria de fluxo determinava os pacientes como **DRM positiva (DRM+) ou detectada** (qualquer número entre 0,0001% e 4,99% de blastos detectados na amostra).
- **DRM negativa (DRM-):** Pacientes com menos de 10^{-4} (<0,01%) de blastos foram considerados **DRM negativa (DRM-)** para efeitos estatísticos, mas todos os casos foram classificados quanto aos limites inferiores de detecção (LID) e quantificação (LIQ) de cada amostra analisada.
- **Doença ativa:** Pacientes com mais de 5% de blastos foram classificados como portadores de **doença ativa ou recidiva**.

A **Figura 10** apresenta um caso de DRM, negativa e a **Figura 11** ilustra um caso de DRM positiva em material intensamente hipocelular.

Figura 10: Exemplo ilustrativo de DRM de LLA-B negativa

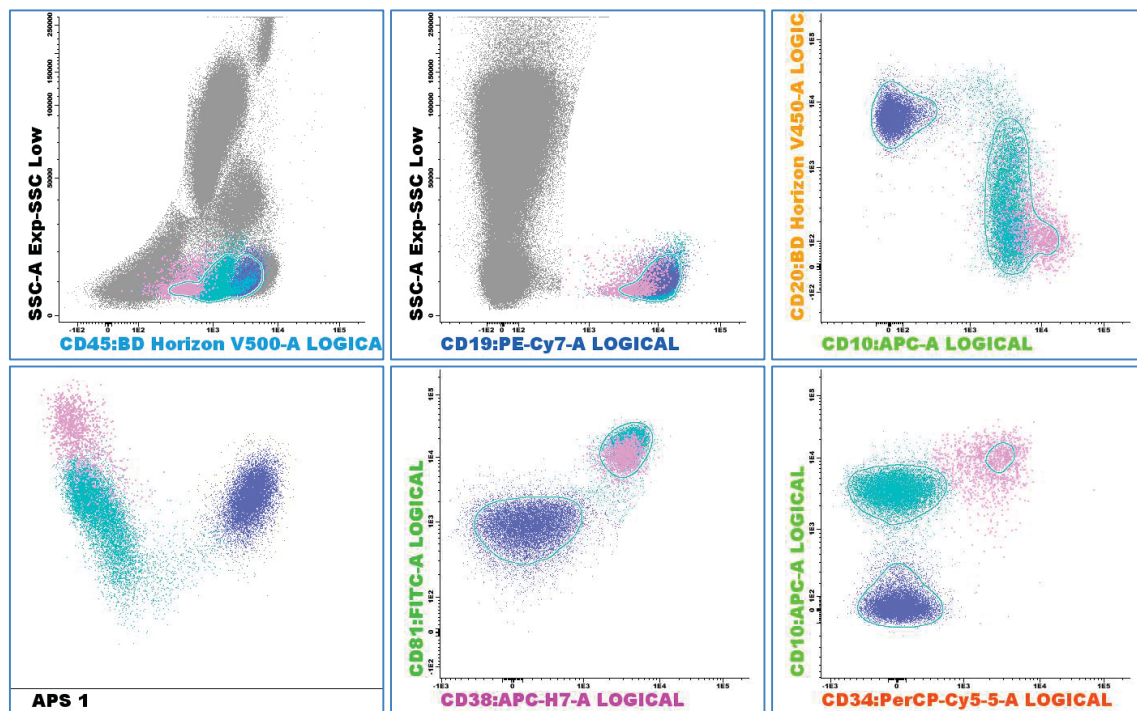


Figura 10: Exemplo ilustrativo de caso DRM de LLA-B negativa com linfócitos B maduros em azul (CD20++) e células precursoras linfoides B em cianina (CD10++, CD20-/++ CD38++CD81++) e rosa (CD10++, CD20- CD34++ CD38++CD81++).

Figura 11: Exemplo ilustrativo de caso DRM positiva em material hipocelular

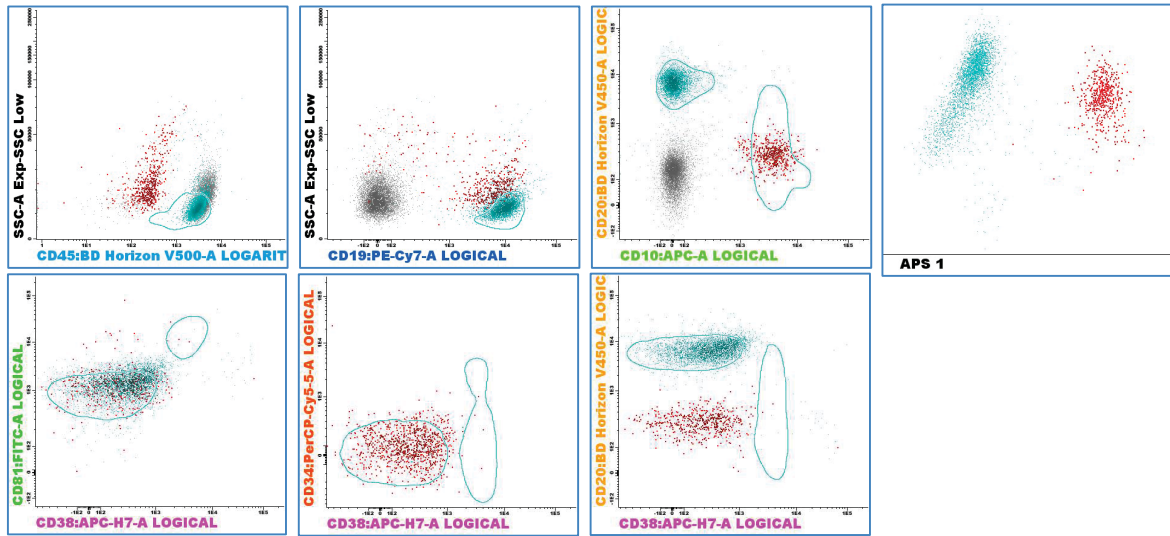


Figura 11: Exemplo ilustrativo de caso DRM positiva com aquisição de menos que 1.000.000 de eventos celulares, em que os marcadores de maturação e a estratégia APS conseguem separar de maneira inequívoca os blastos (vermelho) dos linfócitos B maduros normais residuais na amostra (verde). Os blastos em vermelho têm fenótipo CD10+++ , CD20- , CD34- , CD38- , CD81-/+ e CD45+ fraco.

5.3 PROCEDIMENTOS TÉCNICOS

5.3.1 Padronização dos procedimentos de bancada

A execução do projeto seguiu seguintes etapas de planejamento entre 2019 e 2023:

a. Padronização do preparo das amostras

A introdução e validação da técnica de lise total ("*bulky-lysis*") e dos painéis de anticorpos monoclonais diagnósticos estão descritos com detalhes no livro educacional do Consórcio EuroFlow™ (BURG et al., 2019; EUROFLOW CONSORTIUM, 2019).

O painel DRM consistiu em tubos projetados para detectar DRM incorporando marcadores principais de acordo com as diretrizes internacionais do European Leukemia Net (HEUSER et al., 2021) e do grupo EuroFlow™ (EUROFLOW CONSORTIUM, 2018). Após avaliação da qualidade da amostra recebida (morfologia, hemodiluição, celularidade, volume, anticoagulante), e contagem celular, as amostras eram selecionadas para lise total ou lise convencional das hemácias. Nos casos em que a contagem de leucócitos fosse menor que 20.000/uL era realizada "*bulk-lysis*" com cloreto de amônio (Anexo 4). Nos demais casos foi optado por pipetar 300uL de amostras e processar com lise convencional das hemácias usando FACS Lysing Solution (BD Biosciences). O protocolo de marcação com anticorpos monoclonais era realizado antes da lise das hemácias (cora-lisa-lava). Para as amostras do diagnóstico, eram adquiridos entre 100.000 e 200.000 eventos celulares por tubo, enquanto para as análises de DRM eram adquiridos até 5.000.000 eventos por tubo.

- Painel DRM LLA-B:

O painel para detecção de DRM em casos de LLA-B foi semelhante ao painel de dois tubos proposto pelo grupo EuroFlow™ (P. Theunissen, Mejstrikova, Sedek, Van Der Sluijs-Gelling, Gaipa, Bartels, Sobral da Costa, et al. 2017b), utilizando dois tubos de oito cores, com sete marcadores básicos: CD81 FITC (clone JS81), CD34 PercpCy5.5 (clone 8G12), CD19 Pcy7 (clone J3-119), CD10 APC (clone MEM-78), CD20 V450 (clone L27), CD38 APC-H7 (clone HB7) e CD45 V500c (clone 2D1). Para melhor discriminar linfoblastos de precursores B normais, CD66c PE (clone B62) e CD123 PE (clone 9F5) foram incluídos no Tubo 1 e CD73 PE (clone AD-2) e CD304 PE (clone Neuropilina-1) no Tubo 2. Este painel foi validado e padronizado a nível nacional (Ikoma-Colturato et al. 2023), e depois comparado com um tubo de 10 cores que incluía os 11 marcadores no mesmo tubo através da adição de CD304 APC-R700 e CD73 BV506 no primeiro tubo.

A validação do tubo de 10 cores para a detecção da DRM de LLA-B foi realizada em 30 casos avaliados entre janeiro de 2020 e fevereiro de 2022. Este estudo propôs a utilização dos marcadores de maturação (CD19, CD10, CD20, CD38, CD45, CD81) e dos quatro marcadores discriminatórios (CD66c, CD123, CD73, CD304) num único tubo de 10 cores. Os marcadores CD66c e CD123, ambos praticamente negativos em células precursoras B normais/reativas, foram combinados no canal de ficoeritrina (PE) como no primeiro tubo EuroFlow™. Os anticorpos monoclonais CD73 e CD304 foram associados aos fluorocromos BV605 e APC-R700, respetivamente (Tabela 4).

Tabela 4: Painel de anticorpos monoclonais de 8 e 10 cores comparativo das LLA-B

FITC	PE	PerCP Cy5.5	PECY7	APC	APCH7	V450	V500	BV605	APC R700
CD81	CD66c+CD123	CD34	CD19	CD10	CD38	CD20	CD45	CD73	CD304
CD81	CD73+CD304	CD34	CD19	CD10	CD38	CD20	CD45	--	--

Esta estratégia permitiu a análise de todos os eventos celulares num único tubo, alcançando uma elevada sensibilidade (10^{-4} a 10^{-6}), e os resultados foram apresentados em evento científico (ANEXO 5A).

- Painel DRM LMA:

O painel de anticorpos para DRM de LMA incluiu CD7 FITC (clone 4H9), CD10 APC-H7 (clone H10A), CD11b APC (clone D12), CD13 PE (clone L138), CD14 APC-H7 (clone MφP9), CD16 FITC (clone CLB-Fc-gran/1), CD33 APC (clone P67.6), CD36 FITC (clone CLB-IVC7), CD64 PE (clone 10.1), CD117 Pcy7 (clone 104D2), HL-DR V450 (clone L243), CD34 PerCPy5.5 (clone 8G12), CD38 APC-H7 (clone HB7), CD45 V500c (clone 2D1), CD56 PE (clone N901*) e CD300e APC (clone UP-H2).

- Painel DRM LLA-T:

Os marcadores DRM de células T incluíam CD3 citoplasmático V450 (clone HCHT1), CD3 de superfície APC-H7 (clone SK7), CD5 PerCPy5.5 (clone L17F12), CD7 APC (clone M-T701), CD45 V500c (clone 2D1), CD99 PE (clone Tü12) e CD117 Pcy7 (clone 104D2).

5.3.2 Padronização da aquisição e performance dos citômetros de fluxo

O protocolo de coloração foi cora-lisa-lava e as amostras foram adquiridas em um citômetro FACSCanto II™ (BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica) usando o software FACS-Diva (BD Biosciences). As configurações do instrumento foram geradas de acordo com as diretrizes EuroFlow™ (KALINA et al., 2012) e a padronização do equipamento era realizada através de uso de esferas de calibração diária proporcionada pelo uso de Rainbow beads (Sphero™ Rainbow Calibration Particles, Spherotech, Lake Forest, IL). A padronização do citômetro FACSLytic™ foi feita com files enviados no site do grupo EuroFlow™ para padronização internacional (Figura 12). A estabilidade dos fluorocromos foi verificada ao longo do processo de aquisição das beads através da fluorescência de cada marcador. Os parâmetros do citômetro de fluxo foram considerados estáveis (calibração, ajustes fluorescências, compensação) após aplicação dos controles de qualidade internos diários. Os dois equipamentos de citometria de fluxo foram validados com acompanhamento diário e comparação de amostras analisadas em paralelo, em que foram adquiridas entre um e dez milhões de células viáveis por tubo, conforme a celularidade da amostra.

Figura 12: Correlação entre os citômetros FACSCanto II™ e FACSLytic™

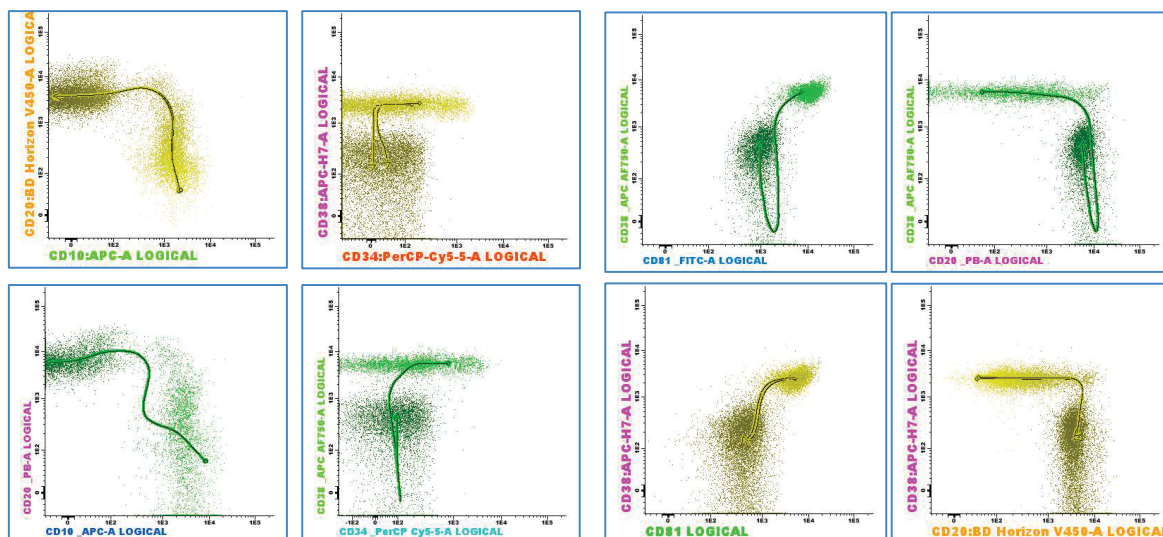


Figura 12: Correlação entre a maturação linfóide B nos citômetros FACSCanto II™ (amarelo) e FACSLytic™ (verde), sem diferença na sensibilidade atingida ou percentual de células nas fases de maturação estudadas.

5.3.3 Padronização das estratégias de análise imunofenotípica

A análise de dados foi realizada com o software Infinicyt™ versão 2.1 (Cytognos SL, Salamanca, Espanha), com revisão crítica de todos os casos, sempre por dois analistas (dupla conferência).

A análise da curva de maturação dos linfócitos B foi feita com os marcadores *backbones* - CD19, CD10, CD20, CD34, CD38, CD45, CD81, e os marcadores aberrantes no mesmo tubo (CD66c, CD123, CD73 e CD304). As amostras de DRM foram analisadas utilizando estratégias de fusão de dados (*merge*) e separação automática de populações (*automatic population separation – APS*).

Inicialmente, as células B foram selecionadas com base na expressão de CD19, excluindo duplicatas e detritos identificados por suas características de dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC). As células B foram definidas no gráfico SSC vs. CD19, incluindo linfoblastos B, hematogônias ou linfócitos B normais, dependendo da amostra, como exemplificado na figura 11. Para excluir células plasmáticas e estromais, foi aplicada uma abordagem de *gating* (Boolean) utilizando os gráficos de dispersão CD81 vs. CD38 e CD81 vs. CD73. Em seguida, foram analisadas as interseções entre CD10 vs. CD20, CD20 vs. CD38 e CD34 vs. CD38 para delinear os estágios de maturação dos precursores linfoides B, categorizando-os em pré-B-I, pré-B-II e células B maduras.

Os linfoblastos B aberrantes foram identificados comparando seus perfis fenotípicos com os padrões normais de maturação (*different-from-normal – DifN*) e o imunofenótipo associado à leucemia (*leukemia-associated immunophenotypes – LAIPs*). A presença de expressão aberrante dos quatro marcadores conjugados a PE (CD123, CD66c, CD73 e CD304) na população de células B foi considerada anômala. A população de blastos aberrantes foi quantificada como percentual do total de células nucleadas no sangue.

O microambiente medular também foi avaliado através da presença de células estromais mesenquimais (MSC) e endoteliais (ESC), as quais puderam ser avaliadas através do tubo que continha CD81, CD10, CD34 e CD73 (resultados não mostrados nesta versão do trabalho).

5.3.4 Validação da Sensibilidade Analítica

Para a avaliação da presença de níveis muito baixos de células anormais e aumento da sensibilidade analítica é necessária a aquisição de um a cinco milhões de células por amostra. Para isso, consideramos que o número mínimo de células avaliadas deveria ser 1.000.000 eventos para um mínimo de 0,01% (menor que 10^{-4}) de sensibilidade e 10.000.000 para 0,0001% (menor que 10^{-6}).

A maioria das amostras de DRM deste estudo alcançou a sensibilidade adequada, ou seja, menor que 10^{-5} , com LID e LIQ menor que 0,001% (mais de 5.000.000 de eventos obtidos). Os casos de DRM de LMA alcançaram sensibilidade de 10^{-4} , com cerca de 1.000.000 de eventos avaliados nas DRM de LLA-T e LMA), conforme demonstrado na Tabela 6. A mediana no limite inferior de detecção (LID) nas leucemias linfoides agudas foi 0,0003%, variando de 0,00018% a 0,014%.

A mediana de limite inferior de quantificação (LOQ) foi 0,0008%, variando de 0,00045% a 0,035%. Já nas leucemias mieloides agudas que foram consideradas como controle neste trabalho, a mediana de LID foi 0,001% (variando de 0,004% a 0,04%) e LOQ 0,0025% (variando de 0,001% a 0,01%).

Observamos que nas amostras coletadas antes do condicionamento a lise total nem sempre é necessária, uma vez que a celularidade das amostras é alta, geralmente maior que 30.000 leucócitos/uL. Já nas amostras do D+30 foi possível obter mais de 1.000.000 de eventos celulares em apenas um caso e mais de 4.000.000 de eventos celulares em apenas três casos. No D+60 e no D+100 foi possível obter mais de 5.000.000 de eventos por tubo em todas as amostras analisadas.

Tabela 5: Sensibilidade do Método e Limites Inferiores de Detecção e Quantificação

Eventos adquiridos viáveis	1.000.000	2.000.000	5.000.000	8.000.000	10.000.000
Sensibilidade do método	<0,01%	<0,005%	<0,002%	<0,001%	<0,0001%
LID	<0,002%	<0,001%	< 0,0004%	<0,0002%	0,0002%
LIQ	<0,005%	<0,002%	<0,001%	<0,0006%	0,0005%

Legenda: LID, limite inferior de detecção; LIQ, limite inferior de quantificação. Baseado em Fuda & Chen, Curr Hematol Malig Rep (2018) 13:455–466; Brüggemann et al, Leukemia 24:521, 2010.

Os limites inferiores de detecção (LID) e quantificação (LIQ) de cada amostra foram determinados individualmente em todos os casos conforme o número de eventos avaliados, conforme descrito na Tabela 5 e os resultados estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6: Número de células adquiridas por tubo nos diferentes momentos do TCTH.

	N	Número de células asquiridas (mediana, min- max)	LID	LIQ
PRE HSCT	64	3,000,000 (143,000-11,000,000)	0,00067	0,00167
LMA	31	2.000.000	0,001	0,0025
LLA-B	26	6.150.000	0,00033	0,00081
LLA-T	7	5.000.000	0,0004	0,001
D30	15	6.270.000 (1.000.000-12.000.000)	0,00032	0,0008
LMA	4	1.000.000	0,002	0,005
LLA-B	9	8.650.000	0,00023	0,00058
LLA-T	2	7.500.000	0,00027	0,00067
D60	15	6.000.000 (1.000.000-10.000.000)	0,00033	0,00083
LMA	5	1.000.000	0,002	0,005
LLA-B	8	9.100.000	0,00022	0,00055
LLA-T	2	7.500.000	0,00027	0,00067
D100	41	2.000.000 (1.000.000-12.000.000)	0,001	0,0025
LMA	19	1.000.000	0,002	0,005
LLA-B	16	6.075.000	0,00033	0,00082
LLA-T	6	10.000.000	0,0002	0,0005

5.3.5 Comparação da Citometria de Fluxo com a Biologia Molecular

Durante a execução do protocolo, identificou-se a necessidade de confirmar a sensibilidade do método em comparação com um padrão-ouro. Devido à ausência de um grupo controle com técnicas moleculares aplicadas a todos os pacientes, optou-se por comparar apenas as amostras avaliadas paralelamente por citometria de fluxo e biologia molecular (RQ-PCR) para os transcritos BCR::ABL1 no período do estudo.

A análise cromossômica convencional foi realizada em metáfases preparadas a partir de culturas de aspirado medular não estimulado. Foram analisadas 20 metáfases, e os resultados foram descritos conforme o *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN).

As alterações genético-moleculares e imunofenotípicas foram categorizadas retrospectivamente na corte de pacientes com LLA-B. A leucemia aguda Philadelphia-positiva (Ph⁺) foi definida pela presença da translocação t(9;22)(q34;q11) ou do rearranjo do gene BCR::ABL1. Os transcritos **p190 (e1a2)** foram associados à LLA Ph⁺ de novo, enquanto **p210** indicava transformação blástica de leucemia mieloide crônica (LMC-CB). A fase aguda foi definida pela presença de mais de 20% de linfoblastos na medula óssea.

A quantificação dos transcritos BCR::ABL1 por RT-qPCR utilizando a tecnologia TaqMan™, com ABL1 como gene controle (LEE et al., 2002). O ensaio detectou os transcritos p190 (e1a2) e p210 (e13a2 e e14a2). A curva padrão foi construída a partir de diluições seriadas dos plasmídeos linearizados contendo o inserto de BCR::ABL1 (pNC190/G ou pNC210/G) (VERMA et al., 2009).

Os resultados foram expressos como a razão percentual de cópias de BCR::ABL1 em relação ao número de cópias de ABL1 ($BCR::ABL1/ABL1 \times 100$). Para conversão à escala internacional, essa razão foi multiplicada pelo fator de conversão (CF = 0,51), determinado por comparação com 30 amostras analisadas no CHC-UFPR e no laboratório de referência do Institute of Medical and Veterinary Science, em Adelaide, Austrália, sendo posteriormente confirmado com um segundo conjunto de 30 amostras. A análise foi considerada aceitável quando o número de cópias de ABL1 ultrapassava 32.000.

Em amostras sem detecção de transcritos por PCR competitivo a técnica *nested* PCR foi utilizada para confirmação dos resultados.

A análise pareada foi realizada em 109 amostras de LLA-B Ph+. A sensibilidade e especificidade do teste foram determinadas por análise qualitativa (teste Kappa de Cohen) e análise quantitativa (correlação de Pearson), verificando concordâncias e discrepâncias entre os métodos (Figura 13).

Figura 13: Correlação entre Citometria de Fluxo e Biologia Molecular

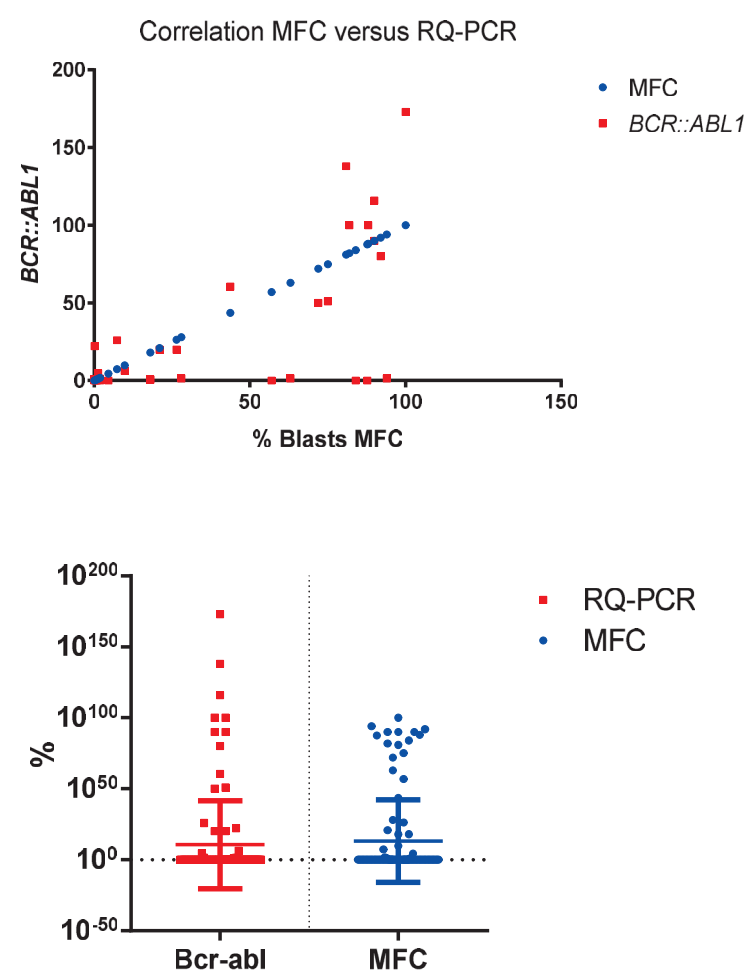


Figura 13: Correlação de Pearson dos blastos encontrados na citometria de fluxo e na RQ-PCR para *BCR::ABL1*.

5.4 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

A estatística descritiva foi utilizada para resumir as características de base dos pacientes e do transplante. Os dados foram avaliados através de um *teste t* de amostras independentes e as taxas foram comparadas utilizando o teste exato de Pearson ou de Fisher para as variáveis categóricas, e os testes de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis para as variáveis contínuas.

Os resultados do transplante foram calculados para a população como um todo e por subcategoria, conforme a DRM detectada ou não antes do transplante (DRM+ versus DRM-). Os casos foram comparados para avaliação de risco de recaída, sobrevida global (SG) e sobrevida livre de eventos (SLE) em um, dois e três anos. A SG foi definida como o tempo decorrido desde o transplante até à morte, e a SLE como o tempo decorrido até à progressão da doença (recidiva) ou morte por qualquer causa após o TCTH (mortalidade não relacionada à recidiva - MNRR).

A avaliação de risco de recaída, SG e SLE foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier, e o teste Log-Rank foi empregado para avaliar diferenças estatísticas entre as curvas. A incidência cumulativa de recaída (ICR) e a mortalidade não relacionada a recaída (MNRR) foram avaliadas por curvas de incidência cumulativa e pelo teste de Gray. O impacto do status da DRM no dia 100 pós-transplante foi avaliado pela análise de Kaplan-Meier empregando uma abordagem de marco no dia 100 (land-mark).

As correlações entre DRM em diferentes pontos temporais foram analisadas utilizando correlação de Pearson o teste de Spearman ou teste ANOVA One-way, e pós-teste de Turkey para comparação múltipla. Tabelas de contingência e testes de probabilidade de acurácia, sensibilidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) foram usados para correlacionar presença de DRM e risco de recaída ou morte. Para avaliar a relação entre os resultados de DRM por citometria de fluxo e biologia molecular nos casos com presença de transcritos *BCR::ABL1* presentes utilizou-se o coeficiente de determinação (R^2) e o teste Kappa de Cohen (K).

Um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As análises estatísticas foram efetuadas no software SPSS Statistics v.20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) e o EZR versão 1.53 (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japão) foi utilizado para a análise de risco competitivo. As análises dos pacientes com LLA-B foram realizadas no software GraphPad Prism versão 9.0 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA, www.graphpad.com).

6 RESULTADOS

Nesta tese escolhemos apresentar os resultados no formato de dois artigos científicos.

No primeiro manuscrito conduzimos uma avaliação prospectiva dos pacientes que foram submetidos ao transplante de células-tronco no período do estudo, com o objetivo de avaliar a cinética de evolução da DRM peri-transplante.

Os resultados foram publicados na revista *Scientific Reports*, ISSN 2045-2322, Qualis A1, sob o título **"Impact of High-Sensitivity Flow Cytometry on Peri-Transplant Minimal Residual Disease Kinetics in Acute Leukemia"**, em uma edição especial para doença residual mínima (Minimal Residual Disease).

O segundo manuscrito trata-se de uma análise retrospectiva de 125 pacientes com LLA-B que realizaram diagnóstico e seguimento CHC-UFPR, no período de 2017 a 2023, focando nas alterações citogenéticas e nas alterações imunofenotípicas associadas. O objetivo principal foi a validação da sensibilidade e especificidade do método de pesquisa da DRM por citometria de fluxo, comparando com o método padrão ouro, RT-PCR para *BCR::ABL1*.

Os resultados foram publicados na revista *International Journal of Molecular Science*, ISSN 1422-0067, Qualis A2, sob o título **"Comprehensive Analysis of High-Sensitive Flow Cytometry and Molecular Mensurable Residual Disease in Philadelphia Chromosome-Positive Acute Leukemia"**, em uma edição especial para citometria de fluxo e biologia molecular (Trends and Prospects of Flow Cytometry in Cell and Molecular Biology).

Os textos completos estão na sequência deste trabalho.



OPEN Impact of high-sensitivity flow cytometry on peri-transplant minimal residual disease kinetics in acute leukemia

Ana Paula de Azambuja^{1,2}✉, Miriam Perlingeiro Beltrame³, Mariester Malvezzi², Yara Carolina Schluga², Julie Lillian Pimentel Justus², Alberto Cardoso Martins Lima⁴, Vaneuza Araujo Moreira Funke¹, Carmem Bonfim⁵ & Ricardo Pasquini¹

Minimal residual disease (MRD) detected before hematopoietic cell transplantation (HCT) is associated with adverse outcomes in patients with high-risk acute leukemia. However, the ideal time points for post-transplant MRD assessment and the clinical significance of low levels of residual disease in this context are unclear. We conducted a prospective real-world analysis of high-sensitivity flow cytometry MRD performed before and after transplant (at days 30, 60 and 100) in 77 acute leukemia patients. The aim was to evaluate the kinetics of disease elimination and correlate it with transplant outcomes. Pre-transplant MRD was negative in 42 (MRD-) and positive in 35 patients (MRD+). Post-transplant MRD assessment was feasible at day 30 ($n=30$, 38.9%), day 60 ($n=27$, 35.0%) and day 100 ($n=60$, 77.9%). Relapses occurred in 8 patients in the MRD+ group (22.9%) and three in the MRD-negative group (7.1%), $p=0.02$. Pre-transplant MRD correlated with a decrease in overall survival (OS; 87.9% MRD- vs. 54.0% MRD+) and event-free survival (EFS; 85.3% MRD- vs. 51.1% MRD+), $p=0.001$. Cumulative incidence of relapse (CIR) was 17.5% in MRD+ vs. 2.6% in MRD- ($p=0.049$). Non-relapse mortality (NRM) was 31.4% in MRD+ vs. 12.1% in MRD- ($p=0.019$). One-year OS was higher in patients with negative MRD at d100 (92.4%, 95% CI: 0.81–0.971) than positive d100 MRD (53.3%, 95% CI: 0.177–0.796), $p<0.0001$. Disease status and d100 MRD were associated with OS, EFS and CIR. Differences in NRM between leukemia types (ALL: 18.9% MRD- vs. 50% MRD+, and AML 0% MRD- vs. 21.7% MRD+, $p=0.0158$) were also observed. In conclusion, pre-transplant MRD assessed by highly sensitive flow cytometry accurately identified patients with adverse prognoses. Persistent MRD after HCT could predict relapse with high specificity and clinical sensitivity. These results highlight the importance of incorporating peri-transplant MRD kinetics into the routine treatment of acute leukemia, particularly in low/middle-income countries.

Keywords Minimal residual disease, Measurable residual disease, Acute lymphoblastic leukemia, Acute myeloid leukemia, Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, Flow cytometry, Biomarkers

Minimal or measurable residual disease (MRD) is a useful tool for assessing the quality of response after treatment in pediatric and adult patients diagnosed with acute leukemia^{1,2}. High-risk patients typically require allogeneic hematopoietic cell transplantation (HCT) during the first or second complete remission (CR1/CR2) as a unique curative option^{3,4}. Unfortunately, relapse and treatment-related mortality limit efficacy and can lead to transplant failure^{5–7}. Notably, the presence of residual disease immediately before transplantation is associated with unfavourable outcomes in both lymphoblastic (ALL)^{8–11} and myeloblastic (AML)^{12–14} acute leukemia. Additionally, post-transplant MRD appears informative for predicting relapses^{9,15,16} and has been instrumental in tailoring treatment approaches, such as early reduction of immunosuppression^{17–19}.

¹Bone Marrow Transplantation Unit, Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil.

²Flow Cytometry Laboratory, Hospital de Clínicas Universidade Federal do Paraná, Avenida Nossa Senhora da Luz, 487, apto 601, 82510-020 Curitiba, Paraná, Brazil. ³Flow Cytometry Laboratory, Hospital Erasto Gaertner, Curitiba, Brazil. ⁴Histocompatibility Laboratory, Hospital de Clínicas Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil. ⁵Instituto de Pesquisa Pele Pequeno Príncipe/Faculdades Pequeno Príncipe, Curitiba, Brazil. ✉ email: apazamb@gmail.com

⁶Instituto de Pesquisa Pele Pequeno Príncipe/Faculdades Pequeno Príncipe, Curitiba, Brazil. ✉ email: apazamb@gmail.com

"Impact of High-Sensitivity Flow Cytometry on Peri-Transplant Minimal Residual Disease Kinetics in Acute Leukemia"

Ana Paula de Azambuja^{1,2*}, Miriam Perlingeiro Beltrame³, Mariester Malvezzi², Yara Carolina Schluga², Julie Lillian Pimentel Justus², Alberto Cardoso Martins Lima⁴, Vaneuza Araujo Moreira Funke¹, Carmem Bonfim⁵, Ricardo Pasquini¹.

1. Bone Marrow Transplantation Unit, Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil;
2. Flow Cytometry Laboratory, Hospital de Clínicas Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil;
3. Flow Cytometry Laboratory, Hospital Erasto Gaertner, Curitiba, Brazil.
4. Histocompatibility Laboratory, Hospital de Clínicas Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil;
5. Instituto de Pesquisa Pele Pequeno Príncipe/Faculdades Pequeno Príncipe, Curitiba, Brazil.

