



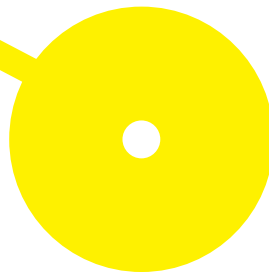
MESTRADO

Análises Clínicas e Saúde Pública

Estudo do quimerismo das células CD34⁺, no *follow-up* do transplante alógeno de células estaminais em leucemias agudas: Revisão Sistemática

Joana Leonor Pinho de Almeida

09/2023





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**

Estudo do quimerismo das células CD34⁺, no follow-up do transplante alogénico de células estaminais em leucemias agudas: Revisão Sistemática

Autor

Joana Leonor Pinho de Almeida

Orientador

Carla Susana Pessequeiro Serra^{1,2}, Professor adjunto

¹Escola Superior de Saúde do Porto, Instituto Politécnico do Porto,

²Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia FG, EPE – Porto (IPO-PORTO)

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Área de Especialização em Imunohemoterapia e Transplantação pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

Começo por um especial agradecimento à Professora Manuela Amorim, pela disponibilidade, acompanhamento, dedicação e apoio que demonstrou, desde o início do mestrado até agora.

Também a todos os professores, em particular à Professora Carla Serra, minha orientadora, por toda a aprendizagem enriquecedora que me proporcionou. Gostaria também de agradecer por toda a disponibilidade, pela total colaboração no solucionar de dúvidas e problemas que foram surgindo ao longo da realização deste trabalho, por todo o apoio e palavras de incentivo que me deu, por todas as opiniões e críticas construtivas. Sem dúvida, a minha orientadora foi um elemento fundamental para a realização deste trabalho. O meu sincero e enorme obrigada.

A todos os meus amigos e família, em especial à minha Dona Fernanda, pela paciência, carinho, apoio incondicional e por acreditar sempre em mim.

E a todos os que de alguma forma tornaram possível esta concretização.

Agradeço-vos de coração.

Resumo

Introdução: O alo-HSCT é considerado uma abordagem terapêutica altamente curativa para doentes com leucemias agudas. No entanto, sendo a recidiva e consequente progressão da doença a principal complicação, é necessário implementar estratégias de monitorização que sejam eficazes na sua antecipação. A avaliação do quimerismo, fornece informação acerca da efetivação/rejeição do enxerto, funcionando como excelente fator de prognóstico.

Objetivo: Verificar a importância do estudo das células CD34⁺, no *follow-up* do alo-HSCT nas leucemias agudas face a outros marcadores.

Metodologia: Revisão sistemática de acordo com as diretrizes PRISMA. Recolha dos artigos efetuada em diferentes bases de dados, inclusão de estudos de coorte, caso-controlo e ensaio clínico randomizado, sem limite temporal de publicação. Análise metodológica avaliada pelas Escalas *Newcastle Ottawa* e *Jadad*.

Resultados: Da totalidade de 440 artigos estudados, foram incluídos 16. A maioria dos estudos obtiveram resultados pertinentes, na análise do quimerismo das células CD34⁺, visto que, este foi altamente preditivo de recidiva, face aos outros marcadores.

Conclusão: A análise do quimerismo das células CD34⁺ apresentou maior sensibilidade face ao quimerismo convencional, na deteção de recidiva. Mostrou ser uma abordagem viável e sensível na avaliação da eficácia do transplante e prognóstico da patologia, permitindo monitorizar a recidiva após alo-HSCT.

Palavras-Chave: Alo-HSCT, leucemias agudas, células estaminais CD34⁺ e quimerismo.

Abstract

Introduction: Allo-HSCT is considered a highly curative therapeutic approach for patients with acute leukemias. However, since relapse and consequent progression of the disease is the main complication, it is necessary to implement monitoring strategies that are effective in their anticipation. The evaluation of chimerism provides information about the effectiveness/rejection of the engraftment, functioning as an excellent prognostic factor.

Objective: To verify the importance of studying CD34⁺ cells in the follow-up of allo-HSCT in acute leukemias compared to other markers.

Methodology: Systematic review according to PRISMA guidelines. Collection of articles carried out in different databases, inclusion of cohort studies, case-control, and randomized clinical trial, without a time limit. The methodological analysis was evaluated by the Newcastle Ottawa and Jadad Scales.

Results: Out of the total 440 articles studied, 16 were included. Most of the studies obtained relevant results in the analysis of the chimerism of CD34⁺ cells, since this was highly predictive of relapse, compared to other markers.