*Correspondence to: Ana Paula de Azambuja (A.P.A.)

Flow Cytometry Laboratory, Hospital de Clínicas da UFPR.

Avenida Nossa Senhora da Luz, 487, apto 601.

Curitiba, Paraná, Brazil – postal code: 82510-020.

Phone: +55 (41) 99605-1249 Fax: +55 (41) 3360-7998

e-mail: apazamb@gmail.com

ABSTRACT

Minimal residual disease (MRD) detected before hematopoietic cell transplantation (HCT) is associated with adverse outcomes in patients with high-risk acute leukemia. However, the ideal time points for post-transplant MRD assessment and the clinical significance of low levels of residual disease in this context are unclear. We conducted a prospective real-world analysis of high-sensitivity flow cytometry MRD performed before and after transplant (at days 30, 60 and 100) in 77 acute leukemia patients. The aim was to evaluate the kinetics of disease elimination and correlate it with transplant outcomes. Pre-transplant MRD was negative in 42 (MRD-) and positive in 35 patients (MRD+). Post-transplant MRD assessment was feasible at day 30 (n=30, 38.9%), day 60 (n=27, 35.0%) and day 100 (n=60, 77.9%). Relapses occurred in 8 patients in the MRD+ group (22.9%) and three in the MRD-negative group (7.1%), $p=0.02$. Pre-transplant MRD correlated with a decrease in overall survival (OS; 87.9% MRD- vs. 54.0% MRD+) and event-free survival (EFS; 85.3% MRD- vs. 51.1% MRD+), $p=0.001$. Cumulative incidence of relapse (CIR) was 17.5% in MRD+ vs. 2.6% in MRD- ($p=0.049$). Non-relapse mortality (NRM) was 31.4% in MRD+ vs. 12.1% in MRD- ($p=0.019$). One-year OS was higher in patients with negative MRD at d100 (92.4%, 95% CI: 0.81-0.971) than positive d100 MRD (53.3%, 95% CI: 0.177-0.796), $p<0.0001$. Disease status and d100 MRD were associated with OS, EFS and CIR. Differences in NRM between leukemia types (ALL: 18.9% MRD- vs. 50% MRD+, and AML 0% MRD- vs. 21.7% MRD+, $p=0.0158$) were observed. In conclusion, pre-transplant MRD assessed by highly sensitive flow cytometry accurately identified patients with adverse prognoses. Persistent MRD after HCT could predict relapses with high specificity and clinical sensitivity. These results highlight the importance of incorporating peri-transplant MRD kinetics into the routine treatment of acute leukemia, particularly in low/middle-income countries.

Keywords: minimal residual disease, measurable residual disease, acute lymphoblastic leukemia, acute myeloid leukemia, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, flow cytometry, biomarkers.

INTRODUCTION

Minimal or measurable residual disease (MRD) is a useful tool for assessing the quality of response after treatment in pediatric and adult patients diagnosed with acute leukemia^{1,2}. High-risk patients typically require allogeneic hematopoietic cell transplantation (HCT) during the first or second complete remission (CR1/CR2) as a unique curative option^{3,4}. Unfortunately, relapse and treatment-related mortality limit efficacy and can lead to transplant failure^{5,6,7}. Notably, the presence of residual disease immediately before transplantation is associated with unfavorable outcomes in both lymphoblastic (ALL)^{8,9,10,11} and myeloblastic (AML)^{12,13,14} acute leukemia. Additionally, post-transplant MRD appears informative for predicting relapses^{9,15,16} and has been instrumental in tailoring treatment approaches, such as early reduction of immunosuppression^{17,18,19}.

MRD detection methods, including multiparameter flow cytometry and next-generation multigene sequencing (NGS), are increasingly sensitive^{20,21}. Recent advancements in flow cytometry standardization and validation for high-sensitivity testing have expanded its utility by incorporating new markers and analyzing a greater number of cellular events^{22,23,24}. Consequently, the flow cytometry sensitivity can be compared with that of molecular techniques, increasing the accuracy of residual cell detection^{25,26,27}. However, the clinical significance of detecting such low levels of residual disease in the context of hematopoietic stem cell transplantation remains unknown^{28,29}.

Previous studies have emphasized the critical role of detecting and quantifying residual disease before and after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation^{8,10,11,14}. Despite this, the role of high-sensitive MRD detection methods, the best time points to assess post-transplant MRD in acute leukemia and the significance of low levels of residual disease in this context are unclear^{9,15,30}.

In Brazil, acute leukemias represent one of the primary indications for hematopoietic cell transplant across all age groups, with nearly half of the cases transplanted in first remission³¹. While retrospective studies in adult³² and pediatric^{33,34} cohorts have linked MRD negativity after induction therapy with prolonged overall and event-free survival, the importance of peri-transplant MRD and the kinetics of post-transplant MRD in countries with limited resources must be better characterized^{35,36,37,38}. This prospective study investigates the role of high-sensitivity flow cytometry MRD done before and after transplantation in high-risk acute

leukemia in a real-world setting, to evaluate the kinetics of disease elimination and correlate it with transplant outcomes.

METHODS

Study design and patient characteristics.

A prospective, longitudinal, and observational study was conducted on consecutive patients with high-risk acute leukemia who underwent allogeneic HCT at the Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR) in Curitiba, Paraná, Brazil, between June 2019 and June 2023.

Patients who achieved morphological complete remission status according to the international criteria³⁹ were scheduled for local high-sensitive MRD analysis before transplantation. Based on the results of the MRD test, patients were categorized into two groups: the pre-transplant MRD-positive (MRD+) and negative (MRD-) groups. Patients were assessed for MRD detection at days 30, 60 and 100 after HCT, and at days 180 and 360 according to survival.

Definitions

Complete remission (CR) was characterised by morphological remission with fewer than 5% blasts in the bone marrow (BM) and no evidence of extramedullary disease. Relapse was defined as any evidence of disease above a detectable level at bone marrow or extra-medullary sites, with a threshold of 10^{-4} (<0.01%) in ALL and 10^{-3} (>0.1%) in AML patients. Neutrophil engraftment was described as a neutrophil count greater than $0.5 \times 10^9/L$ for three consecutive days, while platelet engraftment required a platelet count greater than $20 \times 10^9/L$ for seven days without platelet transfusion. Acute graft-versus-host disease (aGvHD) and chronic graft-versus-host disease (cGvHD) were diagnosed and classified according to established criteria, with grading determined according to the pattern and severity of organ involvement⁴⁰. Donor chimerism was identified by short tandem repeats (STR) analysis using the polymerase chain reaction technique. Complete donor chimerism was defined as the presence of over 95% donor-derived cells, and mixed chimerism was defined as the detection of 5%-95% donor-derived cells⁴⁴.

Flow cytometry sample preparation

Bone marrow aspiration for MRD testing was routinely performed in the month before transplantation and on days d30, d60, d100, and d360 after HCT, depending on patient survival. Briefly, 2-3 ml of bone marrow sample was collected in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) anticoagulant and processed within 24 hours according to European Leukemia Net guidelines²¹. The staining protocol included a lyse-wash protocol using FACS Lysing Solution (BD Biosciences) and, if necessary, an ammonium chloride-based lysis solution^{41,42}. Samples were acquired on a FACSCantoII™ cytometer (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) using FACS-Diva software (BD Biosciences). Instrument settings were generated according to EuroFlow™ guidelines⁴² and data analysis was performed using Infinicyt™ software version 2.0 (Cytognos SL, Salamanca, Spain).

The MRD panel consisted of 8-colour tubes designed to detect residual disease in acute leukemia, incorporating core MRD markers according to international guidelines^{44,45}. For accurate MRD assignment in cases of B-cell precursor ALL (BCP-ALL), a standard protocol was adopted using the two tubes described by Theunissen et al.²⁶ in 2017. The panel comprised CD10 APC (clone MEM-78), CD19 Pcy7 (clone J3-119), CD20 V450 (clone L27), CD34 PercpCy5.5 (clone 8G12), CD38 APC-H7 (clone HB7), CD45 V500c (clone 2D1), CD66c PE (clone B62), and CD73 PE (clone AD-2), CD81 FITC (clone JS81), CD123 PE (clone 9F5) and CD304 PE (clone Neuropilin-1). T-cell ALL MRD markers included cytoplasmic CD3 V450 (clone HCHT1), surface CD3 APC-H7 (clone SK7), CD5 PercpCy5.5 (clone L17F12), CD7 APC (clone M-T701), CD45 V500c (clone 2D1), CD99 PE (clone Tü12), and CD117 Pcy7 (clone 104D2). The antibody panel for AML MRD included CD7 FITC (clone 4H9), CD10 APC-H7 (clone H10A), CD11b APC (clone D12), CD13 PE (clone L138), CD14 APC-H7 (clone MφP9), CD16 FITC (clone CLB-Fc-gran/1), CD33 APC (clone P67.6), CD36 FITC (clone CLB-IVC7), CD64 PE (clone 10.1), CD117 Pcy7 (clone 104D2), HL-DR V450 (clone L243), CD34 PercpCy5.5 (clone 8G12), CD38 APC-H7 (clone HB7), CD45 V500c (clone 2D1), CD56 PE (clone N901*), and CD300e APC (clone UP-H2). The arrangement of the monoclonal antibody panel and fluorescence used are detailed in Supplementary Table S1.

Measurable Residual Disease Detection

MRD was done using a combination of the "different from normal" method (DifN) and leukemia-associated immunophenotype (LAIP), adhering to current literature^{21,22}.

We routinely acquire more than one to two million cellular events per tube for AML and T-cell ALL and 5,000,000 events per tube in BCP ALL patients²⁶, ensuring the test's sensitivity. The objective was to obtain a sensitivity of at least 10^{-4} (<0.01%) for a higher resolution. Thresholds were determined using the limit of detection (LoD) and lower limit of quantification (LLOQ), with a cluster of 20 events required to confirm positive MRD and a cluster of 50 events are necessary for MRD quantification^{25,44,45}.

The presence of any level of abnormal cells constitutes the **MRD-positive group (MRD+)**, whereas patients with less than 10^{-4} (<0.01%) blast cells were considered the **MRD-negative (MRD-)** group. Patients with more than 5% of blasts were considered to have **active disease**. The abnormal blast population was quantified as a percentage of total nucleated blood cells and the frequency of normal neutrophils, monocytes, lymphocytes, erythrocytes, and myeloid precursors.

Statistical analysis

Descriptive statistics were used to summarize baseline patient and transplantation characteristics. An independent sample *t*-test assessed data, with rates compared using Pearson's or Fisher's exact test for categorical variables and Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests for continuous variables. Overall survival (OS) was defined as the time from transplant to death from any cause, and event-free survival (EFS) as the time until disease progression (relapse) or death of any cause, including non-relapse mortality (NRM). Transplant outcomes were calculated for the population as a whole and by the MRD subcategory (pre-transplant MRD+ vs. MRD-). The primary endpoint was two-year overall survival, and secondary endpoints included EFS, post-transplant relapse rate, cumulative incidence of relapse (CIR) and NRM. The Kaplan-Meier method was used to generate survival curves, and the Log-Rank test was employed to evaluate statistical differences between the curves. Relapse and NRM were evaluated by cumulative incidence (CI) curves and the Gray test. The impact of MRD status at day 100 post-transplant was evaluated by Kaplan-Meier analysis with a log-rank test, employing a landmark approach at day 100. Correlations between MRD at different time points were analysed using Spearman's test. A contingency table was constructed to analyse MRD

positivity before and after transplantation and relapse at two years of follow-up. A 2-sided *p*-value ≤ 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed in SPSS Statistics v.20.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and EZR version 1.53 (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan) was used for competing risk analysis.

Ethics committee

This study was approved by the CHC-UFPR Medical Ethics Committee under protocol number CAAE 84969718.0.000.0096 and was conducted following the principles of the Declaration of Helsinki. The patient or legal guardian consented to use biological material and access to medical records. The authors confirm that NO organs or tissues were harvested from prisoners. All BM or peripheral blood donors, whether related or unrelated, provided informed consent for donation. Medical records were accessed in the hospital's database system.

RESULTS

Patient cohort

During the study period, eighty-six patients with high-risk leukemia underwent transplantation. Nine patients were excluded due to active disease or frank dysplasia. Consequently, the cohort comprised 77 acute leukemia patients who achieved morphological remission and had a local high-sensitivity flow cytometry analysis performed before the procedure. There were 39 ALL patients (29 BCP-ALL, 10 high-risk T-cell ALL), and 38 AML patients. The patients were divided into two groups according to pre-transplant MRD status: 35 MRD+ (23 AML and 12 ALL patients) and 42 MRD- (27 ALL and 15 AML). Post-transplant MRD assessment was possible at d30 (n=30, 38.9%), d60 (n=27, 35.0%) and d100 (n=60, 77.9%).

The flowchart in Figure 1 illustrates the evolution of each subgroup.

Baseline demographic and clinical characteristics of participants

There were 77 patients, a median age of 36.4 (range 2.0 to 62.5 years), 55.8% males. Regarding disease status, 53 (68.8%) patients were in first complete remission (CR1), 22 (28.6%) were in CR2, and two (5.6%) were in CR3 before transplantation. A higher proportion of patients in CR1 were in the MRD negative group (83.3% vs 51.4%, $p=0.003$) than other disease status

groups. Among acute lymphoblastic leukemia patients the molecular analysis showed *BCR::ABL1* fusion in 14 patients (35.9% of ALL group), one hyperdiploidy karyotype, and two *KMT2A* pro-B ALL.

Considering transplant-related variables, 38 (49.4%) patients received a matched-related donor, 27 (35.1%) received an unrelated donor, and twelve (15.6%) received a haploidentical transplant. Bone marrow was the source of cells in 44 patients, and peripheral blood in 33 patients. All patients received myeloablative conditioning regimens, which included total body irradiation (TBI) and cyclophosphamide 120 mg/kg (Cy/TBI, n=33, 42.9%), Busulfan and cyclophosphamide (Bu/Cy, n=37, 41.8%) ± rabbit anti-thymocyte globulin (ATG), or regimens based on fludarabine (Flu/TBI, n=7, 9.1%).

A higher proportion of TBI regimens were used in the MRD- versus MRD+ group (66.7% vs 37.1%, $p=0.012$). The prophylaxis treatment of graft-versus-host disease (GvHD) was based on short-term methotrexate (MTX) combined with cyclosporine A (CSA) (n=60, 77.9%) or post-transplant cyclophosphamide (PTCy) plus CSA and mycophenolate mofetil (n=17, 22.1%). There were no significant differences in age, sex, disease subtype and characteristics, cell source, donor type, or GvHD prophylaxis between MRD+ and MRD- groups. Table 1 summarizes patient characteristics stratified according to pre-transplant MRD status and univariate analysis.

Hematopoietic engraftment and early post-transplant complications

The median time for neutrophil engraftment was 19 days (range 15-23), and platelet engraftment was 21 days (range 13-28). One patient did not achieve neutrophil engraftment but was successfully rescued with a second transplant, while the other six died without engraftment. Infections were documented within the first 30 days of transplantation in 42 (54.5%) patients, and 17 (22.1%) required intensive care at the time of hospitalisation. Mucositis grade III-IV was observed in 58 (75.3%) with no difference between MRD+ and MRD- groups. The cumulative incidence of acute GvHD grades III-IV at d100 was 28.6%, and chronic GvHD was 49.3%, with no difference between MRD+ and MRD- groups. Complete chimerism on day 100 was documented in 45 (80.4%) patients and incomplete chimerism in 11 (19.6%) patients, $p=0.497$. NRM was higher in pre-transplant MRD+ than MRD- groups (11.9% vs. 34.3%, $p=0.019$). A total of eleven patients relapsed during the study, eight were from the pre-

transplant MRD⁺ and three from MRD⁻ (22.9% vs. 7.1%, $p=0.02$). Table 2 shows post-transplant events according to pre-transplant MRD status.

Measurable Residual Disease Analysis and Sensitivity

A total of 257 bone marrow aspirate samples were analysed, including 77 pre-transplant and 180 post-transplant samples. Most available samples achieved high sensitivity, with 1,000,000 to 10,000,000 events acquired in 255 (99.2%) samples. Considering this data, the median limits of detection and quantification achieved were 0.002% and 0.005% in AML ($<10^{-5}$), and 0.0002% and 0.0005% in ALL ($<10^{-6}$), respectively.

Eight patients in the acute lymphoblastic leukemia group had MRD higher than 0.01%, and four had quantifiable MRD at low levels (range: 0.0009-0.009). In the BCP-ALL group, we found 10 patients with bright CD10 and weak/dim CD38/CD34 expression; three cases of CD10 dim with CD34-CD38⁻; three cases with negative CD10/CD20 expression; three patients were positive for CD304/CD73, and twelve were positive for CD66c/CD123. The high-risk T-cell leukemia patients had strong CD2/CD7, and CD99 and cytoplasmic CD3 positivity with weak or negative surface CD3 in all diagnostic samples, and one patient had gamma-delta TCR expression.

The phenotype of AML patients was known in 33 cases, with 3-4 phenotypic alterations observed in each sample (mean 3). The studied LAIPs included CD34/HLA-DR negativity (15 cases), weak CD38 expression (14 cases), asynchronous expression of CD13/CD33 (17 cases), positivity of CD56 in five, and bright expression of CD7 in 10 cases; four cases expressed CD19 and CD56, and six had monoblastic phenotype.

Using DifN and LAIP approaches, we found fourteen AML cases with MRD⁺. Two cases had blasts detectable above the threshold of 0.1% (0.04% and 0.05%) and were included in the MRD⁺ group. Three patients with low expression or negative CD34 at relapse were considered as MRD⁻ in the pre-transplant analysis. These cases were most likely false negatives, but the flow cytometry analysts did not previously know this LAIP.

The clinical and biological characteristics of the patients, including LAIPs strategy in each case, are shown in Supplementary Table S2.

Pre- and Post-transplant MRD Kinetics

Post-transplant minimal residual disease was assessed at the following time points:

- (I) MRD d30 tested in 30 patients, with 2 MRD+ (relapses d116 and d117).
- (II) MRD d60 tested in 27 patients, with 2 MRD+ (relapses d116 and d168).
- (III) MRD d100 tested in 60, with 8 MRD+ (relapses days d116, d117, d205, d289, d405, d744; two cases in follow-up).
- (IV) MRD d180 tested in 19 patients, with 3 MRD+, (relapses d347 and d405, one case in follow-up).
- (V) MRD d360 tested in 18 patients, with 5 MRD+ (relapses d405, d426 and d488, two cases in follow-up).

Relapses occurred in 8 patients from the pre-transplant MRD+ (22.9%) and three from the MRD- (7.1%) groups, $p=0.02$. A significant correlation was observed between pre-transplant MRD+ and positivity at d30 ($p=0.02$) and d100 ($p=0.038$), and between positivity at any time point post-transplant with relapse ($p=0.009$).

Considering the 66 patients alive on d100, 39 (59.0%) were from the MRD- group and 27 (41.0%) from MRD+. Among these, 36 (92.3%) from the pre-transplant MRD- group remained negative and alive at d100, while three MRD- patients were assigned as MRD+ at d100, and subsequently relapsed (d269, d426 and d488). These three patients had low expression of CD34 at relapse, so they were most probably false negative cases at pre-transplant analysis⁵⁴. Of the MRD+ group, 17 out of 27 (62.9%) had MRD negative at d100 and were considered cured. Eight patients (29.6%) had persistent MRD+ after transplantation, and six of these relapsed later (d116, d117, d205, d289, d405, d744). Two patients had no detectable MRD on d100 (considered d100 MRD negative) but relapsed later (d347 and d488).

Survival and follow-up

The median follow-up for survivors was 2.96 years (range 2.74-3.2 years), with longer median survival time in the pre-transplant MRD negative than MRD positive groups (3.7 years versus 2.1 years, $p=0.001$). Overall, 27 out of 74 patients died (35.0%), with seven patients (16.6%) from the MRD- group (5 ALL/2 AML), and twenty (57.1%) from the MRD+ group (6 ALL/14 AML). The causes of death in the MRD- group included transplant-related toxicity (five patients) and late relapse (two patients). In comparison, in the MRD+ group, twelve patients died of transplant-related toxicity (7 bacterial sepsis, two fungal, one adenovirus), two patients

had COVID-19 in the first year of follow-up, and eight patients died with relapse. NRM was higher in MRD+ than MRD- groups (11.9% vs. 34.3%, $p=0.019$). A total of eleven patients relapsed during the study, eight were from the MRD+ and three from the MRD- group (22.9% vs. 7.1%, $p=0.02$).

Prognostic impact according to pre-transplant MRD status

Total cohort OS at 1 year was 74.4% (95% CI: 0.605-0.840) and 63.6% at 2 years (95% CI: 0.360-0.948), with higher OS in pre-transplant MRD negative (87.9%, 95% CI: 0.733-0.948) than the MRD positive group (54.0%, 95% CI: 0.362-0.688), $p=0.0001$. MRD positivity before transplantation was associated with lower EFS (85.3% MRD- vs. 51.1% MRD+, $p=0.0004$), with significant differences in both ALL (81.5% MRD- vs. 50.0% MRD+) and AML (92.9% MRD- vs. 51.4% MRD+) diseases, $p=0.006$ (Figure 2).

The cumulative incidence of relapse two years after transplantation was 2.6% in MRD- group (95% CI: 0.002-0.118) compared to 17.5% in the MRD+ group (95% CI: 0.069-0.321), $p=0.04$. The cumulative incidence of NRM was 31.4% in the MRD+ group (95% CI: 16.9-47.1) vs. 12.1% in the MRD- group (95% CI: 4.4-24.1), $p=0.019$, with five deaths in remission in MRD- group and twelve in MRD+ group.

Outcome results are presented in Table 3 and Figure 2 curves.

Prognostic impact according to post-transplant MRD status

Patients with persistent detectable post-transplant MRD at d100 had significantly lower one-year OS rates (53.3%, 95% CI: 0.177-0.796) compared to patients with MRD negative at this time point (92.4%, 95% CI: 0.81-0.971), $p<0.0001$ (see Supplementary Figure S5). As expected, patients with positive MRD at d100 exhibited a higher cumulative incidence of relapse (3.9% vs. 55.6%, $p<0.0001$), Figure 2.

Competing risks analysis

Competing risk analysis (Gray test) showed that patients transplanted in first complete remission (CR1) had better OS (80.7%, 95% CI: 67.1–89.1) than another clinical situation (53.8%, 95% CI: 32.3–71.2), $p=0.0009$. Other pre-transplant variables such as age, donor type, TBI use and donor chimerism were not significant for OS or EFS in competing risk analysis, as shown in Supplementary Table S3.

The cumulative incidence of relapse was significantly lower in patients transplanted at CR1 ($p=0.02$) and in those who received TBI in the conditioning ($p=0.001$), Figure 2. There were no differences in the cumulative incidence of NRM between groups ($p=0.197$). However, considering leukemia subtypes we found that in patients with ALL and negative pre-transplant MRD, the cumulative incidence of NRM was 18.9% (95% CI: 6.7-35.8) compared to 50.0% (95% CI: 19.2-74.8) in MRD+, and no patients with AML and pre-transplant MRD negative died in remission vs. 21.7% (95% CI: 7.6-40.4) of AML with MRD+, $p=0.0158$.

Clinical Sensitivity and Specificity

A contingency table was constructed considering MRD positivity before HCT, MRD status at d100, and recurrence at two years of follow-up. The presence of detectable pre-transplant MRD had a high negative predictive value (NPV) for predicting relapse (91.4%), but a positive predictive value (PPV) of only 19.1%, with low clinical sensitivity and specificity. However, positive pre-HCT MRD shows 92.0% NPV, with 73.0% sensitivity and 65.0% specificity in predicting positivity at d100. On the other hand, the persistence of post-transplant MRD positivity on d100 showed high specificity and PPV (100%) for predicting relapse, with an NPV of 97.0% and a sensitivity of 71.0% (see Supplementary Table S4).

DISCUSSION

Consistent with prior research, our results demonstrated that pre-transplant MRD assessment through flow cytometry accurately identified patients with adverse prognoses, including lower overall and event-free survival rates⁴⁶⁻⁴⁹, and a higher likelihood of relapse and NRM^{10,14}. Furthermore, the persistence of detectable residual disease post-transplantation, especially at day 100, demonstrates high clinical specificity, sensitivity, and predictive values for relapse^{9,15,16}.

Our analysis confirmed that in a real-world context, both MRD positivity and disease status at the time of transplantation were associated with a higher risk of death. Similarly, after adjustment for clinical status, MRD negativity before HCT was significantly associated with improved survival, particularly in patients in first complete remission. These results support the hypothesis that patients with high-risk leukemia in first complete remission who have negative MRD are the ones most likely to benefit from allogeneic transplantation^{18,19}.

From a methodological point of view, while flow cytometry tests for MRD detection in acute lymphoblastic leukemia have become well-established^{26,50}, challenges persist in standardizing tests for acute myeloid leukemia^{47,51} due to the lack of specific markers and potential clonal evolution⁵¹. Nevertheless, innovative technologies, including leukemic stem cell quantification⁵² and molecular assays, offer promise in reducing the likelihood of false-negative results^{53,54}, and providing additional insights on clonal architecture^{55,56,58}. Although molecular biology was not used as a comparator in this study, identifying residual disease at levels below 10^{-4} allowed the detection of at least four cases with very low disease burden. However, due to the limited number of patients evaluated, no definitive conclusions can be drawn regarding the absolute necessity of such detection levels in this context, as is discussed in literature²⁹.

In addition to pre-transplant analyses, monitoring the kinetics of minimal residual disease after transplantation can serve as a crucial indicator of relapse risk. Notably, detectable MRD at day 100 post-transplant has emerged as a reliable predictor of subsequent relapses^{16,22,27}. In the present study, the persistence of detectable MRD at day 100 was significantly associated with survival and cumulative incidence of relapse compared to patients with negative MRD at this time point. Similarly to our data, a recent multicenter retrospective analysis involving 295 AML patients undergoing hematopoietic cell transplantation indicated that patients who reached d100 and either maintained or developed a new positive MRD had an unfavourable short-term prognosis, regardless of their MRD status before transplantation⁵⁹. Another recent study suggested that MRD identification conducted earlier post-transplant, specifically between days 20 and 40, can aid the possibility of implementing preventive strategies to mitigate the risk of relapse^{15,60}. In our cohort, only half of the patients were tested for MRD on day 30 post-transplant, with two cases returning MRD positive. Notably, both patients experienced relapse around d100, suggesting an inferior prognosis. However, the small number of patients who were alive and MRD-positive at post-transplant time points limits our ability to draw definitive conclusions.

Given the heterogeneity of the patient population in this study and the relatively small number of events, careful interpretation of subgroup analyses is essential. Differences in disease biology among leukemia subtypes, treatment-related complications, and patient-specific factors significantly influence relapse rates and relapse-free mortality³⁸. For instance, our study found that relapses were more common in myeloid leukemias, a highly heterogeneous group with diverse prognostic factors, including distinct cytogenetic and molecular abnormalities that affect treatment response⁵⁵. Although allogeneic transplant is considered the best option for

AML patients with persistent MRD after first-line treatment, tumour burden, even at the MRD level, is one of the variables with the greatest impact on the outcome after treatment, as described in different studies using molecular or flow cytometry techniques^{3,12,14}. However, pre-transplant MRD positivity in AML does not always predict imminent relapse, as the graft-versus-leukaemia (GVL) effect can effectively target residual leukemic cells⁴⁰. In contrast, MRD positivity at day 100 post-transplant demonstrated high specificity and robust predictive value for relapse^{59,60}, enhancing the importance of continuous MRD monitoring during this critical period.

The unexpected association between MRD status and NRM in acute lymphoblastic leukemia in the present study merits further investigation. The potential contributing factors may include treatment-related toxicities, such as the use of high doses of TBI, the presence of aggressive or chemoresistant disease, intensified pre-transplant therapies and delayed immune recovery³⁸. Recent comprehensive data from the Brazilian Hematopoietic Stem Cell Transplant Registry (HSCTBR), covering 9,800 transplants performed between 2012 and 2022, highlighted infections as the predominant cause of death within the first 100 days across all transplant types³¹. This underlines the urgent need for local and national initiatives to improve MRD monitoring and adjust treatment plans for this subgroup of patients in our country. Strategies could include earlier referral for transplantation, better infection control measures and adjustments in transplant-related variables^{31,32,38}. On the other hand, our findings indicate that, despite the high toxicity associated with total body irradiation in conditioning, it significantly reduced relapse rates. This suggests the need to carefully balance the risks and benefits of TBI use as its enhanced disease control may outweigh potential complications, particularly in resource-limited settings^{6,31,35}.

Despite several limitations, such as the small number and heterogeneity of the cohort, our study demonstrates the feasibility and usefulness of flow cytometry as a sensitive, suitable, and cost-effective tool for detecting MRD in acute leukemia in the context of hematopoietic cell transplantation, particularly in resource-limited settings where molecular techniques may not be readily available³⁸. Furthermore, at a regional level, the implementation of the new generation 8-colour flow cytometry technique was essential both in the peri-transplant context and more generally, as before this study, only less sensitive methods, such as 4-colour flow cytometry or morphological assessments, were used in our setting^{50,57}.

Overall, our findings underscore the critical role of MRD assessment before transplantation in guiding transplant decisions and identifying patients who may require tailored interventions. Furthermore, the persistence of MRD at any point post-transplant signals a high risk of relapse and identifies patients who could benefit from proactive interventions. These interventions might include reducing immunosuppression, implementing targeted therapies, or introducing novel anti-leukemic agents^{16,30,48}. In conclusion, these findings emphasize the importance of incorporating peri-transplant MRD kinetics into the routine management of acute leukemia, particularly in low/middle-income countries, where resource optimization and early intervention can significantly impact patient outcomes.

Data availability: The data supporting this study's results (e.g., flow cytometry data files, patient consent forms, administrative documents) are available from the authors, but there are restrictions as they were used under license from the Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR) for this study. The data can be obtained on request from the corresponding author, Ana Paula de Azambuja, by e-mail at apazamb@gmail.com.

Acknowledgements: The authors would like to thank the flow cytometry laboratory and bone marrow transplantation team for their technical assistance and the AAHC team, especially Sheila Meneguette, for administrative support of the project.

Author contributions: A.P.A. wrote the main manuscript text. A.P.A., M.P.B. and M.M.: conceptualization; funding acquisition; methodology; A.P.A., Y.C.S. and J.L.P.J.: flow cytometry analysis. A.C.M.L.: statistical analysis. V.A.M.F., R.P., and C.B.: writing-review & editing. All authors approved the final version of this manuscript.

Corresponding author: Ana Paula de Azambuja, email apazamb@gmail.com.

Compliance with Ethical Standards: This study was approved by the Institutional Review Boards of the CHC-UFPR Medical Ethics Committee under protocol number CAAE.

84969718.0.000.0096, and performed following the 1964 Declaration of Helsinki.

Funding: This research was supported by an educational grant from **Programa Nacional de Apoio à Atenção Oncológica (PRONON)**, Processo NUP: 25000.055356/2015-04, Ministério da Saúde, and supported by Associação dos Amigos do Hospital de Clínicas (AAHC).

Conflict of interest: The authors declare no potential conflict of interest.

REFERENCES

1. Berry, D. A. *et al.* Association of minimal residual disease with clinical outcome in pediatric and adult acute lymphoblastic leukemia: A meta-analysis. *JAMA Oncol* **3**, (2017).
2. Short, N. J. *et al.* Association of Measurable Residual Disease with Survival Outcomes in Patients with Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncology* vol. 6 1890–1899 (2020).
3. Walter, R. B. *et al.* Significance of minimal residual disease before myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for AML in first and second complete remission. *Blood* **122**, 1813–1821 (2013).
4. Hunger, S. P. & Mullighan, C. G. Redefining ALL classification: Toward detecting high-risk ALL and implementing precision medicine. *Blood* Preprint at <https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-580043> (2015).
5. Pulsipher, M. A. *et al.* Risk factors and timing of relapse after allogeneic transplantation in pediatric ALL: for whom and when should interventions be tested? *Bone Marrow Transplant* **50**, 1173–1179 (2015).
6. Silva, W. F. *et al.* Predictive Factors and Outcomes after Allogeneic Stem Cell Transplantation for Adults with Acute Lymphoblastic Leukemia in Brazil. *Transplant Cell Ther* **28**, 763.e1-763.e7 (2022).
7. Kröger, N. *et al.* NCI first international workshop on the biology, prevention, and treatment of relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Report from the committee on disease-specific methods and strategies for monitoring relapse following allogeneic. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* **16**, 1187–1211 (2010).
8. Shen, Z. *et al.* Influence of pre-transplant minimal residual disease on prognosis after Allo-SCT for patients with acute lymphoblastic leukemia: Systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* **18**, (2018).
9. Lovisa, F. *et al.* Pre- and post-transplant minimal residual disease predicts relapse occurrence in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* **180**, 680–693 (2018).
10. Pavlů, J. *et al.* Measurable residual disease at myeloablative allogeneic transplantation in adults with acute lymphoblastic leukemia: A retrospective registry study on 2780 patients from the acute leukemia working party of the EBMT. *J Hematol Oncol* **12**, (2019).
11. Turner, M., Shah, S., Martin, A., Cong, Z. & Stein, A. S. A Systematic Literature Review (SLR) of Clinical Outcomes after Stem Cell Transplantation (SCT) in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) Patients with or without Minimal Residual Disease (MRD). *Blood* **132**, (2018).
12. Thol, F. *et al.* Measurable residual disease monitoring by NGS before allogeneic hematopoietic cell transplantation in AML. *Blood* **132**, 1703–1713 (2018).
13. Zhang, Y. *et al.* Pretransplantation minimal residual disease monitoring by multiparameter flow cytometry predicts outcomes of AML patients receiving allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Immunol* **72**, (2022).

14. Buckley, S. A. *et al.* Minimal residual disease prior to allogeneic hematopoietic cell transplantation in acute myeloid leukemia: A meta-analysis. *Haematologica* vol. 102 865–873 Preprint at <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.159343> (2017).
15. Bader, P. *et al.* Monitoring of minimal residual disease after allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia allows for the identification of impending relapse: Results of the all-bfm-sct 2003 trial. *Journal of Clinical Oncology* **33**, 1275–1284 (2015).
16. Klyuchnikov, E. *et al.* Post-Transplantation Day +100 Minimal Residual Disease Detection Rather Than Mixed Chimerism Predicts Relapses after Allogeneic Stem Cell Transplantation for Intermediate-Risk Acute Myelogenous Leukemia Patients Undergoing Transplantation in Complete Remi. *Transplant Cell Ther* **28**, 374.e1-374.e9 (2022).
17. Balduzzi, A. *et al.* Minimal residual disease before and after transplantation for childhood acute lymphoblastic leukaemia: Is there any room for intervention? *Br J Haematol* **164**, 396–408 (2014).
18. Pochon, C. *et al.* Follow-up of post-transplant minimal residual disease and chimerism in childhood lymphoblastic leukaemia: 90 d to react. *Br J Haematol* **169**, 249–261 (2015).
19. Muffly, L. How I Approach the Patient Who Has MRD or Relapse After Transplant. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* **20**, S32–S33 (2020).
20. Van Dongen, J. J. M., Van Der Velden, V. H. J., Brüggemann, M. & Orfao, A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: Need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood* **125**, 3996–4009 (2015).
21. Schuurhuis, G. J. *et al.* Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood* **131**, 1275–1291 (2018).
22. Borowitz, Michael J., Brent L. Wood, Michael Keeney, and Benjamin D. Hedley. 2022. “Measurable Residual Disease Detection in B-Acute Lymphoblastic Leukemia: The Children’s Oncology Group (COG) Method.” *Current Protocols* 2 (3). <https://doi.org/10.1002/cpz1.383>.
23. Arumugam, J. R., Bommanna, K., Radhakrishnan, V., Sagar, T. G. & Sundersingh, S. Immunophenotypic expression and immunomodulation in minimal residual disease analysis of pediatric B acute lymphoblastic leukemia by high sensitive flow cytometry. *Leuk Lymphoma* **63**, 644–652 (2022).
24. Tembhare, P. R. *et al.* A High-Sensitivity 10-Color Flow Cytometric Minimal Residual Disease Assay in B-Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma Can Easily Achieve the Sensitivity of 2-in-106 and Is Superior to Standard Minimal Residual Disease Assay: A Study of 622 Patients. *Cytometry B Clin Cytom* **98**, 57–67 (2020).
25. Fuda, F. & Chen, W. Minimal/Measurable Residual Disease Detection in Acute Leukemias by Multiparameter Flow Cytometry. *Current Hematologic Malignancy Reports* vol. 13 455–466 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s11899-018-0479-1> (2018).
26. Theunissen, P. *et al.* Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **129**, 347–357 (2017).
27. Coustan-Smith, E. & Campana, D. Immunologic minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia: A comparative approach to molecular testing. *Best Practice and*

28. Merli, P. *et al.* Minimal Residual Disease Prior to and After Haematopoietic Stem Cell Transplantation in Children and Adolescents With Acute Lymphoblastic Leukaemia: What Level of Negativity Is Relevant? *Frontiers in Pediatrics* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fped.2021.777108> (2021).
29. Logan, A. C. Measurable residual disease in acute lymphoblastic leukemia: How low is low enough? *Best Practice and Research: Clinical Haematology* vol. 35 101407 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.beha.2022.101407> (2022).
30. Bader, P. *et al.* More precisely defining risk peri-HCT in pediatric ALL: Pre- vs post-MRD measures, serial positivity, and risk modeling. *Blood Adv* **3**, 3393–3405 (2019).
31. Simione, A. J. *et al.* Current use and outcomes of hematopoietic stem cell transplantation: Brazilian summary slides - 2023. *JOURNAL OF BONE MARROW TRANSPLANTATION AND CELLULAR THERAPY* **4**, 200 (2023).
32. Fernandes da Silva Junior, W. *et al.* Treating Adult Acute Lymphoblastic Leukemia in Brazil—Increased Early Mortality Using a German Multicenter Acute Lymphoblastic Leukemia-based regimen. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* (2018) doi:10.1016/j.clml.2018.03.001.
33. Rocha, J. M. C., Xavier, S. G., Souza, M. E. de L., Murao, M. & de Oliveira, B. M. 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* **36**, 287–301 (2019).
34. Silva, K. A. de S. *et al.* Influence of minimal residual disease by multiparametric flow cytometry at day 15 of induction in risk stratification of children with B-cell acute lymphoblastic leukemia treated at a referral hospital in southern Brazil. *Hematol Transfus Cell Ther* **42**, 348–355 (2020).
35. de Melo Rodrigues, A. L. *et al.* Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Children and Adolescents with Acute Myeloid Leukemia in Brazil: A Multicentric Retrospective Study. *Cell Transplant* **29**, (2020).
36. Rocha, V. *et al.* Impact of mother donor, peripheral blood stem cells and measurable residual disease on outcomes after haploidentical hematopoietic cell transplantation with post-transplant cyclophosphamide in children with acute leukaemia. *Bone Marrow Transplant* **56**, 3042–3048 (2021).
37. Bernardi, C. *et al.* Minimal Residual Disease Analysis and its Impact after Hematopoietic Stem Cell Transplant for Acute Leukemias. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* **17**, S266 (2017).
38. Yafour, N., Hamzy, F., Elkababri, M., Yakoub-Agha, I. & Bekadja, M. A. Acute lymphoblastic leukemia in developing countries: Management from the transplant indication (allo/auto) until post-transplant follow-up. Guidelines from the SFGM-TC. *Bull Cancer* **110**, S30–S38 (2023).
39. Döhner, H. *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* vol. 129 424–447 Preprint at <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-733196> (2017).
40. Zeiser, R. & Blazar, B. R. Acute Graft-versus-Host Disease — Biologic Process, Prevention, and Therapy. *New England Journal of Medicine* **377**, 2167–2179 (2017).

41. EuroFlow Standard Operating Procedure (SOP) for Bulk Lysis for MRD Panels EuroFlow SOP for Bulk Lysis for MRD Panels Content. www.euroflow.org (2018).
42. Kalina, T. *et al.* EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* **26**, 1986–2010 (2012).
43. Euroflow Consortium. (2019). EuroFlow Standard Operating Procedure (SOP) for Sample preparation and staining (Version 1.5), 8. <https://euroflow.org/usr/pub/protocols.php>.
44. Sureda, A. *et al.* Harmonizing definitions for hematopoietic recovery, graft rejection, graft failure, poor graft function, and donor chimerism in allogeneic hematopoietic cell transplantation: a report on behalf of the EBMT, ASTCT, CIBMTR, and APBMT. *Bone Marrow Transplant* (2024) doi:10.1038/s41409-024-02251-0.
45. Döhner, H. *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood* **140**, 1345–1377 (2022).
46. Spyridonidis, A. How I treat measurable (minimal) residual disease in acute leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* **135**, 1639–1649 (2020).
47. Araki, D. *et al.* Allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia: Time to move toward a minimal residual disease-based definition of complete remission? *Journal of Clinical Oncology* **34**, 329–336 (2016).
48. Zhou, Y. *et al.* The effect of peritransplant minimal residual disease in adults with acute lymphoblastic leukemia undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* **14**, 319–326 (2014).
49. Shen, X. *et al.* Impact of pre-transplantation minimal residual disease (MRD) on the outcome of Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute leukemia. *Hematology (United Kingdom)* **26**, 295–300 (2021).
50. Ikoma, M. R. V. *et al.* Proposal for the standardization of flow cytometry protocols to detect minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* **37**, 406–413 (2015).
51. Zeijlemaker, W. *et al.* Absence of leukaemic CD34+ cells in acute myeloid leukaemia is of high prognostic value: A longstanding controversy deciphered. *Br J Haematol* **171**, 227–238 (2015).
52. Cloos, J. *et al.* Comprehensive Protocol to Sample and Process Bone Marrow for Measuring Measurable Residual Disease and Leukemic Stem Cells in Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Visualized Experiments* **2018**, (2018).
53. Tetters, J. M. *et al.* Technical Aspects of Flow Cytometry-based Measurable Residual Disease Quantification in Acute Myeloid Leukemia: Experience of the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Hemasphere* **6**, E676 (2022).
54. Zeijlemaker, W. *et al.* A simple one-tube assay for immunophenotypical quantification of leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **30**, 439–446 (2016).
55. Jongen-Lavrencic, M. *et al.* Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* (2018) doi:10.1056/NEJMoa1716863.
56. Svaton, M. *et al.* NGS better discriminates true MRD positivity for the risk stratification of childhood ALL treated on an MRD-based protocol. *Blood* **141**, (2023).

57. Ikoma-Colturato, M. R. V. *et al.* Multicentric standardization of minimal/measurable residual disease in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia using next-generation flow cytometry in a low/middle-level income country. *British Journal of Haematology* vol. 200 381–384 Preprint at <https://doi.org/10.1111/bjh.18499> (2023).
58. Getta, B. M. *et al.* Multicolor Flow Cytometry and Multigene Next-Generation Sequencing Are Complementary and Highly Predictive for Relapse in Acute Myeloid Leukemia after Allogeneic Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* **23**, 1064–1071 (2017).
59. Caballero-Velázquez, T. *et al.* Prognostic Value of Measurable Residual Disease in Patients with AML Undergoing HSCT: A Multicenter Study. *Cancers (Basel)* **15**, (2023).
60. Paras, G. *et al.* Conditioning intensity and peritransplant flow cytometric MRD dynamics in adult AML. *Blood* **139**, 1694–1706 (2022).

FIGURES

Figure 1: Flow chart of patients included in the study showing post-transplant MRD kinetic considering the pre-transplant MRD status. Abbreviations: ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; BCP-ALL, B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia; HCT, hematopoietic stem cell transplantation; days d30; d100; MDS, myelodysplastic disease; MRD, measurable residual disease; NRM, non-relapse mortality.

Figure 2: Overall survival curves (Kaplan-Meier) considering pre-transplant MRD+ *vs.* MRD- groups and clinical situation; cumulative incidence of relapse (CIR) and non-relapse mortality (NRM); event-free survival (EFS) considering pre-transplant MRD+ *versus* MRD- groups and the four leukemia disease subgroups (ALL MRD-; ALL MRD+; AML MRD- and AML MRD+), and CIR considering TBI use and MRD+ at d100.

TABLES

Table 1: Demographic and clinical characteristics according to pre-transplant MRD status.

Table 2: Post-transplant events according to pre-transplant MRD status.

Table 3: Outcomes according to pre-transplant MRD status.

SUPPLEMENTARY TABLES

Supplementary Table 1: Flow cytometry staining 8-color tubes panel designed to the leukemia diagnostic type (B-cell, T-cell, and myeloid leukemia).

Supplementary Table S2: Clinical and biological characteristics of MRD-positive patients

Supplementary Table S3: Univariate Analysis

Supplementary Table S4: Contingency table

Table 1: Demographic and clinical characteristics according to pre-transplant MRD status				
	Total (n=77)	MRD-(n=42, 54.5%)	MRD+ (n=35, 45.5%)	<i>p-value</i>
Age (y, median±sd)	36.4±17.4	34.5±16.2	34.7±17.3	0.785
Children<14y	10 (14.9%)	5 (14.7%)	5 (15.2%)	0.614
Male (n/%)	43 (55.8%)	24 (57.1%)	19 (54.3%)	0.822
Disease type				
AML (n=38)	38 (49.4%)	15 (39.5%)	23 (60.5%)	0.251
ALL (n=39)	39 (50.6%)	27 (69.2%)	12 (30.8%)	
BCP-ALL	29 (74.3%)	19 (45.2%)	10 (28.6%)	0.693
T-Cell ALL	10 (13.0%)	8 (19.0%)	2 (5.7%)	--
BCR::ABL positive	14 (35.9%)	9 (37.5%)	5 (41.7%)	0.544
Disease stage				
CR1	53 (68.8%)	35 (83.3%)	18 (51.4%)	0.003
CR2 or more	24 (31.2%)	7 (16.7%)	17 (48.6%)	
Cell source				0.368
Bone marrow	44 (57.1%)	26 (61.9%)	18 (40.9%)	
Peripheral blood	33 (42.9%)	16 (38.1%)	17 (48.6%)	
Number of cells				
CNT (x10 ⁸ /uL, median±sd)	6.2±3.2	5.7±3.1	6.3±3.1	0.874
CD34 (x106/uL, median±sd)	6.2±3.5	5.5±2.85	6.5±3.35	0.125
Donnor				
Matched related donor	38 (49.4%)	19 (45.2%)	19 (54.3%)	0,257
Unrelated donor	27 (35.1%)	18 (42.9%)	9 (25.7%)	
Haploidentical donor	12 (15.6%)	5 (11.9%)	7 (20.0%)	
HLA Incompatibilities				
None	43 (55.8%)	23 (54.8%)	20 (57.1%)	0.860
One	22 (28.6%)	13 (31.0%)	9 (25.7%)	
Two or more	12 (15.6%)	6 (14.3%)	6 (17.1%)	
Preparatory regimen				
Cy+TBI+/-ATG	35 (45.5%)	26 (61.9%)	9 (25.7%)	0.006
BU+Cy	38 (49.4%)	14 (33.6%)	24 (68.6%)	
Other (Fludarabine based)	4 (5.2%)	2 (4.8%)	2 (5.2%)	
TBI (yes)	41 (53.2%)	28 (66.7%)	13 (37.1%)	0.012
GvHD prophylaxis				
MTX+CSA	60 (77.9%)	33 (78.6%)	27 (77.1%)	0.888
PTCy+CSA+MMF	17 (22.1%)	9 (21.4%)	7 (22.9%)	
Legend: Data are described as n (%) or mean ± standard deviation. <i>p-values</i> were determined using <i>t-test</i> , Pearson's, Fisher's exact test, chi-square, or Wilcoxon-Mann-Whitney test. ALL: Acute lymphoblastic leukemia; AML: Acute myeloblastic leukemia; ATG, rabbit antithymocyte globulin; MRD: Measurable residual disease; CR: Complete remission; GvHD: graft-versus-host disease; HCT: Hematopoietic cell transplantation; BM: Bone marrow; PB: Peripheral blood; PTCy: Post-transplant cyclophosphamide; TBI: Total body irradiation; Cy: Cyclophosphamide; BU: Busulfan; MTX: Methotrexate; MMF: Mycophenolate mofetil.				

	Total (n=77)	MRD-(n=42)	MRD+ (n=35)	<i>p-value</i>
Mucositis grade III-IV	58 (75.3%)	30 (71.4%)	28 (80.0%)	0.656
Neutrophil engraftment (days)	19.3±4.3	19.6±4.3	18.5±3.5	0.753
Platelet engraftment (days)	21.2±7.4	24.2±8.3	18.4±5.8	0.257
Infection during HCT	42 (54.5%)	21 (50.0%)	21 (60.0%)	0.491
ICU in first 100 days	17 (22.1%)	6 (14.3%)	11 (31.4%)	0.099
CMV reactivation	26 (33.8%)	15 (37.5%)	11 (31.4%)	0.971
Acute GvHD grades II-IV	22 (28.6%)	9 (21.4%)	13 (37.1%)	0.140
Chronic GvHD	39 (50.6%)	21 (50.0%)	18 (51.4%)	0.901
d100 chimerism				0.497
100% donor	45 (80.4%)	30 (83.3%)	15 (75.0%)	
5%-99% donor	11 (19.6%)	6 (16.7%)	5 (25.0%)	

Legend: Data are described as n (%) or mean +/- standard deviation. *p-value* was determined using a *t-test*, Pearson's and Fisher's exact test, chi-square or Wilcoxon-Mann-Whitney test. MRD, measurable residual disease; CR, complete remission, HCT, hematopoietic cell transplantation; ICU, intensive care unit; GvHD, graft-versus-host disease; CMV, Cytomegalovirus, NRM, non-relapse mortality.

Outcomes	MRD-(n=42)	MRD+ (n=35)	<i>p-value</i>
OS (2y)	87.9% (73.3–94.8)	54.0% (36.2–68.8)	0.0001
EFS (2y)	85.3% (70.1-93.1)	51.1% (33.6-66.2)	0.0004
CI Relapse	2.6% (2.0-11.8)	17.5% (6.9-32.1)	0.049
CI NRM	12.1% (4.4-24.1)	31.4% (16.9-47.1)	0.197
Relapse (n, %)	3 (7.1%)	8 (22.9%)	0.020
NRM (n, %)	5 (11.9%)	12 (34.3%)	0.019
Median survival time (days)	1345 ± 92	769 ± 125	0.001

Legend: Data described as n (%) or mean +/- standard deviation. Kaplan-Meier and Log-Rank test was used to survival rates, with 95% confidence interval and ranges. ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloblastic leukemia; CI, cumulative incidence; MRD, measurable residual disease; NRM, non-relapse mortality.

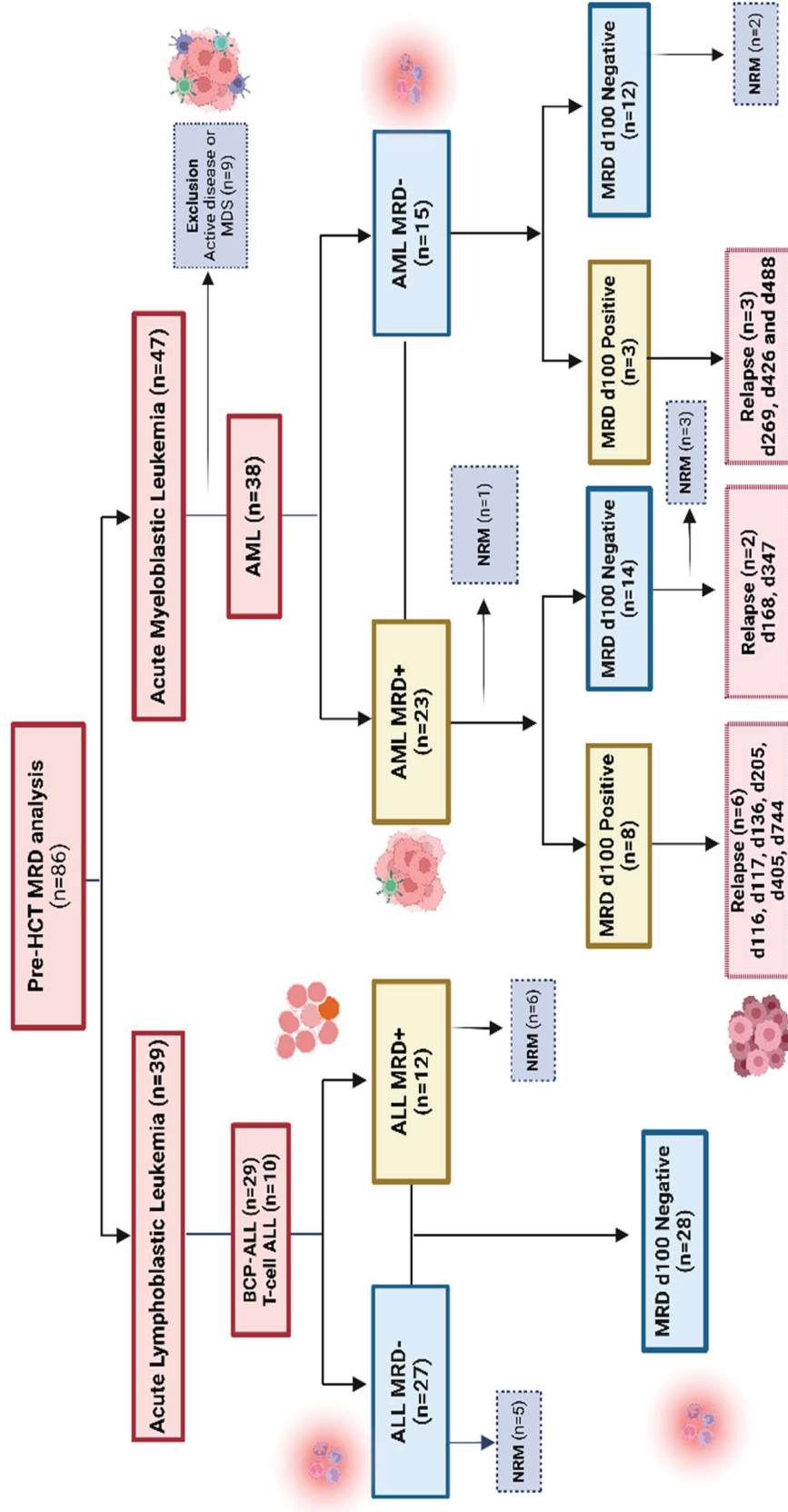


Figure 1: Flow chart of patients included in the study showing post-transplant MRD kinetic considering the pre-transplant MRD status. Abbreviations: ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; BCP-ALL, B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia; HCT, hematopoietic stem cell transplantation; days d30; d100; MDS, myelodysplastic disease; MRD, measurable residual disease; NRM, non-relapse mortality

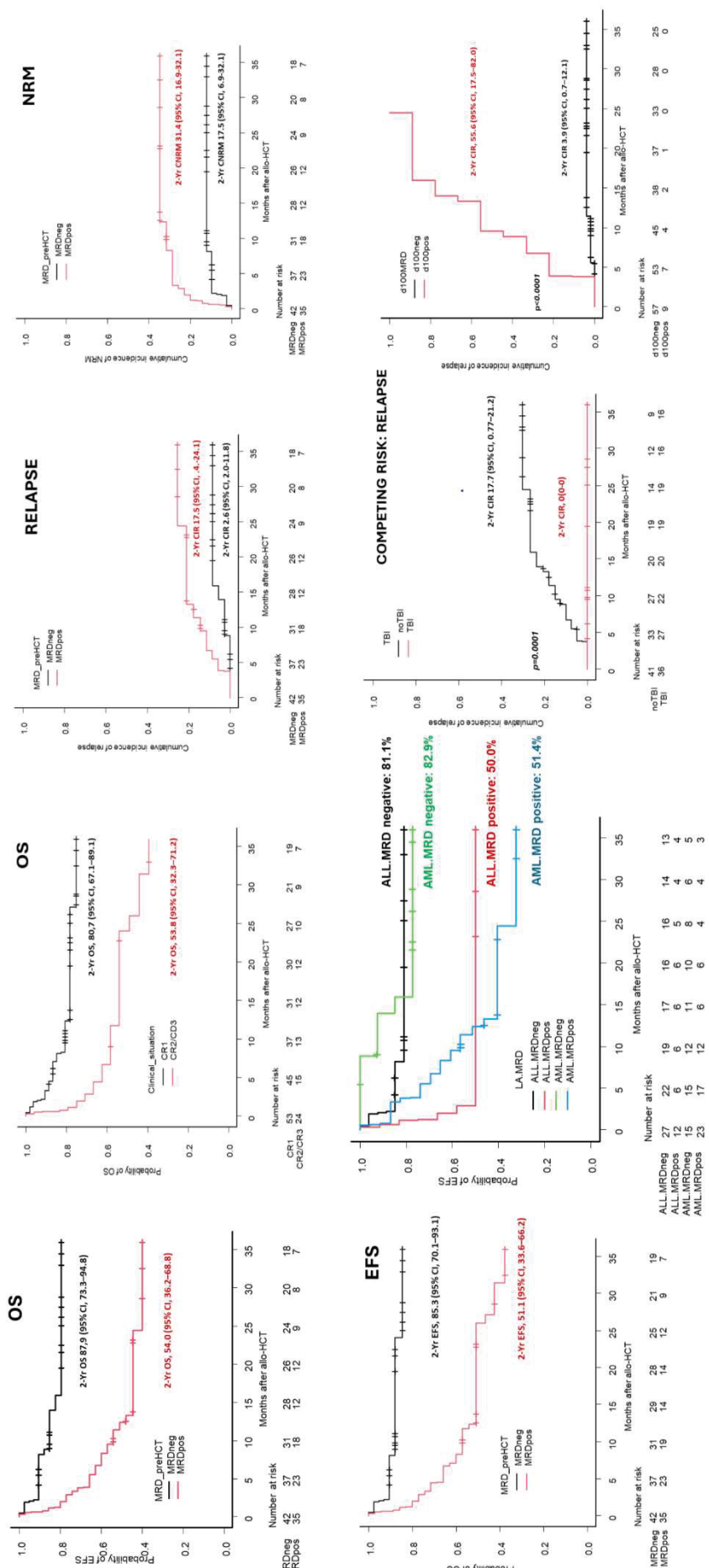
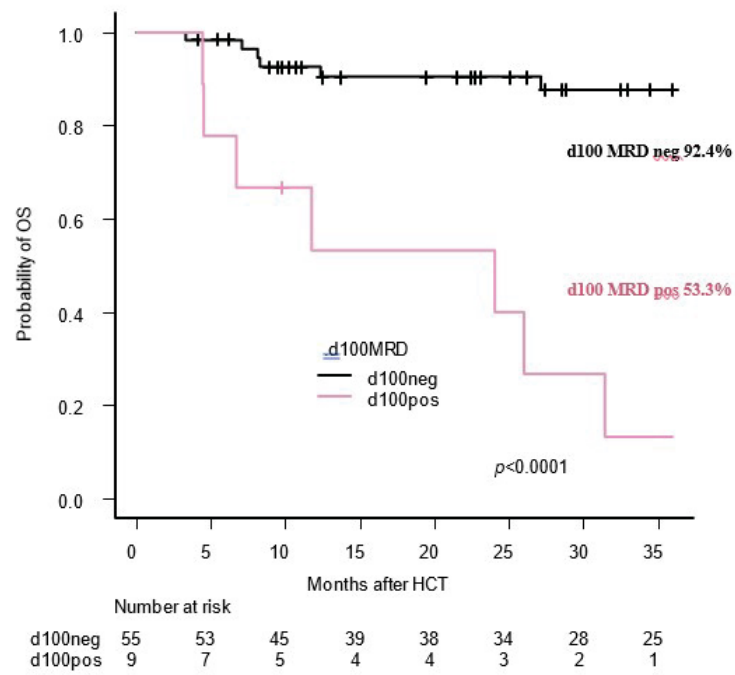


Figure 2: Overall survival curves (Kaplan-Meier) considering pre-transplant MRD+ vs. MRD- groups and clinical situation; cumulative incidence of relapse (CIR) and non-relapse mortality (NRM); event-free survival (EFS) considering pre-transplant MRD+ versus MRD- groups and the four leukemia disease subgroups (ALL MRD-; ALL MRD+; AML MRD- and AML MRD+), and CIR considering TBI use and MRD+ at d100.

Supplementary Figure S5



Supplementary Figure S5: Kaplan-Meier analysis employing a landmark approach at day 100 showing the impact of MRD detectable at d100 in one-year overall survival (92.4% vs 53.3%, $p < 0.0001$).

Supplementary Table 1: Flow cytometry staining 8-color tubes panel designed to the leukemia diagnostic type (B-cell, T-cell, and myeloid leukemia).

LEUKEMIA	V450	V500	FITC	PE	PERCP CY5.5	PECY7	APC	APCH7
BCP-ALL	CD20 <i>Clone L27</i>	CD45 <i>Clone 2D1</i>	CD81 <i>Clone JS-81</i>	CD66c / CD123 <i>Clones B6.2 / 9F5</i>	CD34 <i>Clone 8G12</i>	CD19 <i>Clone J3-119*</i>	CD10 <i>Clone MEM-78</i>	CD38 <i>Clone HB7</i>
BCP-ALL	CD20 <i>Clone L27</i>	CD45 <i>Clone 2D1</i>	CD81 <i>Clone JS-81</i>	CD73 / CD304 <i>Clones AD-2 / Neuropilin-1</i>	CD34 <i>Clone 8G12</i>	CD19 <i>Clone J3-119*</i>	CD10 <i>Clone MEM-78</i>	CD38 <i>Clone HB7</i>
T CELL ALL	cyCD3 <i>Clone HCHT1</i>	CD45 <i>Clone 2D1</i>	nTdt <i>Clone HT6*</i>	CD99 <i>Clone Tü12</i>	CD5 <i>Clone L17F12</i>	CD117 <i>Clone 104D2*</i>	CD7 <i>Clone M-T701</i>	CD3 <i>Clone SK7</i>
T CELL ALL	CD4 <i>Clone SK3</i>	CD45 <i>Clone 2D1</i>	CD8 <i>Clone UCT-T4</i>	CD56 <i>Clone N901*</i>	CD34 <i>Clone 8G12</i>	CD2 <i>Clone</i>	CD7 <i>Clone M-T701</i>	CD3 <i>Clone SK7</i>
AML	HLA-DR <i>Clone L243</i>	CD45 <i>Clone 2D1</i>	CD7 <i>Clone 4H9</i>	CD56 <i>Clone N901*</i>	CD34 <i>Clone 8G12</i>	CD117 <i>Clone 104D2*</i>	CD33 <i>Clone P67.6</i>	CD38 <i>Clone HB7</i>
AML	HLA-DR <i>Clone L243</i>	CD45 <i>Clone 2D1</i>	CD16 <i>Clone CLB-Fc-gran/1</i>	CD13 <i>Clone L138</i>	CD34 <i>Clone 8G12</i>	CD117 <i>Clone 104D2*</i>	CD11b <i>Clone D12</i>	CD10 <i>Clone H10A</i>
AML	HLA-DR <i>Clone L243</i>	CD45 <i>Clone 2D1</i>	CD36 <i>Clone CLB-IVC7</i>	CD64 <i>Clone 10.1</i>	CD34 <i>Clone 8G12</i>	CD117 <i>Clone 104D2*</i>	CD300e <i>Clone UP-H2</i>	CD14 <i>Clone MφP9</i>

Flow cytometry-stained panel consisted of 8-colors tubes designed to leukemia diagnostic type (B-cell ALL in tubes 1-2, T-cell ALL in tubes 3-4 an AML in tubes 5,6 and 7). Antibodies and clones are in columns, majority acquired from Beckmann Dickson or Beckman Coulter (*).

Supplementary Table S2: Clinical and biological characteristics of MRD-positive patients										
Patient	Leukemia type	Age	Clinical_situation	pre-HCT MRD	d100MRD	Outcome	LAIP	%MRD	a.GvHD	Status pré-pós HCT
1	AML	51,34	CR1	>0.1%	d100neg	Alive	CD7+CD33+CD13+	0,6300%	no	pos.neg
2	AML	31,49	CR1	>0.01%	d100neg	Death / NRM	CD7+CD33+CD13+	0,0500%	no	pos.neg
3	AML	2,98	CR2/CR3	>0.1%	d100neg	Alive	CD7+CD33+CD13+	2,6000%	grade 1	pos.neg
4	AML	54,53	CR2/CR3	>0.1%	d100pos	Death in relapse	CD7+CD33+CD13+	4,6000%	no	pos.pos
5	AML	37,13	CR1	Undetectable	d100neg	Alive	mono CD56+	0,0000%	no	neg.neg
6	AML	40,67	CR1	>0.1%	d100neg	Death / NRM	CD7+CD33+CD13+	2,9000%	no	pos.neg
7	AML	21,03	CR1	>0.1%	d100neg	Alive	CD34-CD56+	4,6500%	no	pos.pos
8	AML	42,89	CR1	Undetectable	d100neg	Alive	34-DR-	0,0000%	no	neg.neg
9	AML	20,86	CR1	Undetectable	d100neg	Alive	34-DR-	0,0000%	no	neg.neg
10	AML	19,21	CR2/CR3	>0.01%		Death / NRM	34-DR-	0,0400%	no	
11	AML	20,72	CR1	>0.1%	d100neg	Death in relapse	34-DR-	1,2500%	no	pos.neg
12	AML	45,46	CR2/CR3	>0.1%		Death / NRM	34-DR-	4,5000%	grade 1	
13	AML	34,9	CR1	Undetectable	d100pos	Death in relapse	34-38+DR+	0,0000%	no	neg.pos
14	AML	43,58	CR2/CR3	>0.1%	d100pos	Death in relapse	34-DR-	2,7000%	no	pos.pos
15	AML	29,08	CR1	>0.1%	d100neg	Death / NRM	CD34+CD38-/+	0,9500%	no	pos.pos
16	AML	62,1	CR1	Undetectable	d100neg	Alive	34-DR-	0,0000%	grade 1	neg.neg
17	AML	60,5	CR1	>0.1%	d100neg	Alive	CD34+CD38-/+	3,3000%	grade 1	pos.neg

18	AML	23,54	CR1	>0.1%	d100neg	Alive	34-DR- CD34+CD19+CD33+	0,5000%	no	pos.neg
19	AML	43,4	CR1	>0.1%	d100neg	Alive	CD34+CD19+CD33+	3,3000%	grade 2.3	pos.neg
20	AML	39,4	CR1	>0.1%	d100pos	Death in relapse	CD34-HLA-DR-	0,6000%	no	pos.pos
21	AML	52,5	CR1	>0.1%	d100neg	Alive	mono CD56+	0,7000%	grade 2.3	pos.neg
22	AML	53,23	CR1	Undetectable	d100neg	Alive	CD34-HLA-DR+	0,0000%	no	neg.neg
23	AML	47,38	CR2/CR3	Undetectable	d100pos	Death in relapse	34-38+DR+	0,0000%	no	neg.pos
24	AML	42,38	CR2/CR3	Undetectable	d100pos	Death in relapse	34-38+DR+	0,0000%	grade 1	neg.pos
25	AML	49,32	CR2/CR3	>0.1%	d100neg	Alive	CD7+CD33+CD13+	0,7000%	no	pos.pos
26	AML	50,04	CR1	Undetectable	d100neg	Alive	CD7+CD33+CD13+	0,0000%	no	neg.neg
27	AML	54,92	CR1	Undetectable	d100neg	Alive	CD34+CD38-/+	0,0000%	no	neg.neg
28	AML	27,05	CR2/CR3	Undetectable	d100neg	Alive	mono CD56+	0,0000%	grade 1	neg.neg
29	AML	19,33	CR1	Undetectable	d100neg	Alive	CD19+CD56+CD33+	0,0000%	no	neg.neg
30	AML	52,42	CR1	Undetectable	d100neg	Alive	CD19+CD56+CD33+	0,0000%	no	neg.neg
31	AML	44,94	CR1	Undetectable	d100neg	Alive	mono CD56+	0,0000%	no	neg.neg
32	AML	49,49	CR1	Undetectable	d100neg	Alive	CD34-/CD33+	0,0000%	no	neg.neg
33	AML	43,36	CR1	>0.1%	d100neg	Death in relapse	CD7+CD33+CD13+	2,1000%	no	pos.neg
34	AML	33,6	CR2/CR3	>0.1%	d100pos	Death in relapse	mono CD56+	0,1500%	grade 2.3	pos.pos
35	AML	44,26	CR2/CR3	>0.1%	d100pos	Death in relapse	34-DR-	2,9000%	no	pos.pos
36	AML	1,5	CR1	>0.1%	d100neg	Alive	CD7+CD33+CD13+	0,2000%	grade 1	pos.neg
37	AML	22,79	CR2/CR3	>0.1%		Death / NRM	CD34-CD56+	0,1200%	no	