Conclusion: The analysis of chimerism of CD34⁺ cells showed greater sensitivity compared to conventional chimerism in the detection of relapse and it showed to be a viable and sensitive approach in evaluating the efficacy of the transplant and the prognosis of the pathology, allowing the monitoring of relapse after allo-HSCT.

Keywords: Allo-HSCT, acute leukemias, CD34⁺ stem cells, and chimerism.

Índice

1.	Introdução.....	1
1.1.	Neoplasias Hematológicas.....	2
1.2.	Hematopoiese.....	3
1.3.	Leucemias Agudas.....	5
1.3.1.	Classificação da OMS.....	6
1.3.2.	Diagnóstico.....	10
1.4.	Transplante Alogénico de Células Estaminais Hematopoiéticas.....	12
1.5.	Citometria de Fluxo e <i>Cellsorting</i>	13
1.6.	Quimerismo.....	17
2.	Metodologia.....	20
2.1.	Tipo de Estudo.....	20
2.2.	Fontes de Informação e Estratégia de Pesquisa.....	20
2.3.	Critérios de Elegibilidade.....	20
2.4.	Avaliação da Qualidade Metodológica.....	21
2.5.	Extração dos Dados dos Estudos.....	21
3.	Resultados.....	22
3.1.	População.....	30
3.2.	Protocolo.....	30
3.3.	Parâmetros avaliados e a sua forma de avaliar.....	31
3.4.	Principais resultados.....	31
4.	Discussão.....	32
5.	Conclusão.....	39
6.	Referências Bibliográficas.....	40

Índice de Abreviaturas e Acrónimos

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

Alo-HSCT – Transplante Alogénico de Células Estaminais Hematopoiéticas (do inglês *Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation*)

DRM – Doença Residual Mínima

FAB – Classificação Francesa Americana Britânica

FACS – Classificador de Células Ativadas por Fluorescência (do inglês *Fluorescence Activated Cell Sorter*)

G-CSF – Fator Estimulador de Colónias de Granulócitos (do inglês *Granulocyte Colony Stimulating Factor*)

LLB/T – Leucemia Linfoblástica do tipo B/T

LMA – Leucemia Mieloblástica Aguda

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – Reação Polimerase em Cadeia (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

PRISMA – *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis*

SMD – Síndrome Mielodisplásica

STR – Repetição Curta em Tandem (do inglês *Short Tandem Repeats*)

Índice de Figuras

Figura 1- Representação esquemática da diferenciação das células sanguíneas.....	5
Figura 2 – Estratégia para a quantificação das células CD34 ⁺ , de acordo com as recomendações da ISHAGE (Sociedade Internacional de Hemoterapia e Engenharia de Enxertos).....	15
Figura 3 – Representação esquemática da técnica FACS.....	16
Figura 4 – Fluxograma para a seleção dos artigos a incluir no estudo.....	24

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Classificação da OMS para as LLB/T	8
Tabela 2 – Classificação da OMS para as LMA.....	9
Tabela 3 –Tipos de marcadores expressos no painel de anticorpos do EuroFlow Consortium..	12
Tabela 4–Classificação dos tipos de quimerismo.....	19
Tabela 5 – Avaliação do risco de viés pela Escala de Newcastle Ottawa	23
Tabela 6 – Avaliação do risco de viés pela Escala de Jadad.....	23
Tabela 7 – Descrição de todos os estudos incluídos nesta revisão	25

1. Introdução

Atualmente, o cancro é considerado a segunda causa de morte nos países desenvolvidos, sendo considerado um problema de saúde a nível mundial. Segundo os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que em 2020 tenham ocorrido, mundialmente, cerca de 474 519 novos casos de cancro, associados a cerca de 311 594 mortes e, tendencialmente estes números estarão em ascensão nas próximas décadas. Desta forma, perante estes dados em 2020, a nível mundial, a percentagem de novos casos e mortes por leucemia, relativamente aos outros carcinomas, foi cerca de 2,5% e 3,1%, respetivamente. (1,2)

Relativamente a Portugal, de acordo com os dados epidemiológicos da OMS, em 2020 registaram-se cerca de 1 547 novos casos de leucemias, associados a 969 mortes, num total populacional de 10 196 707 milhões de habitantes. Estes valores indicam que nesse ano, em Portugal, a percentagem de novos casos e mortes por leucemia, relativamente aos outros carcinomas, foi cerca de 2,6% e 3,2%, respetivamente. Estima-se que em 2040, a incidência atinja os 1 884 novos casos e cerca de 1 265 mortes, num total populacional de 9 558 276 milhões de pessoas. Assim sendo, prevê-se um aumento de 21,8% novos casos e 30,5% mortes, em relação ao ano de 2020. Desta forma, constata-se a emergência de elaboração de estratégias que promovam o diagnóstico antecipado e o correto *follow-up* destas patologias. (3–5)