38	AML	7,21	CR2/CR3	>0.1%	d100pos	Death in relapse	34-DR-	3,7000%	no	pos.pos
39	BCP-ALL	45,77	CR1	Undetectable	d100neg	Alive	CD10dCD38-CD34+	0,0000%	no	neg.neg
40	BCP-ALL	42,06	CR1	Undetectable	d100neg	Alive	CD10dCD38-CD34+	0,0000%	no	neg.neg
41	BCP-ALL	42,6	CR1	Undetectable	d100neg	Alive	CD10-CD20-CD66+CD304+	0,0000%	no	neg.neg
42	BCP-ALL	5,98	CR1	Undetectable	d100neg	Alive	CD10+CD34+CD66cCD123++	0,0000%	no	neg.neg
43	BCP-ALL	5,91	CR2/CR3	Undetectable	d100neg	Alive	CD10++CD34++CD38-	0,0000%	grade 1	neg.neg
44	BCP-ALL	7,79	CR2/CR3	Undetectable	d100neg	Alive	CD10+CD34+CD66cCD123++	0,0000%	no	neg.neg
45	BCP-ALL	17,39	CR1	Undetectable	d100neg	Alive		0,0000%	grade 1	neg.neg
46	BCP-ALL	57,99	CR1	Undetectable		Death / NRM	CD10++CD34++CD38-	0,0000%	grade 1	
47	BCP-ALL	25,83	CR2/CR3	Undetectable	d100neg	Alive	CD10dCD38-CD34+	0,0000%	no	neg.neg
48	BCP-ALL	43,0	CR1	Undetectable	d100neg	Death / NRM		0,0000%	grade 1	neg.neg
49	BCP-ALL	26,64	CR2/CR3	>0.01%	d100neg	Alive	CD10+CD34+CD66cCD123++	3,7000%	no	pos.neg
50	BCP-ALL	48,46	CR2/CR3	>0.01%		Death / NRM	CD10-CD20-CD66+CD304+	0,4200%	grade 1	
51	BCP-ALL	22,53	CR1	Undetectable	d100neg	Alive	CD10++CD34++CD38-	0,0000%	no	neg.neg
52	BCP-ALL	16,8	CR1	Undetectable	d100neg	Alive	CD10dCD38-CD34+	0,0000%	grade 2.3	neg.neg
53	BCP-ALL	22,74	CR1	Undetectable	d100neg	Alive	CD10++CD34++CD38-	0,0000%	no	neg.neg
54	BCP-ALL	4,08	CR1	Undetectable	d100neg	Alive	CD10++CD34++CD38-	0,0000%	no	neg.neg
55	BCP-ALL	21,04	CR1	Undetectable	d100neg	Alive	CD10++CD34++CD38-	0,0000%	no	neg.neg
56	BCP-ALL	55,94	CR1	Undetectable	d100neg	Alive	CD10++CD34++CD38-	0,0000%	no	neg.neg
57	BCP-ALL	62,54	CR1	>0.01%	d100neg	Alive	CD10+CD34+CD66cCD123++	0,0100%	no	pos.neg

58	BCP-ALL	8,66	CR2/CR3	Undetectable	d100neg	Alive	CD10++CD34++CD38-	0,0000%	no	neg.neg
59	BCP-ALL	32,9	CR1	<0.01%	d100neg	Alive	CD10+CD34+CD66cCD123++	0,0027%	no	pos.neg
60	BCP-ALL	4,55	CR1	>0.01%	d100neg	Alive	CD10+CD34+CD66cCD123++	0,5940%	no	pos.neg
61	BCP-ALL	32,35	CR1	<0.01%	d100neg	Alive	CD10+CD34+CD66cCD123++	0,0100%	no	pos.neg
62	BCP-ALL	56,84	CR1	<0.01%		Death / NRM	CD10-CD20-CD66+CD304+	0,0024%	grade 1	
63	BCP-ALL	43,08	CR1	Undetectable		Death / NRM	CD10++CD34++CD38-	0,0000%	no	
64	BCP-ALL	30,81	CR2/CR3	>0.01%		Death / NRM	CD10+CD34+CD73/304+	0,5600%	grade 1	
65	BCP-ALL	61,25	CR2/CR3	>0.01%		Death / NRM	CD10+CD34+CD66cCD123++	1,0500%	grade 1	
66	BCP-ALL	50,22	CR1	Undetectable	d100neg	Alive		0,0000%	no	neg.neg
67	BCP-ALL	44,88	CR2/CR3	<0.01%		Death / NRM	CD10+CD34+CD73/304+	0,0090%	grade 1	
68	T-ALL	35,73	CR1	Undetectable	d100neg	Alive	CD10+CD34+CD66cCD123++	0,0000%	no	neg.neg
69	T-ALL	23,04	CR2/CR3	>0.01%	d100neg	Alive	CD3-CD7+CD99+	0,0200%	no	pos.neg
70	T-ALL	46,1	CR1	Undetectable	d100neg	Alive	CD3-CD7+CD99+	0,0000%	no	neg.neg
71	T-ALL	24,2	CR1	Undetectable	d100neg	Alive	CD3-CD7+TCR $\gamma\delta$	0,0000%	no	neg.neg
72	T-ALL	10,06	CR2/CR3	>0.01%	d100neg	Death / NRM	CD3-CD7+CD99+	0,0200%	grade 1	pos.neg
73	T-ALL	18,8	CR1	Undetectable		Death / NRM	CD3-CD7+CD99+	0,0000%	grade 2.3	
74	T-ALL	35,32	CR1	Undetectable	d100neg	Alive	CD3-CD7+CD99+	0,0000%	no	neg.neg
75	T-ALL	50,59	CR1	Undetectable	d100neg	Alive	CD3-CD7+CD99+	0,0000%	no	neg.neg
76	T-ALL	34,95	CR1	Undetectable	d100neg	Death / NRM	CD10+CD34+CD73/304+	0,0000%	no	
77	T-ALL	27,17	CR1	Undetectable	d100neg	Alive	CD3-CD7+CD99+	0,0000%	no	neg.neg

Supplementary Table S3: Univariate Analysis

OVERALL SURVIVAL (OS)					COMPETITIVE RISK RELAPSE				
Factor	Group	n	2-year OS	p.value	Factor	Group	n	incidence	p.value
MRD_preHCT	MRDneg	42	0.879 (0.733-0.948)	0.0001	MRD_preHCT	MRDneg	42	0.026 (0.002-0.118)	0.0498
	MRDpos	35	0.540 (0.362-0.688)			MRDpos	35	0.175 (0.069-0.321)	
Clinical_situation	CR1	53	0.807 (0.671-0.891)	0.0009	Clinical_situation	CR1	53	0.082 (0.026-0.181)	0.0249
	CR2/CD3	24	0.538 (0.323-0.712)			CR2/CD3	24	0.128 (0.030-0.300)	
Donnor	Haplo	13	0.769 (0.442-0.919)	0.89	Donnor	Haplo	12	0.083 (0.004-0.326)	0.455
	MSD	40	0.767 (0.599-0.872)			MSD	38	0.118 (0.036-0.253)	
	UD	33	0.693 (0.503-0.822)			UD	27	0.074 (0.012-0.215)	
TBI	noTBI	48	0.767 (0.618-0.864)	0.34	TBI	noTBI	41	0.177 (0.077-0.312)	0.001
	TBI	38	0.705 (0.530-0.825)			TBI	36	0.000 (0.000-0.000)	
EVENT FREE SURVIVAL (EFS)					COMPETITIVE RISK NRM				
Factor	Group	n	2-year DFS	p.value	Factor	Group	n	incidence	p.value
MRD_preHCT	MRDneg	42	0.853 (0.701-0.931)	0.0004	MRD_preHCT	MRDneg	42	0.121 (0.044-0.241)	0.0197
	MRDpos	35	0.511 (0.336-0.662)			MRDpos	35	0.314 (0.169-0.471)	
Clinical_situation	CR1	53	0.764 (0.622-0.859)	0.0012	Clinical_situation	CR1	53	0.154 (0.071-0.265)	0.0808
	CR2/CD3	24	0.538 (0.323-0.712)			CR2/CD3	24	0.333 (0.155-0.523)	
Donnor	Haplo	13	0.769 (0.442-0.919)	0.851	Donnor	Haplo	12	0.167 (0.023-0.425)	0.47
	MSD	40	0.709 (0.534-0.828)			MSD	38	0.161 (0.064-0.296)	
	UD	33	0.636 (0.449-0.775)			UD	27	0.296 (0.138-0.474)	
TBI	noTBI	48	0.682 (0.529-0.795)	0.305	TBI	noTBI	41	0.146 (0.059-0.272)	0.28
	TBI	38	0.707 (0.533-0.826)			TBI	36	0.282 (0.145-0.437)	

Supplementary Table S4: Contingency table				
MRD pre-HCT versus relapse				
Pre-HCT MRD status (n=77)	Relapsed patients (n=9)	Non-relapsed (n=57)	Sensitivity 73%	
Positive MRD (n=42)	Group A=8	Group D=34	Specificity 48,4%	
Negative MRD (n=35)	Group B=3	Group C=32	PPV 19,4%, NPV 91,4%	
MRD detectable at d100 and relapses				
MRD status (alive 66)	Relapsed patients (n=9)	Non-relapsed (n=57)	Sensitivity 78%	
d100 positive MRD (n=7)	Group A=7	Group D=0	Specificity 100%	
d100 negative MRD (n=59)	Group B=2	Group C=57	PPV 100%, NPV 97%	
MRD pre-HCT versus positivity at d100				
Pre-HCT MRD status (n=66)	Any positive pos (n=11)	No positive pos (n=55)	Sensitivity 73%	
Positive MRD (n=27)	Group A=8	Group D=19	Specificity 65%	
Negative MRD (n=39)	Group B=3	Group C=36	PPV 29%, NPV 92%	
MRD detectable at d100 and relapse				
Clinical sensitivity	group A/group A+ group B	0,78	0,78	
Clinical specificity	group C/group C+ group D	1	1	
Positive predictive value	group A/group A+ group D	1	1	
Negative predictive value	group C/group C+ group B	0,96	0,96	
Diagnostic concordance	group A+C/A+B+C+D	0,97	0,97	

Article

Comprehensive Analysis of High-Sensitive Flow Cytometry and Molecular Mensurable Residual Disease in Philadelphia Chromosome-Positive Acute Leukemia

Ana Paula de Azambuja ¹, Ana Lucia Vieira Mion ¹, Yara Carolina Schluga ¹, Miriam Perlingeiro Beltrame ¹, Alexandra Cristina Senegaglia ^{1,*}, Vaneuza Araujo Moreira Funke ¹, Carmem Bonfim ^{1,2} and Ricardo Pasquini ¹

¹ Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 80060-900, Brazil; ana.azambuja@hsc.ufpr.br (A.P.d.A.)

² Duke Children's Hospital, Durham, NC 27710, USA

* Correspondence: alexandra.senegaglia@hsc.ufpr.br; Tel.: +55-(41)-3360-7998



Academic Editors: Claudio Ortolani, José-Enrique O'Connor and Monda Latifi

Received: 23 January 2025

Revised: 21 February 2025

Accepted: 24 February 2025

Published: 27 February 2025

Citation: de Azambuja, A.P.; Mion, A.L.V.; Schluga, Y.C.; Beltrame, M.P.; Senegaglia, A.C.; Funke, V.A.M.; Bonfim, C.; Pasquini, R. Comprehensive Analysis of High-Sensitive Flow Cytometry and Molecular Mensurable Residual Disease in Philadelphia Chromosome-Positive Acute Leukemia. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26*, 2116. <https://doi.org/10.3390/ijms26052116>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Monitoring measurable residual disease (MRD) is critical for the management of B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL). While a quantitative assessment of BCR::ABL1 transcripts is standard for Philadelphia chromosome-positive cases (Ph+ ALL), a multi-parameter flow cytometry (FCM) is commonly used for MRD detection in other genetic subtypes. A total of 106 B-ALL patients underwent genetic and phenotypic analyses. Among them, 27 patients (20 adults and 7 children) harbored the *t*(9;22)(q34.1;q11.2) translocation and/or the BCR::ABL1 rearrangement. A high correlation between the BCR::ABL1 transcript levels (PCR-MRD) and a standardized FCM-based method for MRD detection (FCM-MRD) was observed ($r = 0.7801$, $p < 0.001$), with a concordance rate of 88% ($\kappa = 0.761$). The FCM detected MRD in 82.9% of the samples with transcript levels of $> 0.01\%$. The CD34+CD38−/dim blast pattern was significantly more frequent in Ph+ ALL (77.7%), compared to other B-ALL cases (20.2%, $p < 0.0001$). Additionally, Ph+ ALL exhibited a higher expression of CD66c+/CD73+ (94.0% vs. 56.9%), CD66c+/CD304+ (58.8% vs. 6.9%), and CD73+/CD304+ (75.5% vs. 15.5%) than the other B-ALL subtypes ($p < 0.001$). In conclusion, this high-sensitivity FCM-MRD demonstrated comparable performance to the PCR-MRD, serving as a complementary tool for MRD assessment in Ph+ ALL. Moreover, a distinct leukemia-associated immunophenotype was identified, highlighting potential biomarkers for MRD monitoring.

Keywords: acute lymphoblastic leukemia; Philadelphia chromosome-positive acute leukemia; measurable residual disease; flow cytometry; chronic myeloid leukemia blast phase; leukemia associated-immunophenotype

1. Introduction

The recurrent chromosomal and molecular abnormalities that characterize acute lymphoblastic leukemia (ALL) subtypes are of great value for diagnosis, risk stratification, disease monitoring, and treatment selection [1,2]. Among these, the BCR::ABL1-positive B-ALL, here called Philadelphia chromosome-positive acute leukemia (Ph+ ALL), occurs in 2–5% of pediatric and 15–25% of adult ALL cases [3]. This genetic abnormality is pivotal in determining the prognostic stratification and guiding the therapeutic decisions in acute leukemia. The incorporation of an intensive chemotherapy combined with tyrosine kinase inhibitors (TKIs) has transformed the treatment landscape for Ph+ ALL, with 94–100%

Comprehensive Analysis of High-Sensitive Flow Cytometry and Molecular Mensurable Residual Disease in Philadelphia Chromosome-Positive Acute Leukemia

Abstract: Monitoring measurable residual disease (MRD) is critical for the management of B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL). While a quantitative assessment of BCR::ABL1 transcripts is standard for Philadelphia chromosome-positive cases (Ph+ ALL), a multiparameter flow cytometry (FCM) is commonly used for MRD detection in other genetic subtypes. A total of 106 B-ALL patients underwent genetic and phenotypic analyses. Among them, 27 patients (20 adults and 7 children) harbored the *t(9;22)(q34.1;q11.2)* translocation and/or the BCR::ABL1 rearrangement. A high correlation between the BCR::ABL1 transcript levels (PCR-MRD) and a standardized FCM-based method for MRD detection (FCM-MRD) was observed ($r = 0.7801$, $p < 0.001$), with a concordance rate of 88% ($\kappa = 0.761$). The FCM detected MRD in 82.9% of the samples with transcript levels of $> 0.01\%$. The CD34+CD38–/dim blast pattern was significantly more frequent in Ph+ ALL (77.7%), compared to other B-ALL cases (20.2%, $p < 0.0001$). Additionally, Ph+ ALL exhibited a higher expression of CD66c+/CD73+ (94.0% vs. 56.9%), CD66c+/CD304+ (58.8% vs. 6.9%), and CD73+/CD304+ (75.5% vs. 15.5%) than the other B-ALL subtypes ($p < 0.001$). In conclusion, this high-sensitivity FCM-MRD demonstrated comparable performance to the PCR-MRD, serving as a complementary tool for MRD assessment in Ph+ ALL. Moreover, a distinct leukemia-associated immunophenotype was identified, highlighting potential biomarkers for MRD monitoring.

Keywords: acute lymphoblastic leukemia; Philadelphia chromosome-positive acute leukemia; measurable residual disease; flow cytometry; chronic myeloid leukemia blast phase; leukemia associated-immunophenotype.

1. Introduction

The recurrent chromosomal and molecular abnormalities that characterize acute lymphoblastic leukemia (ALL) subtypes are of great value for diagnosis, risk stratification, disease monitoring, and treatment selection [1,2]. Among these, the *BCR::ABL1*-positive B-ALL, here called Philadelphia chromosome-positive acute leukemia (Ph⁺ ALL), occurs in 2–5% of pediatric and 15–25% of adult ALL cases [3]. This genetic abnormality is pivotal in determining the prognostic stratification and guiding the therapeutic decisions in acute leukemia. The incorporation of intensive chemotherapy combined with tyrosine kinase inhibitors (TKIs) has transformed the treatment landscape for Ph⁺ ALL, with 94–100% of patients achieving complete hematological remission with minimal induction-related mortality [3,4].

Philadelphia chromosome-positive diseases demonstrate significant variability in immunophenotype, genetic, and molecular features [5]. The distinction between “de novo” Ph⁺ ALL and chronic myeloid leukemia presenting as lymphoid blast phase (CML-BP) remains a clinical challenge, particularly in patients without a prior diagnosis of CML [5,6]. The isoform of the *BCR::ABL1* fusion transcript appears to reflect the distinct biological origins and clinical implications of these conditions [7–9] since the resulting oncoproteins (p190, p210, or p230) differ significantly in their characteristics, kinase activity, and the signaling pathways they activate [10–12]. However, these entities cannot be clearly distinguished by the immunophenotype or the differences in the fusion protein. Otherwise, the underlying difference reflects the target cell for the transformation event, either a multipotent or a later progenitor serving as the target [13].

In recent years, the assessment of measurable residual disease, formerly minimal residual disease (MRD), has become a cornerstone in managing acute leukemia, including the Philadelphia chromosome-positive B-ALL.

MRD monitoring provides a more refined evaluation of the treatment response [14,15], which is particularly critical in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation (SCT), where the absence of a detectable disease before the transplant is strongly associated with improved long-term outcomes [16,17].

Immunoglobulin rearrangement testing (Ig/TCR) is the standard method for the MRD assessment in ALL, but the technical expertise and instrumentation required limit its application to specialized centers [18]. MRD is typically monitored in patients with Ph⁺ ALL using a *BCR::ABL1* transcript quantification through a specific real-time quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR) assay [19,20]. PCR-MRD provides a

specific and highly sensitive blast detection, allowing for a timely intervention and adjustment of therapy [20]. However, recent studies have reported that BCR::ABL1 rearrangements can persist in non-lymphoblastic cells in patients with negative Ig/TCR results. These discrepancies have been attributed to multilineage involvement and clonal hematopoiesis [12,13].

Although a quantitative measurement of the fusion gene effectively tracks transcript levels in Ph⁺ B-ALL cases, in patients with other genetic subtypes, multiparameter flow cytometry (FCM) profiling has been used for MRD detection with a good performance [21,22]. In fact, FCM-MRD detection represents a technically challenging and rapidly advancing application of flow cytometry. The earlier studies, which primarily employed three- or four-color techniques, faced significant challenges in distinguishing the leukemic cells from normal B-lineage subpopulations in bone marrow regeneration, both during and after treatment [22,23]. Furthermore, the accuracy and reliability of conventional FCM are influenced by several critical factors, including the number of acquired cellular events and parameters analyzed, as well as the specificity of studied antigens [24,25].

Over the past decade, technological advancements have significantly improved FCM-MRD detection, with six- to ten-color FCM methods demonstrating substantial enhancements in sensitivity and precision [25]. The validation of a flow cytometry for high-sensitive testing has expanded its usefulness by incorporating new markers and sample preparation techniques that allow for acquiring more cellular events. In this way, several groups have been introducing 8 to 12-color FCM-MRD methods in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (B-ALL), the sensitivity of which could be compared with current molecular techniques [24,26–28].

In 2017, the EuroFlow™ group proposed a sensitive and reliable flow cytometry method for assessing MRD, where the leukocyte markers, corresponding antibodies and fluorochromes were strategically selected using a multidimensional principal component analysis (PCA) based on their contribution to distinguishing between abnormal and regenerating precursor B-cells [24]. The inclusion of markers associated with genetic abnormalities, such as CD66c, CD73 and CD304, has significantly enhanced the detection of residual blasts [29]. By combining these markers in a single fluorescence channel, this protocol identified abnormal expression patterns in around 70% of B-ALL patients [24]. Additionally, a total lysis protocol, combined with standardized instrument settings, ensures a consistently high analytical sensitivity [30].

obThis approach is particularly relevant in our setting, where implementing MRD assessments using Ig/TCR qPCR or next-generation sequencing (NGS) presents significant challenges. While FCM-MRD requires specialized equipment and trained personnel, it is often more accessible in resource-limited settings, compared to NGS or Ig/TCR qPCR, due to its lower cost and faster turnaround time. Additionally, we comprehensively analyzed the clinical, phenotypic, and genetic-molecular characteristics of a unique cohort of Philadelphia chromosome-positive acute leukemia patients, offering valuable insights into this high-risk group.

2. Results

2.1 Patient Cohort

A retrospective cohort of 125 acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients were followed between 2017 and 2024 in the Flow Cytometry Laboratory of Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil.

This study excluded cases of T-cell ALL (n = 18) and mixed-phenotype acute leukemia (MPAL) My/T (n = 1), so 106 B-ALL patients were available for genetic and phenotypic analysis. Among them, 27 patients (20 adults and 7 children) with the t(9;22)(q34.1;q11.2) translocation and/or BCR::ABL1 rearrangement were selected for a detailed analysis of transcript subtypes and clinical, morphological, and phenotypic characteristics. The control group included 79 B-ALL patients (27 adults and 52 children) with availability for a high-sensitivity MRD analysis. This group comprised 24 cases with diploid karyotypes and 36 with cytogenetic abnormalities: 12 hyperdiploidy karyotypes, 5 *ETV6::RUNX1* cases, 2 *E2A::PBX* cases, and 10 with *KMT2A* rearrangements (*KMT2Ar*). Seven patients exhibited varied abnormalities, including two cases with del16, isochromosomes i(9) and i(7), one add7, one t(8;12) and one del(14). Additionally, nineteen patients lacked metaphases or molecular results.

Figure 1 shows the percentage distribution of genetic alterations and differences between children and adult cohorts.

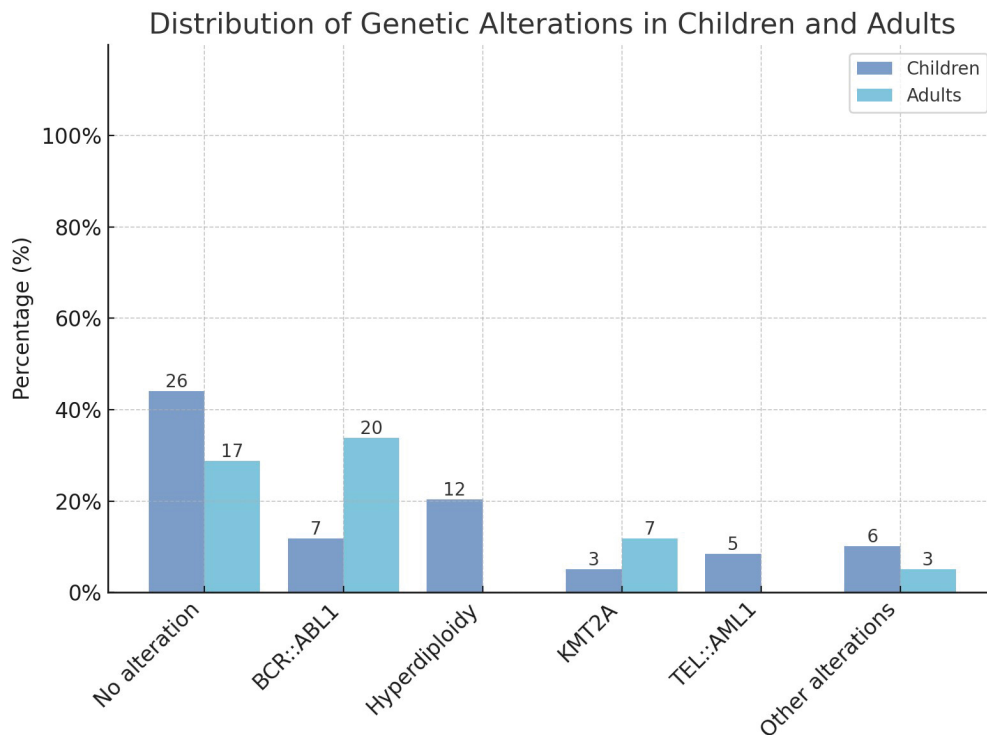


Figure 1. Distribution of available recurrent genetic alterations between children and adult cohorts.

2.1 Cytogenetic and Molecular Biology

A cytogenetic analysis and a molecular screening at diagnosis revealed nine patients with additional cytogenetic abnormalities, including complex/variant Philadelphia chromosomes, and five cases with cryptic Philadelphia chromosomes harboring BCR::ABL1 rearrangements. The B/My MPAL patient had a hypodiploid karyotype with a rare (7;14) translocation (see Supplementary Table S1).

Regarding BCR::ABL1 fusion transcript types, 17 patients (63.0%) expressed only the p190 (e1a2) fusion and were classified as having “de novo” Ph+ ALL, while 10 patients (37.0%) expressed the p210 fusion and were categorized as having secondary lymphoid blast transformations of chronic myeloid leukemia (CML-BP).

Among CML-BP patients, three (10.0%) expressed only the p210 transcript: two with e13a2 (b2a2) and one with e14a2 (b3a2). Seven cases (23.3%) co-expressed p190 and p210 transcripts, including two with e14a2 (b3a2) and e1a2, three with e13a2 (b2a2) and e1a2, and two with three transcripts: e13a2 (b2a2), e14a2 (b3a2), and e1a2.

Supplementary Table S1 summarizes the genetic and molecular characteristics of the 27 Philadelphia chromosome-positive patients.

2.3 Clinical Characteristics and Outcomes

The *BCR::ABL1*-positive B-ALL group included 7 children and 20 adults, with a median age of 31.3 years (range 3.8–75.6). Nine patients presented leukocytosis and neutrophilia on the initial complete blood count, suggesting a multilineage involvement, although only two had documented chronic-phase CML with prior tyrosine kinase inhibitor treatment. The extramedullary disease was observed in four patients: two with central nervous system involvement, one with breast infiltration, and one with liver infiltration (detailed in Supplementary Table S2).

Per referral centre protocols, patients received induction polychemotherapy combined with TKIs (imatinib, nilotinib, or dasatinib). Allogeneic stem cell transplantation (SCT) was performed for eligible patients in the first complete remission [31].

After induction chemotherapy, only two patients achieved negative FCM-MRD and PCR-MRD status. Fifteen had positive MRD levels ($>0.01\%$), while eight had active diseases (MRD $> 5\%$). Two patients exhibited primary refractory disease and did not receive further therapy. Early mortality occurred in five older adults (18.5%) due to induction failure or refractory disease. Three pediatric and two young adult (AYA) patients achieved durable remission with TKIs and high-dose chemotherapy without SCT. Six out of nineteen patients undergoing SCT experienced relapses, with four requiring a second SCT. Four relapsed patients and six with transplant-related toxicity died. Nine patients remained in extended follow-up post-SCT.

The mean age at diagnosis was comparable between the *BCR::ABL1*-positive B-ALL subgroups: 29.3 years for p190 Ph⁺ ALL patients and 36.3 years for p210 CML-BP patients. Initial blood counts revealed significantly lower mean leukocyte levels in the Ph⁺ ALL group compared to the CML-BP group (17,358/ μ L vs. 129,711/ μ L, $p = 0.01$). No significant differences were found between the groups regarding precursor left shift, blastic predominance, hemoglobin levels, or platelet counts. The overall survival (OS) was 62.4% for the “de novo” Ph⁺ ALL group and 56.2% for the CML-BP group (HR 0.701, 95% CI 0.2098–2.226, $p = 0.53$). Event-free survival and relapse rates were comparable between “de novo” Ph⁺ ALL and CML-BP groups. As no other notable differences were identified, the patients were analyzed collectively as a single Philadelphia chromosome-positive B-ALL group (Ph⁺ ALL).

2.4 Immunophenotypic Analysis

In this series, Ph+ ALL patients exhibited a typical common pre-B cell immunophenotype (CD19 and CD10 positive, cytoplasmic IgM-negative), like other B-ALL cases. However, four cases displayed weak or heterogeneous CD10 expression (see Supplementary Table S3).

A CD34 strong expression was observed in nearly all Ph+ ALL cases (96.3%), compared to 48.8% of other B-ALL patients. Conversely, CD38 expression was negative or dim in most Ph+ patients (22.2% CD38 positive), versus the 62% in other B-ALL cases. As a result, the CD34++CD38-/dim blast pattern was significantly more frequent in Ph+ ALL patients (77.7%) than in other B-ALL cases (20.2%, $p < 0.0001$).

Figure 2 presents a heatmap illustrating the correlation between genetic alterations and maturation phenotypes, showing the strong association of the CD34++CD38-/dim expression pattern with *BCR::ABL1*-positive B-ALL cases.

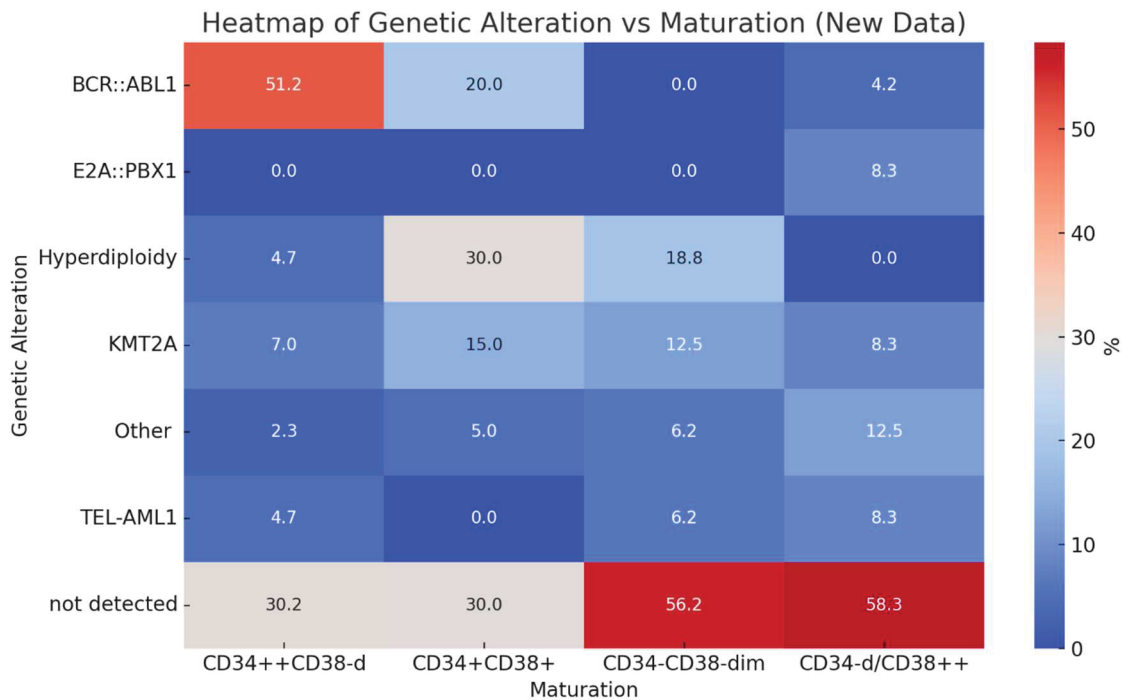


Figure 2. Heatmap illustrating the correlation between genetic alterations and maturation phenotypes, emphasizing the significant association of expression pattern CD34++CD38-/dim with *BCR::ABL1*-positive B-ALL cases and CD34+CD38+ with hyperdiploidy.

Although *BCR::ABL1*-positive B-ALL did not correlate with any specific marker ($p = 0.34$), all cases in this series exhibited at least one leukemia-associated immunophenotype (LAIP) suitable for MRD monitoring via flow cytometry (Supplementary Table S2).

CD66c expression was evaluated in 20 patients (74%), with 14 (70%) showing CD66c positivity and 6 (30%) exhibiting negative expression. Markers CD73 and CD304 were assessed in 17 patients (63%). In this group, eight cases (47%) were double-positive for CD66c+/CD73+ with CD304 negative, and the other eight cases were triple-positive for CD66c+/CD73+/CD304+. Additionally, nine cases (53%) were double-positive for CD66c+/CD304+, with CD73– expression. CD123 was tested in 26 cases (93%) and was positive or dimly positive in 19 cases (73%).

Notably, the six patients with negative CD66c expression demonstrated strong positivity for CD73 and/or CD304, ensuring all Philadelphia chromosome-positive cases expressed antigens suitable for flow cytometric MRD monitoring.

Among the cases tested for the three markers (CD66c, CD304, and CD73), eight of the seventeen Ph+ cases (47.0%) and twenty-five of the fifty-eight non-Ph+ cases (43.1%) were positive for all three markers, with no significant difference between the groups. Figure 3 illustrates a representative case with CD73+ and CD34+CD38–/dim lymphoblasts.

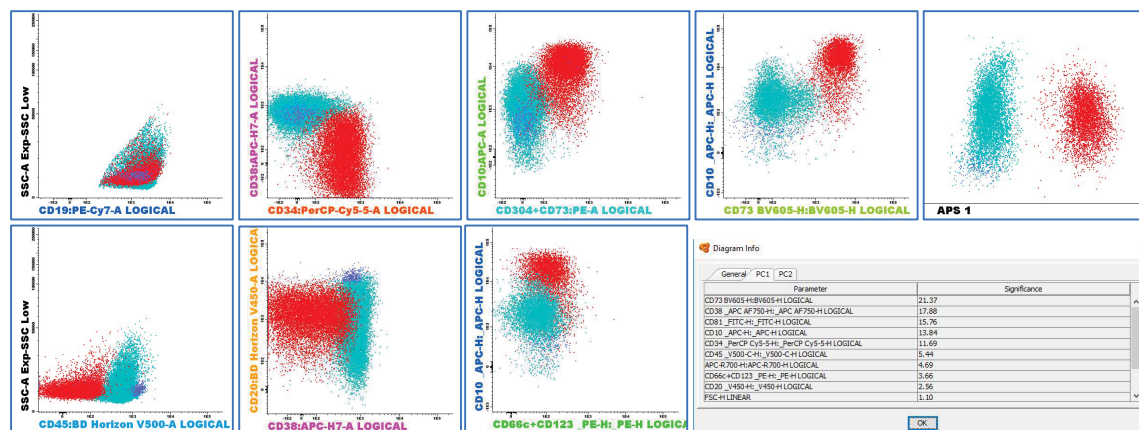


Figure 3. Representative MRD flow cytometry plots and APS1 view showing lymphoblasts (red) exhibiting the phenotypes CD10++, CD20 negative, CD34+, CD38–/dim, CD66c/CD123 negative and CD73/CD304++. Positivity of CD73 was confirmed on BV605 fluorochrome. APS view shows clear distinction between blasts (red), mature B-cells (blue), and B-cell precursors (green).

Table 1 shows the immunophenotypic differences observed between Philadelphia chromosome-positive cases and other genetic subtypes of B-ALL.

Table 1. Immunophenotypic differences between Ph+ ALL cases and other B-ALL.

LAIP Expression	Ph+ ALL (n = 17)	Other B-ALL (n = 58)	p-Value *
CD66c+	14/20 tested ** (70.0%)	49 (84.5%)	0.755
CD73+	14 (82.3%)	47 (81.0%)	1.000
CD304+	15 (88.2%)	38 (65.5%)	0.026
CD73+/CD304+	13 (76.5%)	9 (15.5%)	<0.0001
CD66+/CD304+	10 (58.8%)	4 (6.90%)	<0.0001
CD66+/CD73+/CD304+	8 (47.0%)	25 (43.1%)	0.660
	Ph+ ALL (n = 27)	Other B-ALL (n = 79)	p-Value *
CD123+	19 (70.4%)	39 (49.4%)	0.074
CD10+	23 (85.2%)	62 (78.5%)	0.581
CD34+	26 (96.3%)	37 (46.8%)	<0.0001
CD38+	6 (22.2%)	46 (58.2%)	0.0016
CD34+/CD38 neg/dim	21 (77.8%)	21 (26.6%)	<0.0001

Legend: LAIP, leukemia-associated immunophenotype; Dim, low expression; Neg, negative expression; Ph+, Philadelphia chromosome; * Fisher exact test considering tested cases for each marker n(%). ** The marker CD66c was tested in 20 cases from the Ph+ ALL group.

2.5. Comparison between Ph+ and other B-ALL cases

In the B-ALL control cohort, normal karyotypes were positively associated with CD66c+ expression ($p = 0.006$), while other genetic abnormalities showed no significant association with specific LAIPs ($p = 0.076$).

Among the cases with confirmed genetic abnormalities, *TEL::AML1* was significantly associated with CD73+ and CD73+/CD304+ expression ($p = 0.002$); *E2A::PBX1* was linked to CD73+ expression ($p < 0.001$); and hyperdiploidy karyotypes correlated with positivity for two or three markers (CD66c+CD73+CD304+, $p = 0.05$). In contrast, *KMT2A* rearrangements were associated with the loss of markers, including CD10 (Pro-B ALL phenotype), and were negatively associated with CD66c, CD73, and CD304 positivity. Double positivity for CD66c+/CD73+ (56.9% vs. 94.0%), CD66c+/CD304+ (6.9% vs. 58.8%), and CD73+/CD304+ (15.5% vs. 75.5%) was significantly lower in non-Ph+ B-ALL patients compared to *BCR::ABL1*-positive B-ALL patients ($p < 0.001$). Figure 4 illustrates the correlation between genetic alterations and leukemia-associated immunophenotypes using a heatmap.

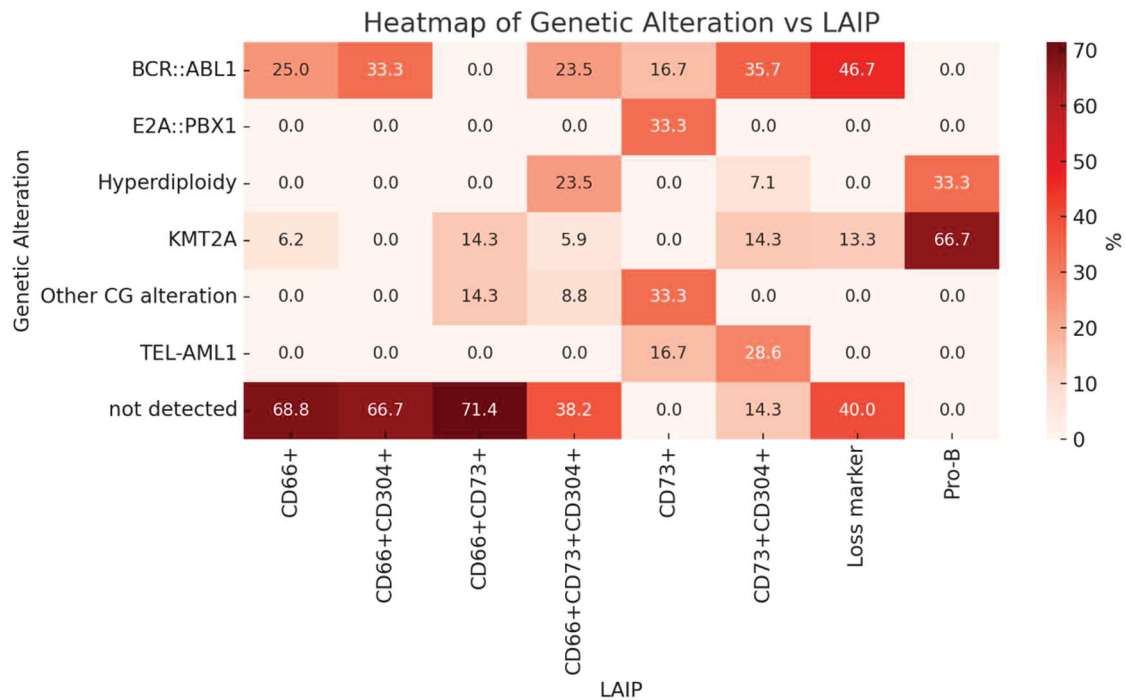


Figure 4. Heatmap illustrating the correlation between genetic alterations and LAIP phenotypes, showing possible association between CD66c+ and CD304+ with *BCR::ABL1* cases.

2.6 Correlation Between FCM-MRD and PCR-MRD

A total of 19 diagnostic and 90 follow-up samples were analysed simultaneously using RQ-PCR and flow cytometry (see Supplementary Table S4). Of the 109 samples studied, RQ-PCR and FCM provided concordant qualitative results in 91 cases, resulting in concordant results in 88% of cases ($\text{Kappa} = 0.761$, $p < 0.001$).

The quantitative comparison revealed a significant correlation between the percentage of blasts detected by FCM-MRD and the number of transcripts (*BCR::ABL1/ABL* ratio) measured by RQ-PCR[31]. The Pearson correlation ($r = 0.7801$; 95% CI: 0.69–0.84, $p < 0.001$) and the Spearman correlation ($r = 0.8618$; 95% CI: 0.802–0.9045, $p < 0.001$) were both statistically significant, as shown in Figure 5.

Flow cytometry exhibited a sensitivity of 78.9% (95% CI: 66.1–88.6%) and specificity of 98.8% (95% CI: 89.7–99.9%) for blast detection compared to RQ-PCR transcript analysis. Likewise, the positive predictive value was 97.8% (95% CI: 88.5–99.9%), and the negative predictive value reached 80.9% (95% CI: 69.1–89.7%).

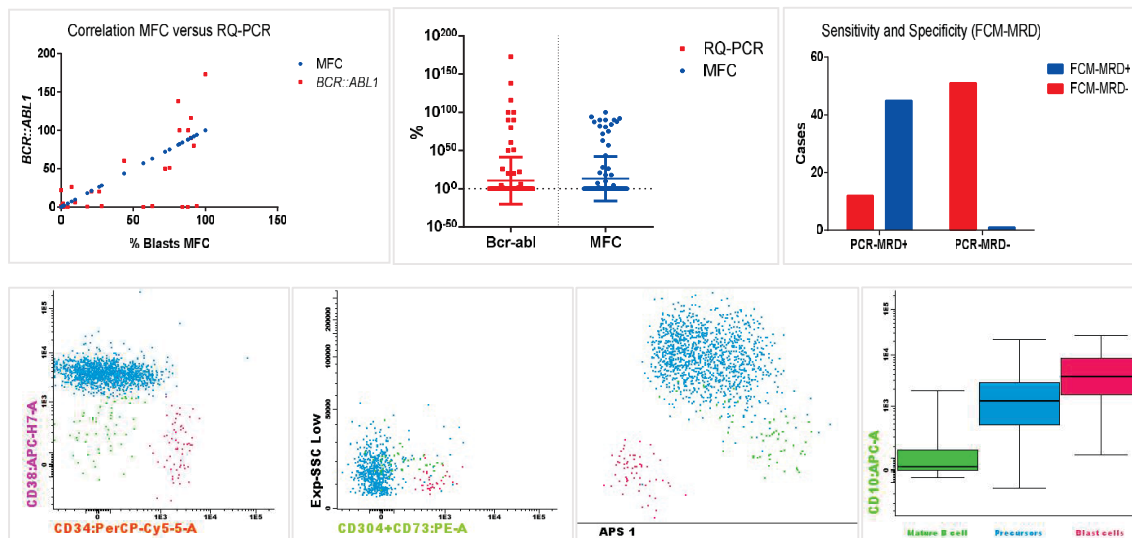


Figure 5. Scatter plots showing a correlation between the percentage of blasts detected by multiparameter flow cytometry (MFC) and BCR::ABL1 transcript. Histogram showing the number of discrepant cases between PCR-MRD and FCM-MRD. Flow cytometry plots and APS view from reanalysis of discrepant FCM-MRD-/PCR-MRD+ case, showing 70 cellular events CD34+, CD38dim, CD304/CD73+, CD10++, considered as blasts (pink); mature (green) and precursor B-cells (blue) are well distinguished by the APS1 view.

Among the 52 PCR-MRD negative samples, 51 (98.1%) were also FCM-MRD negative. For MRD-positive samples, FCM showed a detection rate of 78.9% (45 out of 57) compared to RQ-PCR. In the cases with >0.01% positivity PCR-MRD, FCM reliably detected ALL cells in 82.9% (39 out of 47) of the samples.

Considering the discordant results, 12 were PCR-MRD positive but FCM-MRD negative, and in one sample MRD was detected by a flow cytometry but not by RQ-PCR. The samples tested positive when using RQ-PCR, and the transcript level was detected at very low expression levels, with MRD indices ranging from 0.007 to 0.105 (median 0.085).

2.7 Discrepant cases

After reviewing the discrepant cases, three samples with no detectable blasts in the highly sensitive flow cytometry test (10,000,000 events acquired), RQ-PCR detected the e14a2 transcript, but it was not quantified, at levels below the limit of detection (LoD < 0.0001%). In one of these samples, the flow cytometry revision detected 0.0007% of blasts (70 cellular events in 10,000,000) that were not accounted for in the initial FCM-MRD report (see Figure 5).

The other eight discordant samples had insufficient cellular events in FCM to meet the LoD and LLoQ thresholds for detecting MRD below 0.01%. Eight of nine samples were collected during the first year of the project, before the full introduction of bulk lysis and

the standardised FCM-MRD protocol. The discrepant sample, in which FCM found 0.07% leukemic blasts and PCR-MRD was negative, was subsequently FCM-MRD negative in the two sequential reports. The discrepant cases are detailed in Table 2.

Table 2. Revision of discrepant cases between FCM-MRD and PCR-MRD.

LOD FCM-MRD.	FCM-MRD ¹	<i>BCR::ABL1/ABL</i> Ratio
<0.01%	Not detected	0.0070%
<0.01%	Not detected	0.0120%
<0.01%	Not detected	0.0400%
<0.01%	Not detected	0.0260%
<0.01%	Not detected	0.0320%
<0.01%	Not detected	0.0520%
<0.01%	Not detected	0.0520%
<0.01%	Not detected	0.1050%
<0.0002%	Not detected ²	Detected above 0.0001% ²
<0.0002%	Not detected ²	Detected above 0.0001% ²
<0.0002%	Not detected ³	Detected above 0.0001% ³
<0.001%	0.07% ⁴	Not detected

Legend: LoD Lower limit of detection. ¹—Samples with low number of acquired events in FCM-MRD; ²—Samples with a transcript e14a2 detected but not quantified above LoD (<0.0001%); ³—Sample with e14a2 detected but not quantified and e1a2 not detected; ⁴—False positive FCM-MRD.

Most cases with the p190 (e1a2) transcript achieved PCR-MRD negativity following treatment or bone marrow transplantation. In patients with multiple *BCR::ABL1* transcript types, the p190 (e1a2) transcript is typically cleared before the p210 isoform post-treatment. Among the six cases analyzed, p190 was cleared first in five, while in one case, p210 disappeared before p190. Supplementary Figure S1 shows box plots revealing the distribution of each MRD time point for groups Ph+ and Ph negative ALL. The plots show overlaps and differences in their spreads and central tendencies, but there is no significance between the groups (d15 $p = 0.273$; d33 = 0.099; d90 = 0.483). Supplementary Tables S5 and S6 show two examples of the dynamics of MRD disappearance in both transplant and non-transplant settings.

DISCUSSION

Measurable residual disease in Philadelphia chromosome-positive disease, achieved with the *BCR::ABL1* quantitative method, is the standard of care in CML and Ph+ acute leukemias [3,15]. However, assessing the MRD using a multiparametric flow cytometry has been the recommended practice in patients with other genetic subtypes [24,26,28]. The choice of methods usually depends on the expertise, resources, and design of the clinical trial established in each setting.

This study observed a good correlation and concordant qualitative results between blast percentages detected by highly sensitive flow cytometry and *BCR::ABL1* transcript levels in 109 concomitant samples. These findings are consistent with previous studies that emphasize the potential complementary roles of molecular and flow-based assays [16,21]. Flow cytometry showed high sensitivity and specificity, detecting MRD in 82.9% of cases with >0.01% residual disease by RQ-PCR, confirming its utility for clinical monitoring. Notably, discordances primarily involved cases with very low transcript levels (<0.001%) or insufficient cellular events for FCM thresholds.

A detailed review of FCM data revealed missed blasts in one sample, emphasizing the importance of meticulous analysis to ensure accurate results. Furthermore, the FCM-MRD samples with low sensitivity were from the project's first year, before the full introduction of bulk analysis and the complete protocol in our centre. This underscores the importance of optimizing sample quality, rigorous quality control, and even the level of training experts in flow cytometry analysis [32].

Our findings agree with recent studies showing strong concordance between flow cytometry and molecular MRD detection in Ph+ and other B-ALL [23]. Singh et al. compared a single 10-color tube with the measurement of MRD by Ig/TCR qPCR in Philadelphia-negative disease and *BCR::ABL1* (fusion gene) RQ-PCR in Ph+ disease and reported discordance in 13 samples, including one case where the flow cytometry detected an impending relapse, missed by molecular methods. Among the samples in which MRD was not detected by flow cytometry, there was only one case in which *BCR::ABL1* was detected at 0.065%. Similarly to our results, the *BCR::ABL1* level was <0.01% of the nine discordant samples, demonstrating an adequate sensitivity and a good correlation between the techniques [23]. These results support the idea that FCM-MRD and PCR-MRD produce similar results and may be useful in monitoring disease treatment. Moreover, combining two independent methods, PCR-MRD and FCM-MRD, minimizes

the risk of false-negative results, and a positive result from either assay usually indicates MRD [21–23].

The outcomes among the Philadelphia chromosome-positive acute leukemia patients are quite heterogeneous, and accurately differentiating “de novo” Ph+ ALL from CML-BP remains a significant challenge [5,7–9]. The long isoform of the BCR::ABL1 (p210) fusion, predominantly associated with the CML-like background, appears to originate from hematopoietic stem cells, and typically results from e13a2 (b2a2) or e14a2 (b3a2) fusion transcripts. Conversely, the short isoform (p190), arising from a minor BCR rearrangement producing the e1a2 fusion transcript, is associated with Ph+ ALL and likely originates in a B-cell progenitor [5,6,13]. These distinctions may reflect potential differences in the biological origin of the diseases and significantly impact clinical management [11,13,33].

In our study, 63% of patients with acute-phase disease expressed the p190 transcript (typical Ph+ ALL), while 37.0% expressed the p210 transcript, including seven cases with co-expression of two or three transcripts. Despite the limited number of patients, our results align with a pivotal German study, which reported that 77% of Ph+ ALL cases expressed the p190 transcript, 20% the p210 transcript, and 3% co-expressed both [6]. Furthermore, the p210 expression was associated with high-risk features, such as older age, elevated white blood cell counts [7,9], and persistence of the transcript despite the absence of detectable lymphoblasts, compared to those with the p190 transcript [7–9]. Notably, we identified seven cases with multiple transcript types and the p190 (e1a2) isoform generally disappeared earlier than the p210 isoform following treatment. These findings highlight the dynamic nature of MRD kinetics and underscore the importance of combining PCR-MRD and FCM-MRD for comprehensive monitoring and management of Ph+ disease.

The standard treatment for Ph+ ALL combines chemotherapy with TKI therapy, achieving remission rates of 90–100%. This is typically followed by allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, which offers curative potential in approximately two-thirds of cases [1]. Achieving complete molecular remission before transplant is critical for long-term outcomes, underscoring the importance of MRD monitoring to guide therapy and detect potential resistance or relapse [16,17].

The introduction of immunotherapy, including anti-CD19 and anti-CD22 therapies, has further emphasized the need to differentiate typical Ph+ ALL from CML-like cases to optimize treatment strategies in future protocols [33,34]. Recent studies suggest that

while the SCT remains the preferred approach for CML-like ALL, treatment of typical Ph+ ALL is evolving, with a growing recommendation for TKI-based regimens combined with risk-adapted chemotherapy or immunotherapy [11].

Detectable MRD after induction therapy in B-ALL is commonly associated with cytogenetic aberrations linked to poor outcomes, such as *BCR::ABL1* and *KMT2A* rearrangements [2]. Furthermore, the phenotypic portrait of B-ALL is marked by great complexity and heterogeneity of profiles, reflected by the expression of LAIP markers [29]. The widespread use of flow cytometry to investigate MRD in acute leukemia has motivated researchers to identify membrane markers with a specificity that can be associated with the most common cytogenetic alterations [35]. For example, CD66c {carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule} and CD123 {alpha-chain of the interleukin-3 receptor} expression has been correlated, although not specifically, with *BCR::ABL1*-positive B-ALL and hyperdiploid cases [36,37]. Similarly, CD73 {ecto-5'-nucleotidase} and CD304/neuropilin-1 are potentially associated with *ETV6-RUNX1* rearrangements [38–40], and inversely associated with *TCF3-PBX1* fusion gene, whereas the antibody 7.1 {chondroitin sulfate proteoglycan, NG2} is a well-established marker correlated to 11q23/*KMT2A* rearrangements [35].

By applying the MRD search panel, suggested by EuroFlow™, with four differential markers and the new analysis tools (APS view and reference image), we identified at least one LAIP in each Ph+ ALL patient. This has greatly improved the discrimination of hematogones from pathological B cells in these cases. Our results were similar to recent studies where CD304 positivity was associated with the presence of the *BCR::ABL1* gene [39,40]. This study suggests that the positivity for CD73, CD304, and CD66c antigens may serve as an independent and reliable marker for MRD detection in Ph+ ALL [36,39,40]. This combination of markers has proven to be a valuable tool for distinguishing leukemic cells from normal hematopoietic cells.

The different-from-normal (Dif-N) strategy distinguishes normal B-cell precursors (hematogones/BCP) from B lymphoblasts based on maturation profiles. This can be challenging because normal BCP shares many immunophenotypic characteristics with B lymphoblasts. A perfect knowledge of normal immunophenotypic patterns associated with normal B-cell maturation and normal marrow regeneration is required [41].

An interesting study of deep molecular profiling revealed three transcriptomic subtypes of *BCR::ABL1* lymphoblastic leukemia, each representing a maturation arrest at a stage of B-cell progenitor differentiation. An earlier arrest was associated with lineage

promiscuity, treatment refractoriness, and poor patient outcomes. Later arrests were associated with lineage fidelity, durable leukemia remissions, and improved patient outcomes. Each maturation arrest was marked by specific genomic events controlling different B-cell development transition points [13].

We found no significant differences in maturation pattern, with a similar frequency of CD10+ common type ALL in Ph+ cases compared to those in other genetic subtype groups. However, a notable observation was the significantly lower expression of CD38 and higher expression of CD34 at the surface of B lymphoblasts with t(9;22) in comparison with B lymphoblasts without other recurrent cytogenetic alteration.

Although we found no association between the BCR::ABL1 fusion type with clinical or phenotypic factors, the high prevalence of the CD34+CD38-/dim pattern in CD19+CD10+ lymphoblasts was surprising. This pattern is rare in bone marrow, particularly when these cells co-express specific immunophenotypes associated with leukemia, such as CD73, CD304 and/or CD66c [24,35].

This finding parallels the CD34+CD38-/dim leukemic stem cell (LSC) phenotype observed in myeloproliferative neoplasms, since these LSCs are believed to initiate leukemia and play a pivotal role in disease relapses [42]. Notably, in chronic myeloid leukemia, a unique surface expression profile has been identified in LSCs, characterized by consistent expression of markers such as CD25+, CD26+, CD56+, and IL-1RAP+ [43]. In contrast, while the CD34+CD38-/dim phenotype with aberrant marker expression (e.g., CD45RA, CD123, or CD26) is well-documented in CML and acute myeloid leukemia, a definitive LSC phenotype for lymphoid leukemia remains undefined. This underscores the need for further research to establish specific phenotypic markers for LSCs in lymphoid leukemia.

KEY POINTS

This study highlights the complexities of Philadelphia chromosome-positive acute leukemia and emphasizes the critical importance of integrating comprehensive molecular and phenotypic evaluations to improve prognostic accuracy and refine treatment strategies. Despite certain limitations, including its retrospective design, small sample size, and lack of standardization in chemotherapy protocol monitoring, this study demonstrates the feasibility of using this highly sensitive assay E as an alternative method for MRD detection in both Ph+ and other B-ALL cases.

The consistent expression of key immunophenotypic markers may indicate fundamental biological differences in leukemic cells, suggesting phenotypic immaturity and a potential link to the aggressiveness and clinical behavior of Ph+ ALL. These findings support the continued integration of FCM-MRD into routine clinical practice, particularly in resource-limited settings where access to advanced molecular diagnostics remains limited [32,47].

4. Materials and Methods

4.1. Patient cohort

A retrospective cohort of 125 acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients were followed between 2017 and 2024 in the Flow Cytometry Laboratory of Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil.

106 B-ALL patients, at 25.5% Ph+ ALL (20 adults and 7 children), were analyzed for genetic subtypes, clinical features, and phenotypic markers. Samples performed simultaneously with FCM-MRD and quantitative PCR-MRD had concordance rates and discrepancies assessed.

The control cohort consisted of 79 B-cell ALL patients, 52 children and 27 adults, with normal karyotypes or genetic abnormalities other than Ph+. Cases of T-cell ALL and MPAL My/T were excluded from this study.

4.2. Diagnostic Procedures

Standard diagnostics were performed according to local practice [3]. Philadelphia chromosome-positive acute leukemia was defined by the presence of t(9;22)(q34;q11) translocation and the resulting BCR::ABL1 rearrangement [44], and clinical/outcome data were collected from the hospital information system.

Patients expressing the p190 (e1a2) transcript were classified as “de novo” Ph+ ALL. Patients expressing the p210 transcript were classified as having secondary lymphoid blast transformations of chronic myeloid leukemia (CML-BP). The acute phase was considered if more than 20% of lymphoblasts were in the bone marrow in morphology. Using standard techniques, a conventional chromosomal analysis was performed on G-banded metaphase cells, prepared from unstimulated bone marrow aspirate cultures. Twenty metaphases were analyzed, and the results were reported using the International System for Human Cytogenetic Nomenclature.

An immunophenotypic analysis defined subgroups of B-cell ALL as follows: pro-B ALL, TdT+ and CD19+, with negative CD10, cytoplasmatic (cy) IgM and surface (S) IgM; B-common ALL, TdT, CD19 and CD10 positive, with cyIgM and Sig negative; and pre-B common ALL, TdT, CD19 and CD10 positive, and negative cyIgM- and SigM. A mixed phenotypic acute leukemia (MPAL) was defined as the presence of both myeloperoxidase and strong CD79a/CD19 (B/My) or cytoplasmatic myeloperoxidase and CD3 (T/My) in the same pathological cell.

Complete remission was characterized by morphological remission, with fewer than 5% blasts in the bone marrow and no evidence of extramedullary disease. Central nervous system relapses were diagnosed when leukemic cells were detected in the cerebrospinal fluid.

4.3. Multiparameter Flow Cytometry

Bone marrow samples were studied during the acute phase diagnosis, and MRD analysis was performed at follow-up, according to the clinical and chemotherapy protocol used. To obtain more cells, bone marrow samples were processed following a bulk lysis protocol [30]. In brief, 2000 µL of whole bone marrow specimens were lysed with an ammonium chloride-based lysis solution and stained with monoclonal antibodies before a red cell lysis using FACS Lyse (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). In diagnostic samples, 100,000 to 200,000 events per tube were collected, and up to 5,000,000 events per tube were used for MRD analyses. Samples were considered MRD-positive if at least 20 (limit of detection—LoD), and at least 50 clustered events were recorded (lower limit of quantitation—LLoQ). The LoD and LLoQ were determined for each case by considering the total cells analyzed in each tube.

Diagnostic antibody panels proposed by the EuroFlow™ group were used in diagnostic samples [46]. The B-ALL MRD panel comprised two 8-color tubes with seven backbone markers: CD81 FITC (clone JS81), CD34 PercpCy5.5 (clone 8G12), CD19 Pcy7 (clone J3-119), CD10 APC (clone MEM-78), CD20 V450 (clone L27), CD38 APC-H7 (clone HB7) and CD45 V500c (clone 2D1). To better discriminate the lymphoblasts from normal BCP, the antibodies CD66c PE (clone B62) and CD123 PE (clone 9F5) were put in the first tube, and CD73 PE (clone AD-2) and CD304 PE (clone Neuropilin-1) in the second tube¹⁴. Personalized panels followed patients with MPAL and T-cell precursor leukemia.

FACSCanto II™ (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) equipped with BD FACSDiva v9.0 Software (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) was used, and instrument settings were generated according to EuroFlow™ guidelines [46]. The FCS files from the sample databases were manually analyzed using Infinicyt™ software version 2.0 (Cytognos SL, Salamanca, Spain), and all cases were critically reviewed.

4.4. Immunophenotypic Analysis

FCM-MRD tubes were analyzed using merge and automatic population separation (APS) strategies (software Infinicyt™, Cytognos). First, B cells were selected based on CD19 expression, excluding duplicates and debris identified by their forward (FSC) and side (SSC) light scattering characteristics. The B cell gate was selected in the side scatter versus CD19 and included B lymphoblasts, hematogones, or normal B lymphocytes.

A Boolean gating approach was applied to exclude plasma and stromal cells, using CD81 versus CD38 and CD81 versus CD73 dot plots, respectively. Subsequently, intersections between CD10 versus CD20, CD20 versus CD38, and CD34 versus CD38 were analyzed to delineate the maturation stages of B lymphoid precursors, categorizing them as pre-B-I, pre-B-II, and mature B cells.

Normal leukocytes were considered internal control populations to determine the threshold of the positivity of each marker (each normal sub-population of leukocytes was selected depending on previously described profiles in the literature). A positive expression of each evaluated marker by populations of interest was defined when at least 20% of the population expressed the marker, with help from APS and reference image Infinicyt™ tools. This strategy is exemplified in Figure 6. The aberrant B lymphoblasts were identified by comparing their immunophenotypic profiles to normal maturation patterns (different from normal strategy-DifN) and leukemia-associated immunophenotypes (LAIPs), focusing on phenotypic aberrations or abnormal expression levels of B-lineage markers. The presence of aberrant expression of the four PE-linked markers (CD123, CD66c, CD73, and CD304) in the B-cell population was analyzed using the statistical strategy PCA incorporated in Infinicyt software™ (APS view) to optimize the detection of abnormal lymphoblasts. The abnormal blast population was quantified as a percentage of total nucleated blood cells.

The presence of any level of abnormal cells in FCM-MRD constitutes the FCM-MRD-positive group (MRD+), whereas patients with less than 10^{-4} (<0.01%) blast cells were considered the FCM-MRD-negative (MRD-) group. Patients with more than 5% of blasts

were considered to have active disease/relapse disease. The abnormal blast population was quantified as a percentage of total nucleated blood cells.

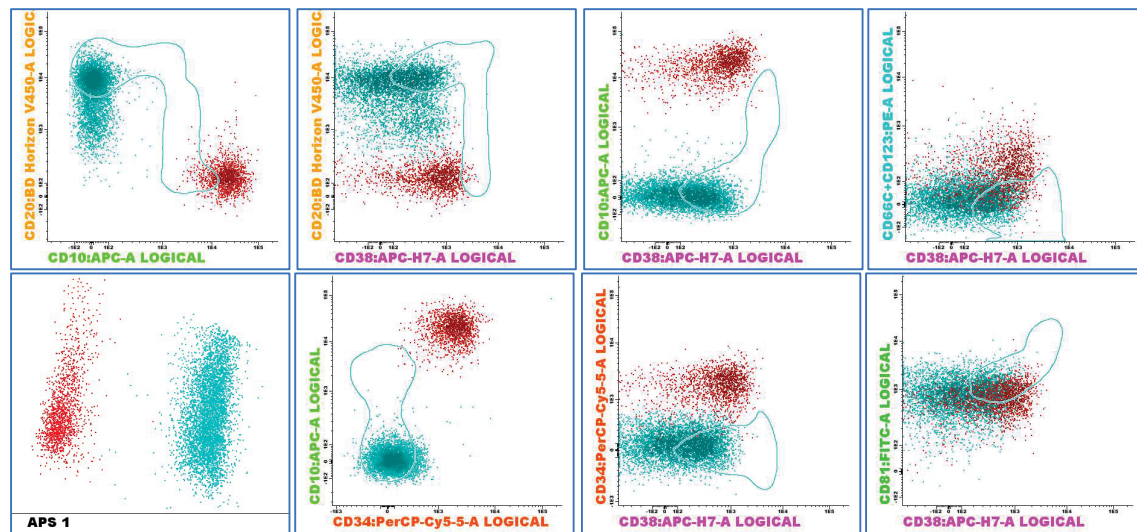


Figure 6. An illustrative example of a positive MRD case where maturation markers and the APS strategy successfully differentiate blasts (red) from residual normal mature B-lymphocytes in the sample (green). The figure shows blasts (red) exhibiting the phenotypes CD10⁺⁺⁺, CD20⁻, CD34⁺, CD38⁻, CD81⁺, and weak CD45⁺. PCR-MRD analysis showed e13a2 and e1a2.

4.5. Molecular Biology

Levels of *BCR-ABL* fusion transcripts were quantified in a TaqManTM-based, real-time competitive PCR, using *ABL1* as a control gene [31,44,46]. This RT-PCR assay detected p190 (e1a2) and p210 (e13a2 and e14a2) transcripts simultaneously. The standard curve was based on serial dilutions of the plasmid linearized with the *BCR-ABL1* insert (pNC190/G) and (pNC210/G)) [31]. The p210 transcripts were quantified in duplicate by Q-PCR (ABI PRISM 7500, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) using the TaqManTM hydrolysis probe system G) [47]. The results were reported as a percentage (%) of *BCR::ABL1* and *ABL1* copy numbers ($BCR::ABL1/ABL1 \times 100$). The *BCR::ABL1/ABL1* ratio was multiplied by the conversion factor (CF) to present the values on an international scale (IS). The Molecular Biology Laboratory's conversion factor is 0.51, which was determined by comparing the results of *BCR::ABL1* transcript quantification in 30 samples, analyzed at CHC-UFPR and the reference laboratory at the Institute of Medical and Veterinary Science, Adelaide, Australia. The CF value was confirmed using a second set of 30 samples from the same reference laboratory. Samples were considered acceptable for analysis when *ABL1* copies exceeded 32,000. A nested PCR was

performed on all samples that did not have transcripts detected by competitive PCR to confirm the results.

4.6. Comparison of Monitoring Techniques

The samples analyzed in parallel using quantitative RQ-PCR (*BCR::ABL*/ABL ratio) and blast count found in flow cytometry were compared to validate the sensitivity for MRD monitoring. Cases were considered discordant if the flow cytometry did not identify any residual population of lymphoblasts, and if the *BCR::ABL1* transcripts were detectable in at least two separate samples or vice versa. Discordances were recorded if the level of lymphoblasts identified in the flow was more than ten times lower than that predicted by the *BCR::ABL1* transcript level, based on the reduction in baseline levels. Given the sensitivity of the RQ-PCR and FCM monitoring techniques, transcript levels more than 3 logs below the baseline level (approximately 1 in 1000 Ph⁺ cells or less) were not considered discordances [16,21].

4.7. Statistical Analysis

Descriptive statistics were utilised to summarise baseline patient characteristics. For group comparisons, *t*-tests were applied to normally distributed data, while non-parametric tests, such as the Mann–Whitney U test and Fisher’s exact test, were employed for non-normally distributed data or categorical variables.

A quantitative comparison using general associations of FCM and PCR data as continuous variables was evaluated using bivariate non-parametric Pearson and Spearman correlation statistics. A qualitative analysis of concordance between the FCM and PCR results and a binary classification test was performed. These tests evaluated the performance of FCM relative to PCR as the reference method, providing measures such as sensitivity (percentage of concordant positive cases relative to the total PCR-MRD positive cases), specificity (percentage of concordant negative cases relative to the total PCR-MRD negative cases), and overall concordance (percentage of all concordant cases). The coefficient of determination and the Cohen’s Kappa (K) test were used to evaluate the data between groups. Two-tailed *p* values < 0.05 were considered statistically significant. Statistical comparisons were performed using GraphPad Prism version 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4.8. Ethics Committee

This study was approved by the CHC-UFPR Medical Ethics Committee under protocol number CAAE 84969718.0.000.0096 and conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki. Medical records were accessed in the hospital's database system. The patient or legal guardian consented to the use of biological material and to the access to medical records.

5. Conclusions

High-sensitivity FCM-MRD demonstrated performance comparable to PCR-MRD, highlighting its utility as a reliable and complementary tool for MRD assessment in B-cell acute leukemia. Additionally, the immunophenotypic strategy employed showed high specificity, with lymphoblastic cells consistently expressing established LAIP markers and a distinctive CD34⁺⁺CD38[−]/dim expression profile. This pattern may reflect a characteristic abnormal phenotype within this high-risk subgroup, providing valuable insights into the biology and clinical behavior of Philadelphia chromosome-positive B-cell acute leukemia. Further research, involving larger cohorts and standardized protocols, is necessary to validate and expand upon these results.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1.

Author Contributions: Conceptualization, A.P.d.A. and M.P.B.; methodology, A.P.d.A., A.L.M. and Y.C.S.; formal data analysis, A.P.d.A.; data curation, A.P.d.A.; writing—original draft preparation, C.B., A.C.S. and V.A.M.F.; review and editing, R.P.; project administration, A.P.d.A. and M.P.B.; funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by an educational grant from Programa Nacional de Apoio à Atenção Oncológica, grant number NUP 25000.055356/2015-04, **PORTARIA N° 898, DE 23 DE OUTUBRO DE 2015**, and supported by Associação dos Amigos do Hospital de Clínicas (AAHC). No publication charges were applied.

Institutional Review Board Statement: This study was approved by the Institutional Review Board Statement under the number CAAE. 84969718.0.000.0096, and performed following the Declaration of Helsinki.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We especially thank Mariester Malvezzi for starting this work in 2015. We also thank administrative support from AAHC and the technical support from the laboratory team.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

ALL	Acute lymphoblastic leukemia
AYA	Adolescents and young adults
APS	Automatic population separation
B-ALL	B-lymphoblastic leukemia
CHC-UFPR	Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
CML	Chronic myeloid leukemia
CML-BP	Chronic myeloid leukemia Blast Phase
DifN	Different from normal
FCM	Flow cytometry
FCM-MRD	Flow cytometry measurable residual disease
ICC	International Consensus Classification
Ig/TCR	Immunoglobulin/TCR rearrangement
IHC	Immunohistochemistry
LAIP	Leukemia-associated immunophenotype
LCS	Leukemic Stem Cell
MRD	Masurable residual disease
MPAL	Mixed phenotype acute leukemia
NGS	Next-generation sequencing
PCR-MRD	Polymerase chain reaction measurable residual disease
Ph+ ALL	Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia
RQ-PCR	real-time quantitative polymerase chain reaction
SCT	Stem cell transplantation
T-ALL	T-lymphoblastic leukemia
TKIs	Tyrosine kinase inhibitors

References

1. Foà, R.; Chiaretti, S. Philadelphia Chromosome–Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2022**, *386*, 2399–2411. <https://doi.org/10.1056/nejmra2113347>.
2. Patel, S.; Mason, C.C.; Glenn, M.J.; Paxton, C.N.; South, S.T.; Cessna, M.H.; Asch, J.; Cobain, E.F.; Bixby, D.L.; Smith, L.B.; et al. Genomic analysis of adult B-ALL identifies potential markers of shorter survival. *Leuk. Res.* **2017**, *56*, 44–51. <https://doi.org/10.1016/J.LEUKRES.2017.01.034>.
3. Gökbüget, N.; Boissel, N.; Chiaretti, S.; Dombret, H.; Doubek, M.; Fielding, A.K.; Foà, R.; Giebel, S.; Hoelzer, D.; Hunault, M.; et al. Diagnosis, prognostic factors, and assessment of ALL in adults: 2024 ELN recommendations from a European expert panel. *Blood* **2024**, *143*, 1891–1902. <https://doi.org/10.1182/blood.2023020794>.
4. DThomas, D.A.; Faderl, S.; Cortes, J.; O'Brien, S.; Giles, F.J.; Kornblau, S.M.; Garcia-Manero, G.; Keating, M.J.; Andreeff, M.; Jeha, S.; et al. Treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia with hyper-CVAD and imatinib mesylate. *Blood* **2004**, *103*, 4396–4407. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-08-2958>.
5. Jones, D.; Luthra, R.; Cortes, J.; Thomas, D.; O'Brien, S.; Bueso-Ramos, C.; Hai, S.; Ravandi, F.; de Lima, M.; Kantarjian, H.; et al. BCR-ABL fusion transcript types and levels and their interaction with secondary genetic changes in determining the phenotype of Philadelphia

- chromosome positive leukemias. *Blood* **2008**, *112*, 5190–5192. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-148791>.
6. Gleißner, B.; Gökbüget, N.; Bartram, C.R.; Janssen, B.; Rieder, H.; Janssen, J.W.; Fonatsch, C.; Heyll, A.; Voliotis, D.; Beck, J.; et al. Leading prognostic relevance of the BCR-ABL translocation in adult acute B-lineage lymphoblastic leukemia: A prospective study of the German Multicenter Trial Group and confirmed polymerase chain reaction analysis. *Blood J. Am. Soc. Hematol.* **2002**, *99*, 1536–1543.
 7. Verma, D.; Kantarjian, H.M.; Jones, D.; Luthra, R.; Borthakur, G.; Verstovsek, S.; Rios, M.B.; Cortes, J. Chronic myeloid leukemia (CML) with P190BCR-ABL: Analysis of characteristics, outcomes, and prognostic significance. *Blood* **2009**, *114*, 2232–2235. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-204693>.
 8. Gong, Z.; Medeiros, L.J.; E Cortes, J.; Zheng, L.; Khoury, J.D.; Wang, W.; Tang, G.; Loghavi, S.; Luthra, R.; Yang, W.; et al. Clinical and prognostic significance of e1a2 BCR-ABL1 transcript subtype in chronic myeloid leukemia. *Blood Cancer J.* **2017**, *7*, e583. <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.62>.
 9. Awad, S.A.; Hohtari, H.; Javarappa, K.K.; Brandstoetter, T.; Kim, D.; Potdar, S.; A Heckman, C.; Kytölä, S.; Porkka, K.; Doma, E.; et al. BCR-ABL1 p190 in CML: A Minor Breakpoint with a Major Impact. *Blood* **2019**, *134*, 190. <https://doi.org/10.1182/blood-2019-126584>.
 10. Shi, T.; Xie, M.; Chen, L.; Yuan, W.; Wang, Y.; Huang, X.; Xie, W.; Meng, H.; Lou, Y.; Yu, W.; et al. Distinct outcomes, ABL1 mutation profile, and transcriptome features between p190 and p210 transcripts in adult Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia in the TKI era. *Exp. Hematol. Oncol.* **2022**, *11*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40164-022-00265-2>.
 11. Zuna, J.; Hovorkova, L.; Krotka, J.; Koehrmann, A.; Bardini, M.; Winkowska, L.; Fronkova, E.; Alten, J.; Koehler, R.; Eckert, C.; et al. Minimal residual disease in BCR::ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia: Different significance in typical ALL and in CML-like disease. *Leukemia* **2022**, *36*, 2793–2801. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01668-0>.
 12. Kim, J.C.; Chan-Seng-Yue, M.; Ge, S.; Zeng, A.G.X.; Ng, K.; Gan, O.I.; Garcia-Prat, L.; Flores-Figueroa, E.; Woo, T.; Zhang, A.X.W.; et al. Transcriptomic classes of BCR-ABL1 lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* **2023**, *55*, 1186–1197. <https://doi.org/10.1038/s41588-023-01429-4>.
 13. Hovorkova, L.; Winkowska, L.; Skorepova, J.; Krumbholz, M.; Benesova, A.; Polivkova, V.; Alten, J.; Bardini, M.; Meyer, C.; Kim, R.; et al. Distinct pattern of genomic breakpoints in CML and BCR::ABL1-positive ALL: Analysis of 971 patients. *Mol. Cancer* **2024**, *23*, 138. <https://doi.org/10.1186/s12943-024-02053-4>.
 14. Bruggemann, M.; Raff, T.; Kneba, M. Has MRD monitoring superseded other prognostic factors in adult ALL? *Blood* **2012**, *120*, 4470–4481. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-379040>.
 15. Saliba, A.N.; Foà, R. Minimal residual disease in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia: Maximizing the clinical yield of testing. *Am. J. Hematol.* **2023**, *98*, 1168–1170. <https://doi.org/10.1002/ajh.26993>.
 16. Zhao, X.; Zhao, X.; Chen, H.; Qin, Y.; Xu, L.; Zhang, X.; Liu, K.; Huang, X.; Chang, Y.-J. Comparative Analysis of Flow Cytometry and RQ-PCR for the Detection of Minimal Residual Disease in Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2018**, *24*, 1936–1943. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.03.015>.
 17. Candoni, A.; Rambaldi, A.; Fanin, R.; Velardi, A.; Arcese, W.; Ciceri, F.; Lazzarotto, D.; Lussana, F.; Olivieri, J.; Grillo, G.; et al. Outcome of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell

Transplantation in Adult Patients with Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia in the Era of Tyrosine Kinase Inhibitors: A Registry-Based Study of the Italian Blood and Marrow Transplant. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2019**, *25*, 2388–2397. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2019.07.037>.

18. Darzentas, F.; Szczepanowski, M.; Kotrová, M.; Hartmann, A.; Beder, T.; Gökbüget, N.; Schwartz, S.; Bastian, L.; Baldus, C.D.; Pál, K.; et al. Insights into IGH clonal evolution in BCP-ALL: Frequency, mechanisms, associations, and diagnostic implications. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, 1125017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1125017>.

19. Luthra, R.; Medeiros, L.J. TaqMan reverse transcriptase-polymerase chain reaction coupled with capillary electrophoresis for quantification and identification of bcr-abl transcript type. *Methods Mol. Biol.* **2006**, *335*, 135–145. <https://doi.org/10.1385/1-59745-069-3:135>.

20. Lee, W.I.; Kantarjian, H.; Glassman, A.; Talpaz, M.; Lee, M.S. Quantitative measurement of BCR/abl transcripts using real-time polymerase chain reaction. *Ann. Oncol.* **2002**, *13*, 781–788. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdf156>.

21. Huang, Y.-J.; Coustan-Smith, E.; Kao, H.-W.; Liu, H.-C.; Chen, S.-H.; Hsiao, C.-C.; Yang, C.-P.; Jaing, T.-H.; Yeh, T.-C.; Kuo, M.-C.; et al. Concordance of two approaches in monitoring of minimal residual disease in B-precursor acute lymphoblastic leukemia: Fusion transcripts and leukemia-associated immunophenotypes. *J. Formos. Med. Assoc.* **2017**, *116*, 774–781. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2016.12.002>.

22. Neale, G.A.M.; Coustan-Smith, E.; Stow, P.; Pan, Q.; Chen, X.; Pui, C.-H.; Campana, D. Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **2004**, *18*, 934–938. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403348>.

23. Rocha, J.M.C.; Xavier, S.G.; Souza, M.E.d.L.; Murao, M.; de Oliveira, B.M. Comparison between flow cytometry and standard PCR in the evaluation of MRD in children with acute lymphoblastic leukemia treated with the GBTLI LLA—2009 protocol. *Pediatr. Hematol. Oncol.* **2019**, *36*, 287–301. <https://doi.org/10.1080/08880018.2019.1636168>.

24. Theunissen, P.; Mejstrikova, E.; Sedek, L.; van der Sluijs-Gelling, A.J.; Gaipa, G.; Bartels, M.; da Costa, E.S.; Kotrová, M.; Novakova, M.; Sonneveld, E.; et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **2017**, *129*, 347–357. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-07-726307>.

25. Verbeek, M.W.C.; van der Velden, V.H.J. The Evolving Landscape of Flowcytometric Minimal Residual Disease Monitoring in B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 4881. <https://doi.org/10.3390/ijms25094881>.

26. Singh, J.; Gorniak, M.; Grigoriadis, G.; Westerman, D.; McBean, M.; Venn, N.; Law, T.; Sutton, R.; Morgan, S.; Fleming, S. Correlation between a 10-color flow cytometric measurable residual disease analysis (MRD) and molecular MRD in adult acute lymphoblastic leukemia. *Cytom. Part B Clin. Cytom.* **2022**, *102*, 115–122. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.22043>.

27. Tembhare, P.R.; Pg, P.G.S.; Ghogale, S.; Chatterjee, G.; Patkar, N.V.; Gupta, A.; Shukla, R.; Badrinath, Y.; Deshpande, N.; Narula, G.; et al. A High-Sensitivity 10-Color Flow Cytometric Minimal Residual Disease Assay in B-Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma Can Easily Achieve the Sensitivity of 2-in-10⁶ and Is Superior to Standard Minimal Residual Disease Assay: A Study of 622 Patients. *Cytom. Part B Clin. Cytom.* **2020**, *98*, 57–67. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21831>.

28. Gao, Q.; Liu, Y.; Aypar, U.; Baik, J.; Londono, D.; Sun, X.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Roshal, M. Highly sensitive single tube B-lymphoblastic leukemia/lymphoma minimal/measurable residual disease test robust to surface antigen directed therapy. *Cytom. Part B Clin. Cytom.* **2023**, *104*, 279–293. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.22120>.

29. Sędek, Ł.; Theunissen, P.; da Costa, E.S.; van der Sluijs-Gelling, A.; Mejstrikova, E.; Gaipa, G.; Sonsala, A.; Twardoch, M.; Oliveira, E.; Novakova, M.; et al. 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* **2019**, *475*, 112429. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.03.005>.
30. Euroflow Consortium. EuroFlow Standard Operating Procedure (SOP) for Bulk Lysis for MRD Panels. *Standardized EuroFlow Protocols*. 2018; pp. 1–8. Available online: www.euroflow.org (accessed on 24 November 2024).
31. Cross, N.C.P.; Hughes, T.P.; Feng, L.; O'Shea, P.; Bungey, J.; Marks, D.I.; Ferrant, A.; Martiat, P.; Goldman, J.M. Minimal residual disease after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia in first chronic phase: Correlations with acute graft-versus-host disease and relapse. *Br. J. Haematol.* **1993**, *84*, 67–74. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1993.tb03026.x>.
32. Ikoma-Colturato, M.R.V.; Bertolucci, C.M.; Conti-Spilari, J.E.; Oliveira, E.; Simioni, A.J.; Figueredo-Pontes, L.L.; Furtado, F.M.; Alegretti, A.P.; Azambuja, A.P.; Gevert, F.; et al. Multicentric standardization of minimal/measurable residual disease in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia using next-generation flow cytometry in a low/middle-level income country. *Br. J. Haematol.* **2023**, *200*, 381–384. <https://doi.org/10.1111/bjh.18499>.
33. Gökbüget, N.; Dombret, H.; Giebel, S.; Brüggemann, M.; Doubek, M.; Foa, R.; Hoelzer, D.; Kim, C.; Martinelli, G.; Parovichnikova, E.; et al. Blinatumomab vs historic standard-of-care treatment for minimal residual disease in adults with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Eur. J. Haematol.* **2020**, *104*, 299–309. <https://doi.org/10.1111/ejh.13375>.
34. Jabbour, E.; Kantarjian, H.M.; Aldoss, I.; Montesinos, P.; Leonard, J.T.; Gómez-Almaguer, D.; Baer, M.R.; Gambacorti-Passerini, C.; McCloskey, J.; Minami, Y.; et al. Ponatinib vs Imatinib in Frontline Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **2024**, *331*, 1814–1823. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2024.4783>.
35. Kulis, J.; Sędek, Ł.; Słota, Ł.; Perkowski, B.; Szczepański, T. Commonly Assessed Markers in Childhood BCP-ALL Diagnostic Panels and Their Association with Genetic Aberrations and Outcome Prediction. *Genes* **2022**, *13*, 1374. <https://doi.org/10.3390/genes13081374>.
36. Guillaume, N.; Penther, D.; Vaida, I.; Gruson, B.; Harrivel, V.; Claisse, J.F.; Capiod, J.C.; Lefrere, J.J.; Damaj, G. CD66c expression in B-cell acute lymphoblastic leukemia: Strength and weakness. *Int. J. Lab. Hematol.* **2011**, *33*, 92–96. <https://doi.org/10.1111/j.1751-553X.2010.01254.x>.
37. Djokic, M.; Björklund, E.; Blennow, E.; Mazur, J.; Söderhäll, S.; Porwit, A. Overexpression of CD123 correlates with the hyperdiploid genotype in acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **2009**, *94*, 1016–1019. <https://doi.org/10.3324/haematol.2008.000299>.
38. Wang, W.; Gao, L.; Li, Y.; Li, Z.-L.; Gong, M.; Huang, F.-Z.; Chen, Y.-R.; Zhang, C.-X.; Gao, Y.-Y.; Ma, Y.-G. The application of CD73 in minimal residual disease monitoring using flow cytometry in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Lymphoma* **2016**, *57*, 1174–1181. <https://doi.org/10.3109/10428194.2015.1070153>.
39. Chatterjee, G.; Dudakia, V.; Ghogale, S.; Deshpande, N.; Girase, K.; Chaturvedi, A.; Shetty, D.; Senger, M.; Jain, H.; Bagal, B.; et al. Expression of CD304/neuropilin-1 in adult b-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma and its utility for the measurable residual disease assessment. *Int. J. Lab. Hematol.* **2021**, *43*, 990–999. <https://doi.org/10.1111/ijlh.13456>.
40. Gudapati, P.; Khanka, T.; Chatterjee, G.; Ghogale, S.; Badrinath, Y.; Deshpande, N.; Patil, J.; Narula, G.; Shetty, D.; Banavali, S.; et al. CD304/neuropilin-1 is a very useful and

dependable marker for the measurable residual disease assessment of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Cytom. Part B Clin. Cytom.* **2020**, *98*, 328–335. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21866>.

41. Theunissen, P.M.J.; Branden, A.v.D.; Van Der Sluijs-Gelling, A.; De Haas, V.; Beishuizen, A.; van Dongen, J.J.M.; Van Der Velden, V.H.J. Understanding the reconstitution of the B-cell compartment in bone marrow and blood after treatment for B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Br. J. Haematol.* **2017**, *178*, 267–278. <https://doi.org/10.1111/bjh.14685>.

42. Reuvekamp, T.; Bachas, C.; Cloos, J. Immunophenotypic features of early haematopoietic and leukaemia stem cells. *Int. J. Lab. Hematol.* **2024**, *46*, 795–808. <https://doi.org/10.1111/ijlh.14348>.

43. Sadovnik, I.; Herrmann, H.; Blatt, K.; Eisenwort, G.; Mueller, N.; Stefanzi, G.; Hoermann, G.; Herndlhofer, S.; Bauer, K.; Peter, B.; et al. Evaluation of Cell Surface Markers and Targets in Leukemic Stem Cells (LSC) Reveals Distinct Expression Profiles, Unique Drug Effects, and Specific Checkpoint Regulation in AML LSC and CML LSC. *Blood* **2016**, *128*, 4234. <https://doi.org/10.1182/blood.V128.22.4234.4234>.

44. Silva, W.; Rego, E. How to Manage Philadelphia-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia in Resource-Constrained Settings. *Cancers* **2023**, *15*, 5783. <https://doi.org/10.3390/cancers15245783>.

45. Marin, D.; Kaeda, J.; Szydlo, R.; Saunders, S.; Fleming, A.; Howard, J.; Andreasson, C.; Bua, M.; Olavarria, E.; Rahemtulla, A.; et al. Monitoring patients in complete cytogenetic remission after treatment of CML in chronic phase with imatinib: Patterns of residual leukemia and prognostic factors for cytogenetic relapse. *Leukemia* **2005**, *19*, 507–512. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403664>.

46. van Dongen, J.J.M.; Lhermitte, L.; Böttcher, S.; Almeida, J.; van der Velden, V.H.J.; Flores-Montero, J.; Rawstron, A.; Asnafi, V.; Lécrovisse, Q.; Lucio, P.; et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* **2012**, *26*, 1908–1975. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.120>.

47. Cross, N.; Feng, L.; Chase, A.; Bungey, J.; Hughes, T.; Goldman, J. Competitive Polymerase Chain Reaction to Estimate the Number of BCR-ABL Transcripts in Chronic Myeloid Leukemia Patients After Bone Marrow Transplantation. *Blood* **1993**, *82*, 1929–1936. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V82.6.1929.1929>.

Supplementary Table S1: Patient Genetic-Molecular Characteristics.

Case n.	Classification	Age	Gender	BCR::ALB transcript	Karyotype
1	Ph+ ALL	3,25	M	p190(e1a2)	47~48,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[13]
2	Ph+ ALL	3,80	F	p190(e1a2)	46~49,XX,del(2)(q22),+14,+16,+19,+22,+mar[cp11]/46,XX[15]
3	Ph+ ALL	4,00	M	p190(e1a2)	no metaphases
4	Ph+ ALL	4,80	M	p190(e1a2)	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[4]/46,sl,der(19)t(1;19)
5	Ph+ ALL	20,60	F	p190(e1a2)	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[20]
6	Ph+ ALL	22,70	F	p190(e1a2)	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[18]
7	Ph+ ALL	23,40	M	p190(e1a2)	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[20]
8	Ph+ ALL	26,01	F	p190(e1a2)	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[20]
9	Ph+ MPAL B/My	29,10	F	p190(e1a2)	39~44,X,-X,t(7;14)(p15;q11),t(9;22)(q34;q11.2),+16[20]
10	Ph+ ALL	30,70	F	p190(e1a2)	no metaphases
11	Ph+ ALL	41,40	M	p190(e1a2)	46,XY,der(14)t(8;14)(q11;q32),+mar,inc[3]/46,XY[17]
12	Ph+ ALL	42,90	M	p190(e1a2)	46,XY[20]
13	Ph+ ALL	47,10	F	p190(e1a2)	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[15]
14	Ph+ ALL	49,00	F	p190(e1a2)	46 XX, del(10)(p?12), del 22(q11.2)[8], 46 XX [11]
15	Ph+ ALL	51,60	M	p190(e1a2)	52~56,XY...[6]/46,XY[11]
16	Ph+ ALL	64,20	F	p190(e1a2)	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[17]
17	Ph+ ALL	69,80	M	p190(e1a2)	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[12]
18	CML-BP	4,01	M	p210 - e13a2(b2a2) / p190 (e1a2)	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2),+der(22)t(9;22)[16]/46,XY[4]
19	CML-BP	11,80	F	p210 - e13a2(b2a2) / e14a2(b3a2) / p190 (e1a2)	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[20]
20	CML-BP	14,30	M	p210 - e13a2(b2a2) / p190 (e1a2)	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[19]
21	CML-BP	31,90	F	p210 - e13a2(b2a2) / e14a2(b3a2) / p190 (e1a2)	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[5]/46,XX[5]
22	CML-BP	36,60	M	p210 - e13a2(b2a2) / p190 (e1a2)	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[20]
23	CML-BP	48,50	F	p210 - e14a2(b3a2) / p190 (e1a2)	46,XX[13]
24	CML-BP	52,60	M	p210 - e14a2(b3a2) / p190 (e1a2)	46,XY[20]
25	CML-BP	57,70	F	p210 - e13a2(b2a2)	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[16]
26	CML-BP	63,00	M	p210 - e13a2(b2a2)	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[12]
27	CML-BP	75,60	M	p210 - e14a2(b2a2)	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[20]

Supplementary Table S2: Patient Clinic Characteristics

Case n	Classification2	ALL subtype	Clinic characteristic	Hb (g/L)	WBC ($\times 10^9$ /L)	Platlets ($\times 10^9$ /L)	HSCT	Relapse	Outcome
1	Ph+ ALL	B-Common ALL	D15 positivity (>5%), CNS infiltration	7.10	3.81	26	0	0	0
2	Ph+ ALL	B-Common ALL	Ph+ ALL	6.40	343	578	1	0	0
3	Ph+ ALL	Pro-B ALL	BCP-ALL late relapse	8.50	23.0	46.6	1	1	1
4	Ph+ ALL	B-Common ALL	Ph+ ALL / t(1;19)	9.30	10.6	52	0	0	0
5	Ph+ ALL	B-Common ALL	Extramedullar breast infiltration				1	1	0
6	Ph+ ALL	B-Common ALL	Ph+ ALL				1	0	0
7	Ph+ ALL	B-Common ALL	Ph+ ALL	10.7	97.5	174	1	1	0
8	Ph+ ALL	B-Common ALL	Ph+ ALL	8.00	2.84	322	1	0	0
9	Ph+ MPAL B/My	MPAL B/My	MPAL/Extramedullar liver infiltration	8.30	4.51	9	1	0	0
10	Ph+ ALL	B-Common ALL	Ph+ ALL	9.30	5.52	7	1	0	1
11	Ph+ ALL	B-Common ALL	Ph+ ALL / t(8;14)	6.20	47.26	17	1	0	0
12	Ph+ ALL	Pro-B ALL	Ph+ ALL	5.20	4.32		1	0	1
13	Ph+ ALL	Pro-B ALL	BCP-ALL late relapse				1	1	1
14	Ph+ ALL	B-Common ALL	Ph+ ALL	10.0	5.73	8	1	0	0
15	Ph+ ALL	B-Common ALL	High D15 positivity (>5%)	9.60	5.68	6	0	0	1
16	Ph+ ALL	B-Common ALL	High D15 positivity (>5%)	7.90	3.99	11.6	0	1	1
17	Ph+ ALL	B-Common ALL	High D15 positivity (>5%)	2.7	36.9	10	0	0	1
18	CML-BP	CML-BP B-Common	High WBC	3.4	498.0	121	1	0	0
19	CML-BP	CML-BP B-Common	CNS infiltration	12.80	4.73	246	0	1	0
20	CML-BP	CML-BP B-Common	High WBC with neutrophilia	10.0	221.8	105	1	0	0
21	CML-BP	CML-BP B-Common	High WBC	6.20	76.1	37	1	0	1
22	CML-BP	CML-BP B-Common	Previous CML history, TKI use	7.90	12.11	21.9	1	0	1
23	CML-BP	CML-BP B-Common	High D15 positivity (>5%)	5.00	3.5	10.7	1	0	0
24	CML-BP	CML-BP Pro-B	Previous CML history, TKI use				1	1	1
25	CML-BP	CML-BP B-Common	High WBC	8.0	39.6	17	1	0	1
26	CML-BP	CML-BP B-Common	High WBC with neutrophilia				0	1	0
27	CML-BP	CML-BP B-Common	High WBC with neutrophilia	11.1	181.5	43	0	0	1

Supplementary Table S3: Immunophenotypic Characteristics

Case n	Maturation	LAIP markers	CD10	CD34	CD38	CD66C	CD73	CD304	CD123	D15 2	d15	d33	Sem 12
1	CD34+CD38-	CD34+CD38-	(+)	(++)	(-)				(+)	D15 >5%	35,4	0,0000	0,0000
2	CD34+CD38-	CD66+CD73+CD304+	(+)	(++)	(-/+)	(-/+)	(+)	(+)	(+)	D15 pos	0,25	0,0000	0,0000
3	CD10-CD34+CD38+	CD73+	(-/+ NG2)	(+)	(++)	(-)	(+)	(-)	(-/+)	D15 >5%	na	na	na
4	CD34+CD38-	CD73+CD304+	(+)	(-)	(++)	(-)	(++)	(+)	(+)	D15 pos	0,52	0,0000	0,0000
5	CD34+CD38-	CD66+	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	D15 >5%	50,0	0,0000	0,0000
6	CD34+CD38-	CD34+CD38-	(+)	(++)	(-)				(+)	D15 >5%	na	na	na
7	CD34+CD38-	CD34+CD38-	(+)	(++)	(-)				(+)	D15 >5%	na	na	na
8	CD34+CD38-	CD34+CD38-	(+)	(++)	(-)				(+)	D15 >5%	na	na	na
9	CD34+CD38-	CD66+CD73+CD304+	(+)	(++)	(-)	(-/+)	(+)	(++)	(-/+)	D15 >5%	29,4	7,20	0,0600
10	CD34+CD38-	CD66+CD73+CD304+	(+)	(++)	(-)	(-/+)	(++)	(++)	(+)	D15 pos	1,95	0,80	0,6000
11	CD34+CD38-	CD34+CD38-	(+)	(++)	(-/+)	CD9++			(+)	D15 <0.01%	0,00	0,0000	0,0000
12	CD10-CD34+CD38+	CD66+CD73+CD304+	(-)	(++)	(++)	(-/+)	(+)	(+)	(-/+)	D15 pos	0,18	0,0037	0,0000
13	CD10-CD34+CD38+	CD73+CD304+	(-)	(+)	(++)	(-)	(++)	(++)	(-/+)	D15 pos	1,10	0,2100	na
14	CD34+CD38-	CD66+	(+)	(++)	(-)	(-/+)			(+)	D15 pos	1,90	0,0000	0,0000
15	CD34+CD38-	CD73+CD304+	(+)	(+)	(++)	(-)	(++)	(++)	(-/+)	D15 >5%	17,0	43,5	death
16	CD34+CD38-	CD73+CD304+	(+)	(++)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	D15 >5%	7,40	0,070	0,0014
17	CD34+CD38-	CD66+	(-/+)	(+)	(-/+)	(+)			(+)	D15 >5%	80,0	death	death
18	CD34+CD38-	CD66+CD73+CD304+	(+)	(++)	(-)	(-/+)	(++)	(+)	(+)	D15 >5%	15,90	0,0300	0,0000
19	CD34+CD38-	CD34+CD38-	(+)	(++)	(-)				(+)	D15 >5%	na	na	na
20	CD34+CD38-	CD34+CD38-	(+)	(++)	(-)				(+)	D15 <0.01%	0,00	0,0000	0,0000
21	CD34+CD38-	CD66+CD73+CD304+	(+)	(+)	(-)	(-/+)	(+)	(+)	(+)	D15 pos	0,03	0,0015	0,0000
22	CD34+CD38-	CD66+CD304++	(-/+)	(++)	(-)	(-/+)	(-)	(+)	(+)	D15 pos	0,07	0,0000	0,0000
23	CD34+CD38-	CD73+CD304+	(+)	(++)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	D15 >5%	63,00	28,0	0,0000
24	CD10-CD34+CD38+	CD66+CD304++	(-)	(+)	(++)	(-/+)	(-)	(++)	(-/+)	D15 pos	0,83	88,4	death
25	CD34+CD38-	CD66+	(+)	(++)	(-)	(-/+)			(+)	D15 >5%	na	0,0000	0,0000
26	CD34+CD38-	CD66+CD73+CD304+	(+)	(++)	(-)	(-/+)	(+)	(+)	(-/+)	D15 >5%	65,00	11,9	7,5000
27	CD34+CD38-	CD66+CD73+CD304+	(+)	(+)	(-/+)	(-/+)	(+)	(+)	(+)	D15 pos	2,52	death	death

Table S5: Example of MRD kinetic from a CML-BP patient (case 23) with two BCR::ABL1 transcripts presented as acute leukaemia - p190 (e1a2) and p210 (e14a2) detected

Patient 23 -Time point	FCM-MRD %	Number of events in FCM	PCR-MRD	FCM vs PCR MRD
Diagnoses	43.7%	1,000,000	60.5%	C
After induction	63.0%	1,000,000	1.26% [e1a2 and e14a2 detected]	C
After consolidation	28.0%	1,000,000	Not done	--
Before SCT	0.0155%	10,000,000	0.017% [e1a2 and e14a2 detected]	C
D30	0.0007%**	10,000,000	0.0002% [e14a2 detected below QR]	D
D60	0.0017%	10,000,000	0.0001% [e14a2 detected below QR]	C
D100	<0.001%	10,000,000	<0.0001% [not detected]	C
D180	0.002%	10,000,000	0.0001% [e14a2 detected below QR]	C
D240	<0.0001%	10,000,000	<0.0001% [not detected]	C
D360	<0.001%	2,000,000	<0.0001% [not detected]	C

Legend: C, concordant results; D, discordant results; FCM-MRD, flow cytometry measurable residual disease; LoD, limit of detection; SCT, hematopoietic stem cell transplantation; PCR, polymerase chain reaction; QR, quantitative range; **0.0007% of blasts detected after revision.

Table S6: Example of MRD kinetic from a CML-BP patient (case 23) with three BCR::ABL1 transcripts presented as acute leukaemia - p190 (e1a2) and p210 (E13a2 and e14a2) detected

Patient 21 - Time point	FCM-MRD %	Number of events in FCM	PCR-MRD	FCM vs PCR MRD
Diagnoses	80.0%	1,000,000	110%	C
1. Hyper-CVAD +TKI	0.031%	10,000,000	0.03% [e1a2 / e13a2 and e14a2 detected]	C
2. Hyper-CVAD+TKI	0.0015%	10,000,000	0.003% [e13a2 and e14a2 detected]	C
3. Hyper-CVAD+TKI	<0.001%	10,000,000	<0.0001% [not detected]	C
4. Hyper-CVAD+TKI	<0.001%	10,000,000	<0.0001% [not detected]	C
5. Hyper-CVAD+TKI	<0.001%	10,000,000	<0.0001% [not detected]	C
6. Hyper-CVAD+TKI	<0.001%	10,000,000	<0.0001% [not detected]	C

Legend: C, concordant results; D, discordant results; FCM-MRD, flow cytometry measurable residual disease; LoD, limit of detection; ; PCR, polymerase chain reaction; QR, quantitative range; TKI, tyrosine kinase inhibitor.

5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos a avaliação da DRM se consolidou como um marcador biológico de doença e bom preditor de resposta nas leucemias agudas tanto linfóides quanto mielóides (BERRY et al., 2017; SHORT et al., 2020). O uso de estratégias adaptadas ao risco auxilia na definição de prognóstico e permite a classificação e alocação dos pacientes em diferentes esquemas de quimioterapia, principalmente no caso da LLA pediátrica (DWORZAK et al., 2018; KAROL et al., 2023; VAN DER SLUIS et al., 2023). No cenário do TCTH este dado torna-se especialmente sensível, uma vez que o monitoramento da DRM antes do procedimento tem impacto prognóstico já demonstrado em meta-análises realizadas em LLA e LMA (BUCKLEY et al., 2017; SHEN et al., 2018).

Neste contexto, o presente estudo introduziu e padronizou um método de citometria de fluxo de alta sensibilidade e custo-efetivo, utilizado para o diagnóstico e acompanhamento de pacientes com leucemias agudas no CHC-UFPR com recursos do Ministério da Saúde através do projeto Pronon. O objetivo principal foi aumentar a sensibilidade de detecção da DRM antes e depois do transplante, visando avaliar os desfechos de sobrevida e risco de recaída de acordo com a presença ou ausência de DRM detectável nos pontos avaliados. Paralelamente foi feita a validação da técnica de CFM de alta sensibilidade através da comparação com a biologia molecular (RQ-PCR) nos casos em que a pesquisa dos transcritos do gene *BCR::ABL1* foi realizada em amostras pareadas.

Previamente a este projeto, a pesquisa DRM nos pacientes com leucemias agudas no Hospital de Clínicas da UFPR era realizada com citometria de fluxo de 4 cores, a qual não contemplava a acurácia e sensibilidade do método atualmente sugerido na literatura (TEMBHARE et al., 2020; VAN DONGEN et al., 2015). A transição para a citometria de oito e dez cores com o uso dos citômetros FACSCanto II™ e FACSLyric™ aumentou significativamente a sensibilidade analítica, permitindo a detecção de populações celulares residuais com maior precisão (CHATTERJEE et al., 2021a; TEMBHARE et al., 2020; VAN DONGEN et al., 2015). Simultaneamente, a técnica de lise total (*bulk-lysis*) demonstrou ganhos de sensibilidade, reforçando sua aplicabilidade em diferentes cenários clínicos (SOH et al., 2020; STETLER-STEVENSON et al., 2016).

Em relação à DRM antes do transplante de células-tronco, nossos resultados foram consistentes com a literatura que demonstra prognóstico desfavorável em pacientes

transplantados com DRM positiva (BUCKLEY et al., 2017; SHEN et al., 2018). Os pacientes com DRM negativa tiveram uma sobrevida global maior (cerca de 80% em dois anos) que os pacientes com DRM detectada antes do transplante (cerca de 60%), como esperado. Entretanto, as análises de risco competitivo mostraram que tanto a fase da doença antes do transplante quanto a mortalidade por toxicidade relacionada ao procedimento influenciaram os desfechos de sobrevida. Após ajuste para o estado clínico, a negatividade para DRM antes do TCTH esteve ainda assim significativamente associada a uma melhor sobrevida, corroborando a hipótese de que pacientes com leucemia de alto risco em CR1 com DRM negativa são os que mais se beneficiam do transplante alogênico (KONOVA et al., 2019; WALTER et al., 2013; ZHANG et al., 2016).

Uma análise retrospectiva do nosso grupo com dados dos hospitais Amaral Carvalho de Jaú (n=143, 64%) e Hospital de Clínicas da UFPR, em Curitiba (n=82, 36%) de 2006 a 2013 mostrou uma sobrevida livre de recaída de acordo significativamente menor em pacientes com DRM positiva antes do procedimento (40% DRM- versus 60% DRM+, $p=0,001$), mesmo utilizando o método de citometria de fluxo de 4 cores que tem baixa sensibilidade (dados não publicados, resumo apresentado no congresso SBTMO 2013). No presente estudo a sobrevida livre de eventos foi mais alta em relação à encontrada nos estudos anteriores do nosso serviço (51% DRM+ vs 80% DRM-), sugerindo que o aumento na sensibilidade e especificidade do método com utilização foi importante para a melhor discriminação dos pacientes de bom prognóstico.

A associação inesperada entre o status de DRM pré-transplante e a mortalidade não relacionada a recaída nos pacientes do presente estudo merece investigação adicional. Fatores que podem ter influenciado são o uso de altas doses de TBI, presença de doença agressiva ou quimiorresistente em pacientes muito tratados previamente ao transplante, e recuperação imunológica tardia. Dados recentes do Registro Brasileiro de Transplantes de Células-Tronco Hematopoiéticas (RBTCTH), cobrindo 9.800 transplantes realizados entre 2012 e 2022, destacaram as infecções como a principal causa de morte nos primeiros 100 dias em todos os tipos de transplante no Brasil (SIMIONE et al., 2023). Este fato reforça a necessidade de iniciativas locais e nacionais para melhor controle de infecção, além de estratégias que permitam o encaminhamento mais precoce para o transplante no nosso meio. Por outro lado, os dados deste estudo indicam que apesar da alta toxicidade associada à irradiação corporal total no condicionamento, o uso de TBI reduziu

significativamente as taxas de recaída. Este fato reforça a necessidade de equilibrar cuidadosamente os riscos e benefícios do uso de TBI, já que o controle da doença pode superar as complicações potenciais (KLYUCHNIKOV et al., 2022; KONOVA et al., 2022; KORRAPOLU et al., 2023).

A persistência de doença residual detectável após o TCTH, especialmente no dia 100, apresentou alta especificidade como preditor de recaída nesta coorte (KIM et al., 2018; LOVISA et al., 2018). Dados similares foram observados em uma análise multicêntrica recente, indicando que pacientes com LMA e DRM+ no d100 apresentaram prognóstico desfavorável a curto prazo, independentemente do status de DRM antes do transplante (CABALLERO-VELÁZQUEZ et al., 2023). Além disso, a detecção precoce de blastos, entre os dias 20 e 40, emerge como oportunidade para intervenções preventivas. Dada a heterogeneidade da população estudada e o número relativamente pequeno de eventos, é essencial interpretar com cautela as análises de subgrupos. Diferenças na biologia da doença entre os subtipos de leucemia, complicações relacionadas ao tratamento e fatores específicos dos pacientes influenciam significativamente as taxas de recaída (SPYRIDONIDIS, 2020). Por exemplo, nosso estudo revelou que as recaídas foram mais comuns em leucemias mieloides, um grupo altamente heterogêneo com fatores prognósticos distintos, incluindo anormalidades citogenéticas e moleculares que afetam a resposta ao tratamento.

Do ponto de vista metodológico, embora os testes de citometria de fluxo para detecção de DRM em LLA-B estejam bem padronizados (DARZENTAS et al., 2023; THEUNISSEN et al., 2017b), ainda existem desafios na padronização dos testes para leucemias mieloides (BERNARDI et al., 2022; OSSENKOPPELE; SCHUURHUIS, 2014; SCHUURHUIS et al., 2018), já que além da falta de marcadores específicos há uma possível relação de evolução clonal levando a DRM persistentemente positiva em alguns casos. Tecnologias inovadoras, como a quantificação de células-tronco leucêmicas e ensaios moleculares, oferecem promessas na redução de resultados falso-negativos e fornecem insights adicionais sobre a arquitetura clonal (HASSERJIAN et al., 2020). Desta forma, a pesquisa de DRM em LMA por NGS após a quimioterapia inicial (LI et al., 2023) ou antes do transplante (THOL et al., 2018) tem ganhado espaço na literatura. Ao contrário da LLA, em que quase todos os protocolos terapêuticos são orientados com o uso de DRM, apenas uma pequena minoria de protocolos de tratamento de LMA incorpora informações sobre a DRM nas decisões terapêuticas (OSSENKOPPELE;

LOWENBERG, 2015), sendo a terapêutica de resgate é geralmente administrada com uma recaída hematológica óbvia (JASO et al., 2014; ZHOU; WOOD, 2017).

A quantificação dos transcritos do gene *BCR::ABL1* é o padrão-ouro no seguimento de LMC e nas leucemias agudas Philadelphia-positivas. No entanto, a avaliação da DRM por CFM é a abordagem recomendada para pacientes com outros subtipos genéticos (HOVORKOVA et al., 2024; ZUNA et al., 2022). A escolha do método geralmente depende do conhecimento técnico, dos recursos disponíveis e do desenho dos ensaios clínicos em cada instituição. Neste trabalho, embora a biologia molecular não tenha sido utilizada como método comparativo em todos os pacientes optamos por avaliar as amostras em que as técnicas de RQ-PCR e CFM foram realizadas paralelamente. Os casos discrepantes foram avaliados e observou-se que dos 12 casos considerados negativos na CFM e positivos na RQ-PCR, apenas 3 tinham sensibilidade analítica para diferenciar os blastos (<0,0001%). Destes um caso discrepante foi considerado positivo na reanálise, reforçando a necessidade de treinamento do analista e maior controle das variáveis pré-analíticas no contexto do laboratório de citometria de fluxo (IKOMA-COLTURATO et al., 2023).

A citometria de fluxo demonstrou desempenho comparável com a biologia molecular, ressaltando sua utilidade como uma ferramenta complementar na avaliação da DRM de LLA Ph+. Essa abordagem é fundamental no nosso meio, devido aos desafios na implementação e execução da avaliação de DRM por Ig/TCR qPCR ou NGS. Além disso, analisamos de forma abrangente as características clínicas, fenotípicas e genético-moleculares em uma coorte única de pacientes com LLA-Ph+, fornecendo informações valiosas sobre esse grupo de alto risco. A inclusão de marcadores associados a anormalidades genéticas aumentou a especificidade de detecção de DRM. Os quatro marcadores de fenótipo anômalo e as novas ferramentas de análise (visualização APS e imagem de referência) utilizados permitiram a identificação de pelo menos um LAIP em cada paciente com LLA Ph+, melhorando significativamente a discriminação entre hematogônias e células B patológicas nesses casos. Nossos resultados foram semelhantes aos de estudos recentes, nos quais a positividade para CD304 foi associada à presença do gene *BCR::ABL1* (CHATTERJEE et al., 2021b; GUDAPATI et al., 2020).

Embora não tenhamos encontrado associação entre o tipo de fusão *BCR::ABL1* e fatores clínicos ou fenotípicos, a alta prevalência do padrão CD34+CD38-/fraco em linfoblastos CD19+CD10+ foi surpreendente. Esse padrão é raro na medula óssea,

especialmente quando essas células expressam fenótipos específicos associados à leucemia, como CD73, CD304 e/ou CD66c. Esse padrão pode refletir um fenótipo anômalo de célula-tronco leucêmica (CTL), característico desse subgrupo de alto risco (ZEIJLEMAKER et al., 2016, 2019). A identificação de antígenos de superfície específicos das CTLs que as diferenciem das células-tronco normais tem resultados variados na literatura (MIZUTA et al., 2024; SADOVNIK et al., 2016). Recentemente, foi publicada uma análise molecular de células da medula óssea isoladas de pacientes com LMC fase crônica revelou uma população distinta de CTL positivas para *BCR-ABL1*, caracterizada pelo fenótipo CD34+CD38-/fraco, com CD45RA-cKIT-CD26+(HANEKAMP; CLOOS; SCHUURHUIS, 2017; REUVEKAMP; BACHAS; CLOOS, 2024). Essas células mostraram-se resistentes ao tratamento, molecularmente quiescentes e primitivas. Outra análise demonstrou que as CTL persistentes após terapia prolongada com inibidores de tirosina quinase (TKIs) apresentavam altos níveis de sinalização por fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Essa característica não se restringiu apenas às CTL Ph+, pois células-tronco hematopoiéticas Ph-negativas (Ph-) em pacientes com LMC que responderam mal ao tratamento também exibiram aumento na sinalização de TGF- β e TNF- α , sugerindo uma alteração generalizada do microambiente(SADOVNIK et al., 2016).

Apesar da associação bem definida da DRM positiva à resultados adversos do TCTH em leucemias agudas(BADER et al., 2002; ROCHA et al., 2021), ainda há muitas questões em aberto, tais como o papel da consolidação adicional antes do transplante para a erradicação da DRM(JÄGER et al., 2023), a capacidade do transplante de superar a influência negativa da DRM na sobrevivência, o impacto da intensidade do regime de condicionamento (POCHON et al., 2015) e o papel da avaliação da DRM na orientação do tratamento de manutenção pós-transplante.

Embora a maioria dos centros ligados ao EBMT utilizem métodos de alta sensibilidade para detecção de DRM, uma limitação dos estudos de registro é a falta de acesso aos detalhes das metodologias utilizadas e dos alvos usados em pacientes individuais(PAVLŮ et al., 2019a; RUGGERI et al., 2012). Com o desenvolvimento contínuo de tecnologias mais sensíveis para a detecção de DRM, é importante avaliar como essas ferramentas podem influenciar nossa compreensão dos baixos níveis de DRM no contexto do transplante de células-tronco. Contudo, não se sabe não se sabe a real

significância clínica da presença de baixos níveis de DRM antes do transplante, incluindo o uso de baixos níveis de DRM na indicação do TCTH (BADER et al., 2019; PARAS et al., 2022).

A utilização dos recursos do PRONON neste trabalho permitiu a renovação do parque tecnológico do laboratório, como consequência houve uma melhoria evidente na pesquisa de DRM, com aumento da sensibilidade e especificidade do teste em relação ao método de citometria de 4 cores. Além disso foi possível a capacitação de profissionais na área de hematologia e citometria de fluxo, com discussão dos aspectos técnico científicos e acompanhamento dos resultados, permitindo melhoria substancial no cuidado aos pacientes. Por fim, após a implementação e padronização da técnica de citometria de fluxo multiparamétrica de alta sensibilidade, esta passou a fazer parte da rotina assistencial do hospital proponente tanto para o diagnóstico quanto o seguimento dos pacientes doenças hematológicas malignas atendidos no âmbito de um hospital universitário 100% SUS que é o CHC-UFPR.

Apesar de várias limitações, como o pequeno número e a heterogeneidade da coorte, nosso estudo demonstra a viabilidade e utilidade da citometria de fluxo como uma ferramenta sensível, adequada e custo-efetiva para detectar DRM em leucemias agudas no contexto do transplante de células-tronco hematopoiéticas. Esta técnica se consolida como uma ferramenta essencial para o acompanhamento da doença, especialmente em contextos com acesso limitado a diagnósticos moleculares avançados.

Este estudo destaca ainda a complexidade genético-molecular das leucemias linfoblásticas agudas, reforça a importância da integração de avaliações moleculares e fenotípicas abrangentes para aprimorar a precisão prognóstica e otimizar as estratégias terapêuticas. Finalmente, os achados enfatizam a importância de incorporar a cinética de DRM peri-transplante na gestão de rotina das leucemias agudas, especialmente em países de baixa e média renda, onde a otimização de recursos e intervenções precoces pode impactar significativamente os desfechos dos pacientes.

6 CONCLUSÕES

- A presença de doença residual mensurável (DRM) detectada por citometria de fluxo antes do transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) foi significativamente associada a piores desfechos primários em comparação com pacientes sem DRM detectada.
- Cinética de eliminação da DRM: A persistência da DRM no dia +100 após o TCTH correlacionou-se com piora na sobrevida e maior risco de recidiva, especialmente em pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA).
- A incorporação da lise total (bulk-lysis) e o uso de protocolos de 8 cores aumentaram a sensibilidade da detecção de DRM, superando os protocolos anteriores de 4 cores.
- A citometria de fluxo apresentou desempenho comparável à quantificação de transcritos do gene *BCR::ABL1* por RQ-PCR, ressaltando seu papel como ferramenta complementar na LLA-B Philadelphia-positivo.
- A inclusão de novos marcadores celulares (CD304, CD73, CD66c, CD123) aprimorou a caracterização dos blastos e precursores linfoides B, aumentando a precisão diagnóstica.
- A estratégia utilizada demonstrou alta especificidade, identificando linfoblastos com marcadores característicos da leucemia (CD66c, CD304) e um perfil fenotípico CD34++CD38–/fraco particularmente marcante nos pacientes com LLA Ph+, diferenciando-os de outros subtipos genético-moleculares.

7 REFERÊNCIAS

AL HAMED, R. et al. Measurable residual disease, FLT3-ITD mutation, and disease status have independent prognostic influence on outcome of allogeneic stem cell transplantation in NPM1-mutated acute myeloid leukemia. **Cancer Medicine**, v. 11, n. 4, 2022.

ALAGGIO, R. et al. **The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms**. *Leukemia* German Ott 51 ☒, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41375-022-01620-2>>

ALGHANDOUR, R.; SAKR, D. H.; SHAABAN, Y. **Philadelphia-like acute lymphoblastic leukemia: the journey from molecular background to the role of bone marrow transplant—review article**. *Annals of Hematology*, 2023.

ARABI, S. et al. The prognostic significance of hematogones in childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric Blood and Cancer**, v. 70, n. 2, 2023.

ARUMUGAM, J. R. et al. Immunophenotypic expression and immunomodulation in minimal residual disease analysis of pediatric B acute lymphoblastic leukemia by high sensitive flow cytometry. **Leukemia and Lymphoma**, v. 63, n. 3, p. 644–652, 2022.

BADER, P. et al. Minimal residual disease (MRD) status prior to allogeneic stem cell transplantation is a powerful predictor for post-transplant outcome in children with ALL. **Leukemia**, v. 16, n. 9, p. 1668–1672, 2002.

BADER, P. et al. Prognostic value of Minimal residual disease quantification before allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: The ALL-REZ BFM Study Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 3, p. 377–384, 2009.

BADER, P. et al. Monitoring of minimal residual disease after allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia allows for the identification of impending relapse: Results of the all-bfm-sct 2003 trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 11, p. 1275–1284, 2015.

BADER, P. et al. More precisely defining risk peri-HCT in pediatric ALL: Pre- vs post-MRD measures, serial positivity, and risk modeling. **Blood Advances**, v. 3, n. 21, p. 3393–3405, 2019.

BAIN, B. J.; ESTCOURT, L. **FAB Classification of Leukemia**. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. v. 3

BALDUZZI, A. et al. Minimal residual disease before and after transplantation for childhood acute lymphoblastic leukaemia: Is there any room for intervention? **British Journal of Haematology**, v. 164, n. 3, p. 396–408, 2014.

BALDZHIEVA, A. et al. **A Concise Review of Flow Cytometric Methods for Minimal Residual Disease Assessment in Childhood B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia**. *Folia Medica*, 2023.

BAR, M. et al. Impact of Minimal Residual Disease, Detected by Flow Cytometry, on Outcome of Myeloablative Hematopoietic Cell Transplantation for Acute Lymphoblastic Leukemia. **Leukemia Research and Treatment**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

BASSAN, R. et al. In Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) Different Minimal Residual Disease (MRD) Levels Predict Clinical Outcome in All Patients and Response to Allogeneic/Autologous Transplantation in MRD-Positive Patients. **Blood**, v. 120, n. 21, p. 2493–2493, 16 nov. 2012.

BASSAN, R. et al. **Different molecular levels of post-induction minimal residual disease may predict hematopoietic stem cell transplantation outcome in adult Philadelphia-negative acute lymphoblastic leukemia**. *Blood Cancer Journal* Nature Publishing Group, , 2014.

BASSAN, R. et al. **A systematic literature review and metaanalysis of minimal residual disease as a prognostic indicator in adult B-cell acute lymphoblastic leukemia**. *Haematologica*, 2019.

BÉNÉ, M. C. **Immunophenotyping of acute leukaemias**. *Immunology Letters* Elsevier, , 15 abr. 2005. . Acesso em: 17 fev. 2024

BENGTSSON, M. et al. B lymphocyte regeneration in marrow and blood after autologous bone marrow transplantation: Increased numbers of B cells carrying activation and progression markers. **Leukemia Research**, v. 13, n. 9, p. 791–797, 1 jan. 1989.

BERNARDI, M. et al. **MRD in Venetoclax-Based Treatment for AML: Does it Really Matter?** **Frontiers in Oncology**, 2022.

BERRY, D. A. et al. Association of minimal residual disease with clinical outcome in pediatric and adult acute lymphoblastic leukemia: A meta-analysis. **JAMA Oncology**, v. 3, n. 7, 2017.

BLANCO, E. et al. Age-associated distribution of normal B-cell and plasma cell subsets in peripheral blood. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 141, n. 6, p. 2208-2219.e16, 1 jun. 2018.

BOCCUNI, P. et al. CD66c antigen expression is myeloid restricted in normal bone marrow but is a common feature of CD10+ early-B-cell malignancies. **Tissue Antigens**, v. 52, n. 1, p. 1–8, 1998.

BOROWITZ, M. J. et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: A Children's Oncology Group study. **Blood**, v. 111, n. 12, p. 5477–5485, 15 jun. 2008.

BOROWITZ, M. J. et al. Prognostic significance of minimal residual disease in high risk B-ALL: A report from Children's Oncology Group study AALL0232. **Blood**, v. 126, n. 8, p. 964–971, 2015.

BOROWITZ, M. J. et al. Measurable Residual Disease Detection in B-Acute Lymphoblastic Leukemia: The Children's Oncology Group (COG) Method. **Current Protocols**, v. 2, n. 3, 2022.

BRAS, A. E. et al. CD123 expression levels in 846 acute leukemia patients based on standardized immunophenotyping. **Cytometry Part B - Clinical Cytometry**, v. 96, n. 2, p. 134–142, 2019.

BROWN, P. A. et al. Acute lymphoblastic leukemia, version 2.2021. **JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 19, n. 9, p. 1079–1109, 2021.

BUCKLEY, S. A. et al. **Minimal residual disease prior to allogeneic hematopoietic cell transplantation in acute myeloid leukemia: A meta-analysis.** *Haematologica* Ferrata Storti Foundation, , 30 abr. 2017.

BURG, M. VAN DER et al. Composition of EuroFlow-PID panels and technical information on reagents. v. 1, n. November, p. 1–9, 2019.

CABALLERO-VELÁZQUEZ, T. et al. Prognostic Value of Measurable Residual Disease in Patients with AML Undergoing HSCT: A Multicenter Study. **Cancers**, v. 15, n. 5, 1 mar. 2023.

CAMPANA, D. Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Hematology**, 2010.

CAMPBELL, M. et al. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Results of the Randomized Acute Lymphoblastic Leukemia Intercontinental-Berlin-Frankfurt-Münster 2009 Trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 41, n. 19, 2023.

CAVÉ, H. et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 9, p. 591–598, 1998.

CHATTERJEE, G. et al. Immunophenotypic shift in the B-cell precursors from regenerating bone marrow samples: A critical consideration for measurable residual disease assessment in B-lymphoblastic leukemia. **Cytometry Part B - Clinical Cytometry**, v. 100, n. 4, p. 434–445, 1 jul. 2021a.

CHATTERJEE, G. et al. Expression of CD304/neuropilin-1 in adult b-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma and its utility for the measurable residual disease assessment. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 43, n. 5, p. 990–999, 12 out. 2021b.

CHATTERJEE, G. et al. Mimics and artefacts of measurable residual disease in a highly sensitive multicolour flow cytometry assay for B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma: critical consideration for analysis of measurable residual disease. **British Journal of Haematology**, v. 196, n. 2, p. 374–379, 2 jan. 2022.

CHEN, X.; WOOD, B. L. Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: Techniques and Application. Em: **Clinical Management of Acute Lymphoblastic Leukemia: From Bench to Bedside**. [s.l: s.n.].

CHERIAN, S.; SOMA, L. A. How i diagnose minimal/measurable residual disease in b lymphoblastic leukemia/lymphoma by flow cytometry. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 155, n. 1, p. 38–54, 1 jan. 2021.

CIUDAD, J. et al. Detection of abnormalities in B-cell differentiation pattern is a useful tool to predict relapse in precursor-B-ALL. **British Journal of Haematology**, 1999.

COUSTAN-SMITH, E. et al. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, 2002a.

COUSTAN-SMITH, E. et al. Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 100, n. 7, p. 2399–2402, 2002b.

COUSTAN-SMITH, E. et al. New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 117, n. 23, p. 6267–6276, 2011.

COUSTAN-SMITH, E.; CAMPANA, D. **Immunologic minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia: A comparative approach to molecular testing**. **Best Practice and Research: Clinical Haematology**, 2010.

CREE, I. A. **The WHO Classification of Haematolymphoid Tumours**. **Leukemia**Springer Nature, , 1 jul. 2022.

CROSS, N. C. P. et al. European LeukemiaNet laboratory recommendations for the diagnosis and management of chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 37, n. 11, p. 2150–2167, 2023.

CZUCZMAN, M. S. et al. Value of immunophenotype in intensively treated adult acute lymphoblastic leukemia: Cancer and leukemia group B study 8364. **Blood**, v. 93, n. 11, p. 3931–3939, 1999.

CZYZ, A.; NAGLER, A. **The role of measurable residual disease (MRD) in hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies focusing on acute leukemia. International Journal of Molecular Sciences**NLM (Medline), , 1 nov. 2019.

DA ROSA, S. E. A. et al. Real-world genomic profiling of acute myeloid leukemia and the impact of European LeukemiaNet risk stratification 2022 update. **Clinical and Translational Oncology**, v. 25, n. 12, p. 3431–3436, 1 dez. 2023.

DARZENTAS, F. et al. Insights into IGH clonal evolution in BCP-ALL: frequency, mechanisms, associations, and diagnostic implications. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 2023.

DAVIES, S. M. et al. Pharmacogenetics of minimal residual disease response in children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia: A report from the children's oncology group. **Blood**, v. 111, n. 6, p. 2984–2990, 2008.

DÍEZ-CAMPELO, M. et al. Minimal residual disease monitoring after allogeneic transplantation may help to individualize post-transplant therapeutic strategies in acute myeloid malignancies. **American Journal of Hematology**, 2009.

DIGIUSEPPE, J. A.; WOOD, B. L. **Applications of Flow Cytometric Immunophenotyping in the Diagnosis and Posttreatment Monitoring of B and T Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma. Cytometry Part B - Clinical Cytometry**, 2019.

DJOKIC, M. et al. Overexpression of CD123 correlates with the hyperdiploid genotype in acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 94, n. 7, p. 1016–1019, 1 jul. 2009.

DÖHNER, H. et al. **Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Blood**American Society of Hematology, , 26 jan. 2017.

DÖHNER, H. et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. **Blood**, v. 140, n. 12, p. 1345–1377, 2022.

DRIESSEN, G. J. et al. B-cell replication history and somatic hypermutation status identify distinct pathophysiologic backgrounds in common variable immunodeficiency. **Blood**, 2011.

DUFFIELD, A. S.; MULLIGHAN, C. G.; BOROWITZ, M. J. **International Consensus Classification of acute lymphoblastic leukemia/lymphoma**. **Virchows Archiv**, 24 jan. 2023.

DWORZAK, M. N. et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 99, n. 6, p. 1952–1958, 2002.

DWORZAK, M. N. et al. AIEOP-BFM consensus guidelines 2016 for flow cytometric immunophenotyping of Pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Cytometry Part B - Clinical Cytometry**, v. 94, n. 1, p. 82–93, 2018.

EUROFLOW CONSORTIUM. EuroFlow Standard Operating Procedure (SOP) for Bulk Lysis for MRD panels. **Standardized EuroFlow Protocols**, v. Version 1., n. June, p. 1–8, 2018.

EUROFLOW CONSORTIUM. EuroFlow Standard Operating Procedure (SOP) for Sample preparation and staining Version 1.4. **<https://Euroflow.Org/Usr/Pub/Protocols.Php>**, v. 4, n. Version 1.5, p. 8, 2019.

FOÀ, R.; CHIARETTI, S. Philadelphia Chromosome–Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 386, n. 25, p. 2399–2411, 23 jun. 2022.

FUDA, F.; CHEN, W. **Minimal/Measurable Residual Disease Detection in Acute Leukemias by Multiparameter Flow Cytometry**. **Current Hematologic Malignancy Reports**, 2018a.

FUDA, F.; CHEN, W. **Minimal/Measurable Residual Disease Detection in Acute Leukemias by Multiparameter Flow Cytometry. Current Hematologic Malignancy Reports** Current Science Inc., , 1 dez. 2018b.

GAIPA, G. et al. Prednisone induces immunophenotypic modulation of CD10 and CD34 in nonapoptotic B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells. **Cytometry Part B - Clinical Cytometry**, 2008.

GAIPA, G. et al. **Detection of minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia. Cytometry Part B - Clinical Cytometry**, 2013.

GAO, Q. et al. Highly sensitive single tube B-lymphoblastic leukemia/lymphoma minimal/measurable residual disease test robust to surface antigen directed therapy. **Cytometry Part B - Clinical Cytometry**, 2023.

GETTA, B. M. et al. Multicolor Flow Cytometry and Multigene Next-Generation Sequencing Are Complementary and Highly Predictive for Relapse in Acute Myeloid Leukemia after Allogeneic Transplantation. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 23, n. 7, p. 1064–1071, 2017.

GÖKBUGET, N. et al. **Diagnosis, prognostic factors, and assessment of ALL in adults: 2024 ELN recommendations from a European expert panel. Blood**, 2024. Disponível em: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/143/19/1903/2224735/blood_bld-2023-023568-main.pdf>

GRIESINGER, F. et al. Leukaemia-associated immunophenotypes (LAIP) are observed in 90% of adult and childhood acute lymphoblastic leukaemia: Detection in remission marrow predicts outcome. **British Journal of Haematology**, v. 105, n. 1, p. 241–255, abr. 1999.

GUDAPATI, P. et al. CD304/neuropilin-1 is a very useful and dependable marker for the measurable residual disease assessment of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Cytometry Part B - Clinical Cytometry**, v. 98, n. 4, p. 328–335, 1 jul. 2020.

GUILLAUME, N. et al. CD66c expression in B-cell acute lymphoblastic leukemia: Strength and weakness. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 33, n. 1, p. 92–96, 10 fev. 2011.

GYURKOCZA, B.; REZVANI, A.; STORB, R. F. Allogeneic hematopoietic cell transplantation: the state of the art. **Expert Review of Hematology**, v. 3, n. 3, p. 285–299, 10 jun. 2010.

HANEKAMP, D.; CLOOS, J.; SCHUURHUIS, G. J. **Leukemic stem cells: identification and clinical application**. **International Journal of Hematology** Springer Tokyo, , 1 maio 2017.

HASSERJIAN, R. P. et al. **Clonal hematopoiesis and measurable residual disease assessment in acute myeloid leukemia**. **Blood**, 2020. Disponível em: <<http://ashpublications.org/blood/article-pdf/135/20/1729/1728274/bloodbld2019004770.pdf>>

HEUSER, M. et al. 2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. **Blood**, v. 138, n. 26, p. 2753–2767, 30 dez. 2021.

HIRABAYASHI, S. et al. ZNF384-related fusion genes define a subgroup of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with a characteristic immunotype. **Haematologica**, v. 102, n. 1, p. 118–129, 2017.

HOVORKOVA, L. et al. **Distinct pattern of genomic breakpoints in CML and BCR::ABL1-positive ALL: analysis of 971 patients**. **Molecular Cancer** BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2024.

HUNGER, S. P.; MULLIGHAN, C. G. **Redefining ALL classification: Toward detecting high-risk ALL and implementing precision medicine**. **Blood**, 2015.

IKOMA-COLTURATO, M. R. V. et al. **Multicentric standardization of minimal/measurable residual disease in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia using next-generation flow cytometry in a low/middle-level income country**. **British Journal of Haematology** John Wiley and Sons Inc, , 2023.

INABA, H.; MULLIGHAN, C. G. **Pediatric acute lymphoblastic leukemia**. **Haematologica** Ferrata Storti Foundation, , 1 nov. 2020.

INCA. **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil**. [s.l: s.n.].

JAFARI, K. et al. Visualization of Cell Composition and Maturation in the Bone Marrow Using 10-Color Flow Cytometry and Radar Plots. **Cytometry Part B - Clinical Cytometry**, v. 94, n. 2, p. 219–229, 2018.

JÄGER, P. et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and pre-transplant strategies in patients with NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a single center experience. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2023.

JASO, J. M. et al. **Multi-color flow cytometric immunophenotyping for detection of minimal residual disease in AML: past, present and future. Bone marrow transplantation**, 2014.

JEHA, S. et al. Clinical Significance of Novel Subtypes of Acute Lymphoblastic Leukemia in the Context of Minimal Residual Disease–Directed Therapy. **Blood Cancer Discovery**, v. 2, n. 4, p. 326–337, 2021.

JONES, D. et al. BCR-ABL fusion transcript types and levels and their interaction with secondary genetic changes in determining the phenotype of Philadelphia chromosome positive leukemias. **Blood**, v. 112, n. 13, p. 5190–5192, 2008a.

JONES, D. et al. BCR-ABL fusion transcript types and levels and their interaction with secondary genetic changes in determining the phenotype of Philadelphia chromosome-positive leukemias. 2008b.

KALINA, T. et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. **Leukemia**, v. 26, n. 9, p. 1986–2010, set. 2012.

KAROL, S. E. et al. Clinical impact of minimal residual disease in blood and bone marrow of children with acute myeloid leukemia. **Blood Advances**, v. 7, n. 14, 2023.

KAVESH, M. et al. IgH gene rearrangement by PCR as an adjunct to flow cytometric analysis for the detection of minimal residual disease in patients with B lymphoblastic leukemia. **Journal of Hematopathology**, v. 13, n. 3, p. 137–142, 1 set. 2020.

KIM, J. C. et al. Transcriptomic classes of BCR-ABL1 lymphoblastic leukemia. **Nature Genetics**, v. 55, n. 7, p. 1186–1197, 19 jul. 2023a.

KIM, R. et al. Genetic alterations and MRD refine risk assessment within KMT2A -rearranged B-cell precursor ALL in adult: a GRAALL study . **Blood Journal**, 2023b.

KIM, T. H. et al. Next-generation sequencing–based posttransplant monitoring of acute myeloid leukemia identifies patients at high risk of relapse. **Blood**, v. 132, n. 15, p. 1604–1613, 2018.

KIYOKAWA, N. et al. Significance of CD66c expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia Research**, v. 38, n. 1, p. 42–48, 1 jan. 2014.

KLYUCHNIKOV, E. et al. Post-Transplantation Day +100 Minimal Residual Disease Detection Rather Than Mixed Chimerism Predicts Relapses after Allogeneic Stem Cell Transplantation for Intermediate-Risk Acute Myelogenous Leukemia Patients Undergoing Transplantation in Complete Remi. **Transplantation and Cellular Therapy**, v. 28, n. 7, p. 374.e1-374.e9, 1 jul. 2022.

KONOVA, Z. V. et al. Impact of Minimal Residual Disease Detected By Multiparameter Flow Cytometry on Outcomes of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia Patients in First Complete Remission. **Blood**, v. 134, n. Supplement_1, p. 4562–4562, 13 nov. 2019.

KONOVA, Z. et al. ALL-228 Unfavorable Influence of Minimal Residual Disease on the Outcome of Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in Acute Lymphoblastic Leukemia in the First Remission. **Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia**, v. 22, 2022.

KORRAPOLU, R. S. A. et al. What happens to children with acute lymphoblastic leukemia in low- and middle-income countries after relapse? A single-center experience from India. **Pediatric Hematology and Oncology**, v. 40, n. 5, 2023.

KRÖGER, N. et al. NCI first international workshop on the biology, prevention, and treatment of relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Report from the committee on disease-specific methods and strategies for monitoring relapse following allogenei. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 16, n. 9, p. 1187–1211, 1 set. 2010.

KULIS, J. et al. **Commonly Assessed Markers in Childhood BCP-ALL Diagnostic Panels and Their Association with Genetic Aberrations and Outcome Prediction.** *GenesMDPI*, , 1 ago. 2022.

LADETTO, M. et al. Methods and role of minimal residual disease after stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, v. 54, n. 5, 2019.

LARSON, R. A. et al. A randomized controlled trial of filgrastim during remission induction and consolidation chemotherapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: CALGB study 9111. **Blood**, 1998.

LAUTEN, M. et al. Prediction of outcome by early bone marrow response in childhood acute lymphoblastic leukemia treated in the ALL-BFM 95 trial: Differential effects in precursor B-cell and T-cell leukemia. **Haematologica**, v. 97, n. 7, p. 1048–1056, 2012.

LEE, W. I. et al. Quantitative measurement of BCR/abl transcripts using real-time polymerase chain reaction. **Annals of Oncology**, v. 13, n. 5, p. 781–788, 2002.

LI, Y. et al. NGS-defined measurable residual disease (MRD) after initial chemotherapy as a prognostic biomarker for acute myeloid leukemia. **Blood Cancer Journal**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2023.

LIAO, H. et al. The prognostic significance of hematogones and CD34+ myeloblasts in bone marrow for adult B-cell lymphoblastic leukemia without minimal residual disease. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

LOKE, J. et al. Impact of pre-transplantation minimal residual disease (MRD) on the outcome of Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute leukemia. **Cytometry Part B - Clinical Cytometry**, v. 26, n. 1, p. 295–300, 1 dez. 2021.

LOVISA, F. et al. Pre- and post-transplant minimal residual disease predicts relapse occurrence in children with acute lymphoblastic leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 180, n. 5, p. 680–693, 2018.

LUCIO, P. et al. BIOMED-I concerted action report: flow cytometric immunophenotyping of precursor B-ALL with standardized triple-stainings , JF San Miguel 6 and A Orfao 6 from the BIOMED-1 Concerted Action 'Investigation of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia: Inte. **Leukemia**, v. 15, p. 1185–1192, 2001.

LUTHRA, R.; MEDEIROS, L. J. **TaqMan reverse transcriptase-polymerase chain reaction coupled with capillary electrophoresis for quantification and identification of bcr-abl transcript type. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**New JerseyHumana Press, , 2006.

MATTHES, T. et al. Standardization of 8-color flow cytometry across different flow cytometer instruments: A feasibility study in clinical laboratories in Switzerland. **Journal of Immunological Methods**, v. 475, 2019.

MCKENNA, R. W. et al. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. **Blood**, v. 98, n. 8, p. 2498–2507, 2001.

MEJSTRÍKOVÁ, E. et al. **CD19-negative relapse of pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia following blinatumomab treatment. Blood Cancer Journal**, 2017.

MERLI, P. et al. **Minimal Residual Disease Prior to and After Haematopoietic Stem Cell Transplantation in Children and Adolescents With Acute Lymphoblastic Leukaemia: What Level of Negativity Is Relevant? Frontiers in Pediatrics**, 2021.

MEUR, G. LE et al. Impact on Outcome of Minimal Residual Disease after Hematopoietic Stem Cell Transplantation with Fludarabine, Amsacrine, and Cytosine Arabinoside-Busulfan Conditioning: A Retrospective Monocentric Study. **Transplantation and Cellular Therapy**, v. 29, n. 1, p. 38.e1-38.e9, jan. 2023.

MEYER, C. et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. **Leukemia**, v. 32, n. 2, p. 273–284, 1 fev. 2018.

MEYER, C. et al. The KMT2A recombinome of acute leukemias in 2023. **Leukemia**, v. 37, n. 5, 2023.

MIZUTA, S. et al. Flow cytometric analysis of CD34+CD38– cells; cell frequency and immunophenotype based on CD45RA expression pattern. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 106, n. 1, p. 35–44, 1 jan. 2024.

MRÓZEK, K.; HEEREMA, N. A.; BLOOMFIELD, C. D. **Cytogenetics in acute leukemia**. **Blood Reviews**, 2004.

MUFFLY, L. How I Approach the Patient Who Has MRD or Relapse After Transplant. **Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia**, v. 20, p. S32–S33, 2020.

NEALE, G. A. M. et al. Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 18, n. 5, p. 934–938, 2004.

ORFAO, A. et al. **Immunophenotypic dissection of normal hematopoiesis**. **Journal of Immunological Methods**, 2019.

OSSENKOPPELE, G. J.; SCHUURHUIS, G. J. **MRD in AML: It is time to change the definition of remission**. **Best Practice and Research: Clinical Haematology**, 2014.

OSSENKOPPELE, G.; LOWENBERG, B. How I treat the older patient with AML. **Blood**, v. 125, n. 5, p. 767–774, 2015.

OUYANG, G. et al. Clinically useful flow cytometry approach to identify immunophenotype in acute leukemia. **Journal of International Medical Research**, v. 47, n. 4, p. 1483–1492, 1 abr. 2019.

PARAS, G. et al. Conditioning intensity and peritransplant flow cytometric MRD dynamics in adult AML. **Blood**, v. 139, n. 11, p. 1694–1706, 17 mar. 2022.

PAVLŮ, J. et al. Measurable residual disease at myeloablative allogeneic transplantation in adults with acute lymphoblastic leukemia: A retrospective registry study on 2780 patients from the acute leukemia working party of the EBMT. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 12, n. 1, 2019a.

PAVLŮ, J. et al. Measurable residual disease at myeloablative allogeneic transplantation in adults with acute lymphoblastic leukemia: A retrospective registry study on 2780 patients from the acute leukemia working party of the EBMT. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 12, n. 1, 2019b.

PLACEK, A. et al. Maturational dyssynchrony in benign B-cell precursors following lymphocyte depleting chemotherapy: A potential pitfall for B-lymphoblastic leukemia minimal/measurable residual disease (MRD) flow cytometry analysis. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 106, n. 2, p. 138–141, 1 mar. 2024.

PLASSCHAERT, S. L. A. et al. Prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia: A question of maturation? **Cancer Treatment Reviews**, v. 30, n. 1, p. 37–51, fev. 2004.

POCHON, C. et al. Follow-up of post-transplant minimal residual disease and chimerism in childhood lymphoblastic leukaemia: 90 d to react. **British Journal of Haematology**, v. 169, n. 2, p. 249–261, 2015.

POPOV, A. et al. Genetic characteristics and treatment outcome in infants with KMT2A germline B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: Results of MLL-Baby protocol. **Pediatric Blood and Cancer**, v. 70, n. 4, 2023a.

POPOV, A. et al. **Flow cytometric MRD at the end of consolidation in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia has significant prognostic value but limited clinical implications: Results of study ALL-MB 2008.** *Leukemia Research*, 2023b.

POTTER, M. N.; STEWARD, C. G.; OAKHILL, A. The significance of detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 83, n. 3, p. 412–418, 12 mar. 1993.

PUI, C. H. et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: Results of Total Therapy Study XIII B at St Jude Children's Research Hospital. **Blood**, 2004.

PUI, C. H. et al. Long-term results of st jude total therapy studies 11, 12, 13a, 13b, and 14 for childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, 2010.

PUI, C. H. et al. Improved prognosis for older adolescents with acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 4, p. 386–391, 2011.

PUI, C. H.; EVANS, W. E. A 50-Year Journey to Cure Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Seminars in Hematology**, v. 50, n. 3, p. 185–196, 1 jul. 2013.

PUI, C. H.; RELLING, M. V.; DOWNING, J. R. **Mechanisms of disease: Acute lymphoblastic leukemia**. **New England Journal of Medicine**, 2004.

QIU, K. Y. et al. Prognostic Value and Outcome for ETV6/RUNX1-Positive Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: A Report From the South China Children's Leukemia Group. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 20 dez. 2021.

RAFF, T. et al. Molecular relapse in adult standard-risk ALL patients detected by prospective MRD monitoring during and after maintenance treatment: Data from the GMALL 06/99 and 07/03 trials. **Blood**, 2007.

RAMALINGAM, T. R. et al. Deciphering stage 0 hematogones by flow cytometry in follow-up bone marrow samples of pediatric B—Acute lymphoblastic leukemia cases: A potential mimicker of residual disease after anti CD19 therapy. **Cytometry Part B - Clinical Cytometry**, 2024.

REITER, A. et al. Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86. **Blood**, 1994.

REUVEKAMP, T.; BACHAS, C.; CLOOS, J. **Immunophenotypic features of early haematopoietic and leukaemia stem cells**. **International Journal of Laboratory Hematology** John Wiley and Sons Inc, , 1 out. 2024.

ROBINSON, J. P. et al. **Flow Cytometry: The Next Revolution**. **Cells** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 jul. 2023.

ROCHA, J. M. C. et al. 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. **Pediatric Hematology and Oncology**, v. 36, n. 5, p. 287–301, 4 jul. 2019.

ROCHA, V. et al. Impact of mother donor, peripheral blood stem cells and measurable residual disease on outcomes after haploidentical hematopoietic cell transplantation with post-transplant cyclophosphamide in children with acute leukaemia. **Bone Marrow Transplantation**, v. 56, n. 12, p. 3042–3048, 21 dez. 2021.

ROSSI, G. et al. Optimal time-points for minimal residual disease monitoring change on the basis of the method used in patients with acute myeloid leukemia who underwent allogeneic stem cell transplantation: A comparison between multiparameter flow cytometry and Wilms' tu. **Leukemia Research**, v. 39, n. 2, p. 138–143, 2015.

ROTHENBERG-THURLEY, M. et al. Persistence of pre-leukemic clones during first remission and risk of relapse in acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 32, n. 7, p. 1598–1608, 2018.

RUGGERI, A. et al. Impact of pretransplant minimal residual disease after cord blood transplantation for childhood acute lymphoblastic leukemia in remission: An Eurocord, PDWP-EBMT analysis. **Leukemia**, v. 26, n. 12, p. 2455–2461, 2012.

RYAN, J. et al. Minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukaemia patients at multiple time-points reveals high levels of concordance between molecular and immunophenotypic approaches. **British Journal of Haematology**, 2009.

SADOVNIK, I. et al. Evaluation of Cell Surface Markers and Targets in Leukemic Stem Cells (LSC) Reveals Distinct Expression Profiles, Unique Drug Effects, and Specific Checkpoint Regulation in AML LSC and CML LSC. **Blood**, v. 128, n. 22, p. 4234–4234, 2 dez. 2016.

SCHULTZ, K. R. et al. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: A combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). **Blood**, v. 109, n. 3, p. 926–935, 2007.

SCHUURHUIS, G. J. et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. **Blood**, v. 131, n. 12, p. 1275–1291, 2018.

SEDEK, Ł. et al. 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. **Journal of Immunological Methods**, v. 475, 2019.

SHAH, N. N. et al. Feasibility of treating post-transplantation minimal residual disease in children with acute leukemia. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 20, n. 7, p. 1000–1007, 2014.

SHEN, Z. et al. Influence of pre-transplant minimal residual disease on prognosis after Allo-SCT for patients with acute lymphoblastic leukemia: Systematic review and meta-analysis. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, 2018.

SHI, T. et al. Distinct outcomes, ABL1 mutation profile, and transcriptome features between p190 and p210 transcripts in adult Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia in the TKI era. **Experimental Hematology and Oncology**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2022.

SHIBA, N. Comprehensive molecular understanding of pediatric acute myeloid leukemia. **International Journal of Hematology**, v. 117, n. 2, 2023.

SHOOK, D. et al. **Minimal residual disease quantitation in acute myeloid leukemia. Clinical lymphoma & myeloma**, 2009.

SHORT, N. J. et al. **Association of Measurable Residual Disease with Survival Outcomes in Patients with Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review and Meta-analysis. JAMA Oncology**, 2020. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/>>

SHUMILOV, E. et al. **Current status and trends in the diagnostics of AML and MDS. Blood Reviews**, 2018.

SIMIONE, A. J. et al. Current use and outcomes of hematopoietic stem cell transplantation: Brazilian summary slides - 2023. **JOURNAL OF BONE MARROW TRANSPLANTATION AND CELLULAR THERAPY**, v. 4, n. 2, p. 200, 2 jun. 2023.

SINGH, J. et al. Correlation between a 10-color flow cytometric measurable residual disease (<scp>MRD</scp>) analysis and molecular <scp>MRD</scp> in adult <scp>B-

acute lymphoblastic leukemia. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 102, n. 2, p. 115–122, 21 mar. 2022.

SOH, K. T. et al. Methodological considerations for the high sensitivity detection of multiple myeloma measurable residual disease. **Cytometry Part B - Clinical Cytometry**, v. 98, n. 2, p. 161–173, 2020.

SPYRIDONIDIS, A. How I treat measurable (minimal) residual disease in acute leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation. **Blood**, v. 135, n. 19, p. 1639–1649, 7 maio 2020.

SROUR, S. A. et al. Haploidentical transplantation for acute myeloid leukemia patients with minimal/measurable residual disease at transplantation. **American Journal of Hematology**, v. 94, n. 12, p. 1382–1387, 2019.

STETLER-STEVENSON, M. et al. Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition. **Cytometry Part B - Clinical Cytometry**, v. 90, n. 1, p. 26–30, 2016.

SUN, W. et al. Chemotherapy plus DLI for relapse after haploidentical HSCT: the biological characteristics of relapse influences clinical outcomes of acute leukemia patients. **Bone Marrow Transplantation**, v. 54, n. 8, p. 1198–1207, 2019.

SVATON, M. et al. NGS better discriminates true MRD positivity for the risk stratification of childhood ALL treated on an MRD-based protocol. **Blood**, v. 141, n. 5, 2023.

SWERDLOW, S. H. et al. **The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms**. **Blood**, 2016.

SZCZEPARŃSKI, T. et al. Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor-B-ALL provides improved strategies for selection of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease. **Blood**, 2002.

TASIAN, S. K.; LOH, M. L.; HUNGER, S. P. Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia. 2017.

TEMBHARE, P. R. et al. A High-Sensitivity 10-Color Flow Cytometric Minimal Residual Disease Assay in B-Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma Can Easily Achieve the Sensitivity of 2-in-10⁶ and Is Superior to Standard Minimal Residual Disease Assay: A Study of 622 Patients. **Cytometry Part B - Clinical Cytometry**, v. 98, n. 1, p. 57–67, 1 jan. 2020.

TERWILLIGER, T.; ABDUL-HAY, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. **Blood cancer journal**, 2017.

TETTERO, J. M. et al. Technical Aspects of Flow Cytometry-based Measurable Residual Disease Quantification in Acute Myeloid Leukemia: Experience of the European LeukemiaNet MRD Working Party. **HemaSphere**, v. 6, n. 1, p. E676, 2022.

THEUNISSEN, P. et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. 2017a.

THEUNISSEN, P. et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 129, n. 3, p. 347–357, 19 jan. 2017b.

THEUNISSEN, P. M. J. et al. Detailed immunophenotyping of B-cell precursors in regenerating bone marrow of acute lymphoblastic leukaemia patients: implications for minimal residual disease detection. **British Journal of Haematology**, v. 178, n. 2, p. 257–266, 1 jul. 2017c.

THOL, F. et al. Measurable residual disease monitoring by ngs before allogeneic hematopoietic cell transplantation in AML. **Blood**, v. 132, n. 16, p. 1703–1713, 18 out. 2018.

THOMAS, D. A. et al. Treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia with hyper-CVAD and imatinib mesylate. **Blood**, v. 103, n. 12, p. 4396–4407, 2004.

VAN DER SLUIS, I. M. et al. Blinatumomab Added to Chemotherapy in Infant Lymphoblastic Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 388, n. 17, p. 1572–1581, 27 abr. 2023.

VAN DER VELDEN, V. H. J. et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: Guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. **Leukemia**, 2007.

VAN DONGEN, J. J. M. 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. Disponível em: <<http://www.stockton-press.co.uk/leu>>

VAN DONGEN, J. J. M. et al. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: Need for sensitive, fast, and standardized technologies. **Blood**, v. 125, n. 26, p. 3996–4009, 25 jun. 2015.

VAN DONGEN, J. J. M.; ORFAO, A. EuroFlow: Resetting leukemia and lymphoma immunophenotyping. Basis for companion diagnostics and personalized medicine. **Leukemia**, v. 26, n. 9, p. 1899–1907, 2012.

VAN WERING, E. R. et al. Regenerating normal B-cell precursors during and after treatment of acute lymphoblastic leukaemia: Implications for monitoring of minimal residual disease. **British Journal of Haematology**, v. 110, n. 1, p. 139–146, 2000.

VAN ZELM, M. C. et al. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 3, p. 645–655, 2007.

VERMA, D. et al. Chronic myeloid leukemia (CML) with P190BCR-ABL: Analysis of characteristics, outcomes, and prognostic significance. **Blood**, v. 114, n. 11, p. 2232–2235, 10 set. 2009.

VOLEJNIKOVA, J. et al. Minimal residual disease in peripheral blood at day 15 identifies a subgroup of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with superior prognosis. **Haematologica**, 2011.

WALTER, R. B. et al. Significance of minimal residual disease before myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for AML in first and second complete remission. **Blood**, v. 122, n. 10, p. 1813–1821, 5 set. 2013.

WANG, X. Y. et al. The Quantification of Minimal Residual Disease Pre- and Post-Unmanipulated Haploidentical Allograft by Multiparameter Flow Cytometry in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cytometry Part B - Clinical Cytometry**, v. 98, n. 1, p. 75–87, 1 jan. 2020.

WILLEMSE, M. J. et al. Detection of minimal residual disease identifies differences in treatment response between T-ALL and precursor B-ALL. **Blood**, 2002.

WOOD, B. et al. Prognostic Significance of ETP Phenotype and Minimal Residual Disease in T-ALL: A Children's Oncology Group Study. **Blood Journal**, 2023.

YAFOUR, N. et al. Acute lymphoblastic leukemia in developing countries: Management from the transplant indication (allo/auto) until post-transplant follow-up. Guidelines from the SFGM-TC. **Bulletin du Cancer**, v. 110, n. 2, p. S30–S38, 11 maio 2023.

ZEIJLEMAKER, W. et al. A simple one-tube assay for immunophenotypical quantification of leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 30, n. 2, p. 439–446, 1 fev. 2016.

ZEIJLEMAKER, W. et al. CD34+CD38– leukemic stem cell frequency to predict outcome in acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 33, n. 5, p. 1102–1112, 2019.

ZEISER, R.; BLAZAR, B. R. Acute Graft-versus-Host Disease — Biologic Process, Prevention, and Therapy. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 22, p. 2167–2179, 30 nov. 2017.

ZHANG, M. et al. Minimal residual disease at first achievement of complete remission predicts outcome in adult patients with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, 1 out. 2016.

ZHAO, X. et al. Comparative Analysis of Flow Cytometry and RQ-PCR for the Detection of Minimal Residual Disease in Philadelphia Chromosome-Positive Acute

Lymphoblastic Leukemia after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 24, n. 9, p. 1936–1943, 2018.

ZHOU, Y.; WOOD, B. L. **Methods of Detection of Measurable Residual Disease in AML. Current Hematologic Malignancy Reports**, 2017.

ZLOTNICKI, M.; HASTINGS, C. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Acute lymphoblastic leukemia. **The 5-Minute Pediatric Consult, 8th Edition**, 2023.

ZUNA, J. et al. Minimal residual disease in BCR::ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia: different significance in typical ALL and in CML-like disease. **Leukemia**, v. 36, n. 12, 2022.

ANEXO 1 – RELATÓRIO CEP DAS ATIVIDADES DO PROJETO PRONON

	UFPR - HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ -	
---	---	--

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DA DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA POR CITOMETRIA DE FLUXO DE ALTA SENSIBILIDADE EM PACIENTES COM LEUCEMIA AGUDA E SEU IMPACTO NO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS

Pesquisador: ANA PAULA DE AZAMBUJA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 84969718.0.0000.0096

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Parcial

Detalhe:

Justificativa: Relatório parcial do projeto 2 ESTUDO DA DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA POR

Data do Envio: 03/06/2019

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.547.098

Apresentação da Notificação:

Apresentação de relatório parcial do ESTUDO DA DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA POR CITOMETRIA DE FLUXO DE ALTA SENSIBILIDADE EM PACIENTES COM LEUCEMIA AGUDA E SEU IMPACTO NO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS

Objetivo da Notificação:

Apresentação de relatório de resultado parcial de pesquisa

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

não se aplica

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Os autores relatam atraso no projeto devido à burocracia envolvida por se tratar de um projeto

Endereço: Rua Gal. Camello, 181		CEP: 80.060-900
Bairro: Alto da Glória		
UF: PR	Município: CURITIBA	
Telefone: (41)3360-1041	Fax: (41)3360-1041	





UFPR - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DA DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA POR CITOMETRIA DE FLUXO DE ALTA SENSIBILIDADE EM PACIENTES COM LEUCEMIA AGUDA E SEU IMPACTO NO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS

Pesquisador: ANA PAULA DE AZAMBUJA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 84969718.0.0000.0098

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Parcial

Detalhe:

Justificativa: Relatório parcial do projeto 2 ESTUDO DA DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA POR

Data do Envio: 03/06/2019

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.547.098

Apresentação da Notificação:

Apresentação de relatório parcial do ESTUDO DA DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA POR CITOMETRIA DE FLUXO DE ALTA SENSIBILIDADE EM PACIENTES COM LEUCEMIA AGUDA E SEU IMPACTO NO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS

Objetivo da Notificação:

Apresentação de relatório de resultado parcial de pesquisa

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

não se aplica

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Os autores relatam atraso no projeto devido à burocracia envolvida por se tratar de um projeto

Endereço: Rua Gal. Camello, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br



submetido ao Ministério da Saúde no âmbito do Programa Nacional de Apoio à Atenção Oncológica (PRONON).

A data de início do projeto PRONON só pode ocorrer após a publicação do relatório de adequação do plano de trabalho no Diário Oficial da União. Esta adequação foi necessária devido às solicitações da GEP do HC-UFPR em 2018, em relação à necessidade de contrato de manutenção preventiva até o final do projeto e adequação de alguns itens que não seriam adquiridos de fato.

Houve atraso na compra dos equipamentos e reagentes uma vez que só após a aprovação do CEP em maio de 2018 foi possível o envio da documentação para o Ministério da Saúde. A publicação no DOU ocorreu no dia 29 de Outubro de 2018. Os equipamentos começaram a ser adquiridos no mês de novembro de 2018, sendo a chegada dos mesmos entre dezembro de 2019 e março de 2019, data da chegada do Citômetro de Fluxo. Este equipamento é essencial para o início do projeto, uma vez que as amostras serão processadas no mesmo. A instalação dele está foi realizada nos dias 20 a 22 de maio de 2019 e o treinamento da equipe em 29 a 31 de maio de 2019.

Portanto, observa-se um atraso de um ano para o início do projeto.

Os autores apresentam abaixo a Linha do tempo enviada para o PRONON em janeiro de 2019

Observação de linha do tempo de evolução do projeto no âmbito do Programa Nacional de Apoio à Oncologia (PRONON):

- Maio de 2018: Aprovação da Pesquisa pelo CEP e submissão do parecer ao PRONON;
- 04 de Julho 2018: foi feito o repasse do recurso da Conta Captação para Conta Movimentação;
- Desde Junho de 2018 foi dado início na atualização orçamentária para início de execução do projeto, em função do intervalo de tempo de 17 meses entre o orçamento original aprovado (Adequação de Janeiro 2017) e a liberação do recurso;
- Após atualização orçamentária, constatou-se a necessidade de adequação de valores de itens já aprovados. Então em 16 de julho de 2018, foi enviado ofício 119/2018 submetendo adequação de valores ao PRONON;
- 29 de outubro de 2018: recebemos o ofício 1037/2018 CPCN com o parecer técnico aprovando a adequação de valores dos equipamentos e material permanente resultando no valor final do projeto em R\$ 1.322.598,14.
- Após a aprovação da adequação de valores do projeto em novembro de 2018, foi dado início ao processo de aquisições dos materiais previstos, sendo que a entrega é feita de acordo com cada fornecedor.

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br



- Foi iniciada a aquisição pelos equipamentos/material permanente, tendo recebido o que havia de pronta entrega pelos fornecedores (Centrífuga de Bancada, Nobreak, Geladeira, Computador, Software de Análise Infinicyt) e pagamentos pelo regime de caixa.
- Já a aquisição do Citometro de Fluxo, o processo de aquisição teve início em novembro, mas a entrega e emissão de nota ficou para abril de 2019. A instalação do equipamento foi realizada em 20 de maio de 2019 e treinamento da equipe em 28 de maio de 2019.
- 03 de junho de 2019: reagentes estão em fase de compra / aquisição.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

não se aplica

Recomendações:

aprovação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação da Notificação. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Manter os documentos da pesquisa arquivados.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Parcial	RELATORIO_PARCIAL.doc	03/06/2019 22:36:54	ANA PAULA DE AZAMBUJA	Postado
Envio de Relatório Parcial	RELATORIO_PARCIAL.pdf	03/06/2019 22:37:01	ANA PAULA DE AZAMBUJA	Postado

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br

ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós Miriam Perlingeiro Beltrame, Ana Paula de Azambuja, Mariester Malvezzi, Carmem Maria Sales Bonfim, Vaneuza Araujo Moreira Funke, Julie Pimentel Justus, Noely Terezinha Silva, Yara Carolina Sluga, Elenilde Coutinho Nunes e Ricardo Pasquini, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando você, paciente com diagnóstico de leucemia aguda, a participar de um estudo intitulado

"ESTUDO DA DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA POR CITOMETRIA DE FLUXO DE ALTA SENSIBILIDADE EM LEUCEMIA AGUDA E SEU IMPACTO NO TRANSPLANTE DE CELULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS".

Esta pesquisa será importante para avaliar a presença de células da leucemia que ainda sobram no seu organismo (doença residual mínima) após a quimioterapia de indução e antes / depois do transplante.

O objetivo desta pesquisa é avaliar se a presença dessas poucas células da doença no final da quimioterapia e antes / depois do transplante, poderia influenciar na resposta aos tratamentos.

Caso você participe da pesquisa, será necessário coletar a medula óssea após a quimioterapia, entre 10 a 15 dias antes do transplante, e nos dias 30, 60, 90 e 180 pós transplante, para análise da doença residual mínima. Nenhuma dessas coletas acarretará riscos desnecessários, já que a medula a ser coletada faz parte do protocolo normal dos exames de rotina do acompanhamento da sua leucemia no CHC-UFPR.

Para tanto você deverá comparecer no ambulatório do Hospital de Clínicas para as consultas já rotineiras no serviço de hematologia e transplante.

É possível que você experimente algum desconforto, como dor, principalmente relacionado à coleta da medula óssea, que será realizada com anestesia local pelo seu médico assistente.

Alguns riscos podem relacionados ao estudo podem ser: dor local, sangramento, edema (muito raros).

Os benefícios esperados com essa pesquisa são que a avaliação da presença ou ausência de células da doença na sua medula óssea (doença residual mínima), permitirá que o médico assistente decida algumas condutas terapêuticas e tenha uma previsão mais realista da resposta ao tratamento. No entanto, nem sempre você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.

Os pesquisadores Miriam Perlingeiro Beltrame, coordenadora, e Ana Paula de Azambuja, pesquisadora, responsáveis por este estudo poderão ser contatados no Laboratório de Imunofenotipagem do Hospital de Clínicas, na Rua Padre Camargo, 280, ou nos telefones – Dra Miriam Perlingeiro Beltrame - (41) 3360 7998 e (41) 999339066, email:

Rubricas:
Participante da Pesquisa e /ou responsável legal
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE



mbeltrame@ufpr.br e mpbeltrame@yahoo.com.br, e Dra Ana Paula de Azambuja, - (41) 3360-7998 e (41) 996051249 email: apazamb@ufpr.br e ana.azambuja@hc.ufpr.br, para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – CEP/HC/UFPR pelo Telefone 3360-1041. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimentos científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção de seu atendimento e/ou tratamento, que está assegurado.

As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas como os médicos dos serviços de hematologia do CHC. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.

As despesas necessárias para a realização da pesquisa não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você terá a garantia de que problemas como dor no local da punção, decorrentes do estudo serão tratados no ambulatório do Serviço de Transplante de medula óssea.

Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu _____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento. Eu fui informado que serei atendido sem custos para mim se eu apresentar algum problema.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

(Nome e Assinatura do participante da pesquisa ou responsável legal)
Local e data

Declaro que oblique de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante ou representante legal para a participação neste estudo.

(Nome e Assinatura do Pesquisador ou quem aplicou o TCLE)
Local e data

Rubricas:
Participante da Pesquisa e /ou responsável legal
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE

ANEXO 3 – TERMO DE ASSENTIMENTO



TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: ESTUDO DA DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA POR CITOMETRIA DE FLUXO DE ALTA SENSIBILIDADE EM LEUCEMIA AGUDA E SEU IMPACTO NO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

Investigadores: Miriam Perlingeiro Beltrame (coordenadora) e Ana Paula de Azambuja (pesquisadora principal), ~~Maricster~~ Malvezzi, Carmen Maria Sales Bonfim, Vaneuza Araújo Moreira Finkbe, Jolite Pimentel Justus, Noely Terezinha Silva, Yara Carolina Sluga, Elienilde Coutinho Nunes e Ricardo Pasquini, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná.

Local da Pesquisa: Laboratório de Imunofenotipagem do Hospital de Clínicas da UFPR

Endereço: Rua Padre Camargo, 280, primeiro andar.

O que significa assentimento?

O assentimento significa que você concorda em fazer parte de um grupo de adolescentes, da sua faixa de idade, para participar de uma pesquisa. Serão respeitados seus direitos e você receberá todas as informações por mais simples que possam parecer.

Pode ser que este documento denominado **TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** contenha palavras que você não entenda. Por favor, peça ao responsável pela pesquisa ou à equipe do estudo para explicar qualquer palavra ou informação que você não entenda claramente.

Informação ao Participante: o que é uma pesquisa?

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa, com o objetivo de avaliar se a presença de poucas células da doença antes do transplante ~~poderão~~ influenciar na resposta ao transplante.

Esta pesquisa será feita através da avaliação das células da medula óssea imediatamente antes do transplante, e depois nos dias 30, 60 e 180 após o transplante, com o objetivo de saber se a presença de células anormais poderia prejudicar a evolução. Como benefícios esperamos que nos casos com pouca ou nenhuma célula anormal pré transplante, a sobrevida seja muito maior.

Para tanto você deverá ~~comparar no~~ acompanhar no ambulatório do HC para as consultas rotineiras pós transplante, por aproximadamente 1 ano após o transplante.

E possível que você experimente algum desconforto, principalmente relacionado a coleta da medula óssea, que será realizada com anestesia local pelo seu médico assistente.

Rubricas:
Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCIE _____

1



Alguns riscos podem relacionados ao estudo podem ser: dor local, sangramento, edema.

Os benefícios esperados com essa pesquisa são que a avaliação da presença ou ausência de doença na medula antes e após o transplante permitirá que o médico assistente decida algumas condutas terapêuticas e tenha uma previsão mais realista da resposta ao transplante. No entanto, nem sempre você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.

Se você ou os responsáveis por você tiver(em) dúvidas com relação ao estudo, direitos do participante, ou no caso de riscos relacionados ao estudo, você deve contatar os pesquisadores Miriam Perlingeiro Beltrame, coordenadora, e Ana Paula de Azambuja, aluna de doutorado, responsáveis por este estudo poderão ser contatados no Laboratório de Imunofenotipagem do Hospital de Clínicas, na Rua Padre Camargo, 280, ou nos telefones – Dra Miriam Perlingeiro Beltrame - (41) 3360 7998 e (41) 999339066, email: mbeltrame@ufpr.br e miriam.beltrame@hc.ufpr.br, e Dra Ana Paula de Azambuja, - (41) 3360 7998 e (41) 996051249, email: apazamb@gmail.com e ana.azambuja@hc.ufpr.br, para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrar o estudo.

Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – CEP/HC/UFPR pelo Telefone 3360-1041. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção de seu atendimento e/ou tratamento, que está assegurado.

As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas como os médicos do serviço de Transplante de medula óssea. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.

As despesas necessárias para a realização da pesquisa não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você terá a garantia de que problemas como dor no local da punção, decorrentes do estudo serão tratados no ambulatório do Serviço de Transplante de medula óssea.

Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Rubricas:
Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCIE _____

2

ANEXO 4 – PROTOCOLO DE MARCAÇÃO DE ANTICORPOS E LISE CELULAR / “BULKY-LYSE”

- i. Diluir 1mL de medula óssea em 14mL de solução de cloreto de amônio durante 30 minutos. Centrifugar a 2.000 rpm por 5 minutos e retirar o sobrenadante com pipeta de Pasteur.
- ii. Lavar a suspensão celular com tampão salino (PBS pH 7,4) / Soro Bovino Fetal (SBF) a 0,5% e ressuspender em 300µL (ou volume maior de mais que 3 tubos) de tampão salino (PBS pH 7,4) / SBF a 0,5%.
- iii. Dividir a amostra processada em 3 alíquotas de 100µL (ou mais se necessário) e incubar com os anticorpos monoclonais do painel linhagem específico, por 30 minutos à temperatura ambiente (TA) e protegido da luz.
- iv. Realizar a lise das hemácias remanescentes com 2mL de lisante comercial (FACS Lysing, BD Bioscience), homogeneizar, incubar a TA, por 10 minutos. Centrifugar a 2.000 rpm por 5 minutos. Lavar uma vez com 2 mL de tampão salino (PBS pH 7,4).
- v. Ressuspender o botão celular (pellet) em 2mL de tampão salino (PBS pH 7,4). O volume final será variável de acordo com a celularidade final, para que a velocidade de aquisição seja em torno de 2.000 células/segundo.
- vi. Pipetar os anticorpos monoclonais conforme painel sugerido na Tabela 4. O volume dos anticorpos foi o estipulado na literatura, titulados conforme protocolo do serviço.
- vii. Homogeneizar e incubar a amostra com os respectivos AcMo por 20 min, a temperatura ambiente e protegido da luz. Após acrescentar 500 uL de SSI e centrifugar 1500 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante descartado. Após adição de 500 uL de solução salina as amostras foram enviadas para aquisição no citômetro de fluxo.

ANEXO 5 – TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSO

Foram realizadas publicações científicas em congressos da área de hematologia e transplante de medula óssea, com premiação e apresentação oral em duas oportunidades. Os resumos destes trabalhos estão no ANEXO 5.

(A) "VALIDATION OF A SINGLE 10-COLOR FLOW CYTOMETRY TUBE TO DETECT MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN B CELL PRECURSOR ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUCEMIA" - resumo apresentado como poster online no Congresso Internacional de Hematologia Laboratorial, da International Society for Laboratory Hematology (ISLH), ocorrido em Bolognha na Itália em formato híbrido, em setembro de 2022. Este resumo foi premiado com Berend Houwen Travel Award for the ISLH 2022 meeting".

(B) FLOW CYTOMETRY MINIMAL RESIDUAL DISEASE IMPACT IN HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANT FOR ACUTE LYMPHOBLASTIC AND MYELOBLASTIC LEUKEMIAS – A PROSPECTIVE SINGLE CENTER ANALYSIS. Apresentação oral no congresso Brasileiro de Transplante de Medula Óssea da SBTMO, em agosto de 2022.

(C) IMPLANTAÇÃO DA PESQUISA DE DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA POR CITOMETRIA DE FLUXO DE ALTA SENSIBILIDADE NAS LEUCEMIAS AGUDAS EM UM CENTRO ÚNICO NO BRASIL. Apresentação oral no Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, da ABHH, chamado HEMO 2022, em outubro de 2022.

(D) ANALYSIS OF B-LYMPHOCYTE MATURATION KINETICS WITH A 10-COLOR BCP-ALL MINIMAL RESIDUAL DISEASE TUBE BY FLOW CYTOMETRY: A COMPARISON OF REGENERATING BONE MARROW BEFORE AND AFTER HEMATOPOIETIC STEM CELL MARROW TRANSPLANTATION. Apresentação oral no Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, da ABHH, chamado HEMO 2022, em outubro de 2022;

(E) "ANALYSIS OF B-CELL RECOVERY KINETIC AND BONE MARROW MICROENVIRONMENT USING A FLOW CYTOMETRY SINGLE TUBE TO DETECT MINIMAL RESIDUAL DISEASE (MRD) IN ACUTE LEUKEMIA: COMPARISON OF REGENERATING BONE MARROW BEFORE AND AFTER HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION" apresentado como poster online no Congresso Internacional de Hematologia Laboratorial, da ISLH, ocorrido em Valencia na Espanha em formato híbrido, em setembro de 2023.

(F) "PHILADELPHIA ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA (PH+ALL) OR BLASTIC CRISIS OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA (CML-BC)?" apresentado como apresentação oral online no Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, HEMO 2024, em outubro de 2024.