As leucemias agudas resultam da transformação maligna e proliferação descontrolada de uma célula precursora hematopoiética estaminal. Consequentemente, a acumulação destas células imaturas na medula óssea e em outros órgãos, terá como consequência a supressão da produção das células sanguíneas normais e o imunocomprometimento dos indivíduos, resultante da pancitopenia. Atualmente, o transplante alogénico de células estaminais hematopoiéticas (Alo-HSCT) é considerado uma abordagem terapêutica altamente curativa para estes doentes. Contudo, podem ocorrer diversas complicações no período após o transplante, como a recidiva e a progressão da doença, que poderão originar prognósticos clinicamente incertos. Desta forma, dada a natureza biológica agressiva, associada à ambiguidade do prognóstico, apesar do estabelecimento de terapias ideais ao tratamento, é necessário a implementação de estratégias de monitorização que sejam mais eficazes na antecipação das recidivas, após a realização do transplante. Assim, os biomarcadores de monitorização devem ser reprodutíveis, altamente sensíveis e específicos na identificação da recidiva da doença. (6–14)

Atualmente, a avaliação do quimerismo é considerada como um biomarcador extremamente importante dada a sua especificidade. A análise do quimerismo, que quantifica os níveis relativos

à hematopoiese após alo-HSCT, representa, assim, uma ferramenta crucial na recorrência da patologia, especialmente em indivíduos com leucemias sem características citogenéticas, moleculares ou imunofenotípicas específicas (15,16).

Importante referir que, a hematopoiese do dador e recetor pode existir simultaneamente, sendo possível haver alterações na percentagem de células. No entanto, a persistência ou o reaparecimento de células do recetor após o transplante pode indicar a presença de células malignas, a recorrência das células do recetor ou uma combinação de ambas. A análise do quimerismo funciona como um fator de prognóstico, pois fornece informação acerca da alo-reatividade ou da rejeição do enxerto. (17–24)

Desta forma, após a realização do transplante alogénico, a análise do quimerismo é uma ferramenta valiosa para a sua monitorização, permitindo também orientar para intervenções preventivas. Contudo, a monitorização de uma linhagem celular específica aumenta a sua sensibilidade e especificidade, uma vez que, permite o estudo de um ou mais subconjuntos de células. Assim, a sua determinação pode ser efetuada nas diferentes células hematopoiéticas, no entanto, apesar de serem vários os marcadores que se devem incluir, destaca-se o CD34⁺, marcador das células estaminais hematopoiéticas, correspondente às células infundidas no transplante e responsáveis pela hematopoiese. (20,23–28)

Desta forma, sendo as células estaminais hematopoiéticas as responsáveis pela hematopoiese, pode-se concluir que estas fornecem uma informação valiosa acerca do enxerto. Além disso, mostram que a sua análise permite uma maior sensibilidade na deteção de recidivas face a outros marcadores, como por exemplo, o marcador das células B, células T, monócitos e granulócitos. (26–32)

Assim sendo, ao longo do presente trabalho pretende-se aferir quanto à vantagem do estudo do quimerismo das células CD34⁺ face aos outros marcadores vulgarmente estudados, explorando aspetos importantes através da revisão sistemática de diversos artigos.

1.1. Neoplasias Hematológicas

As neoplasias hematológicas são um grupo heterogéneo de patologias, com origem numa única célula sanguínea, a qual sofreu uma ou mais mutações genéticas. Dentro deste grupo de neoplasias destacam-se as leucemias, os linfomas e os mielomas. Devido à sua capacidade de escape ao controlo de fatores responsáveis pela regulação da proliferação e maturação, as neoplasias são caracterizadas pela sua divisão celular descontrolada, potencial replicativo

ilimitado, fuga à apoptose, capacidade de invasão tecidual e a metastização. Em 2000, foram enumeradas seis características fundamentais para o desenvolvimento tumoral humano, propostas por *Douglas Hanahan* e *Robert Weinberg*, as quais estão presentes nas células tumorais e permitem o seu desenvolvimento e progressão. Desta forma, destaca-se a proliferação crónica sustentada, a evasão à supressão do crescimento, a evasão à morte celular programada (apoptose), a capacidade de imortalidade replicativa, a indução da angiogénese, a ativação da invasão e metastização. Em 2011, foram acrescentados novos elementos: a desregulação energética celular e a evasão à destruição imune, bem como duas características facilitadoras, a instabilidade genómica e mutação e a inflamação promotora do tumor. (17,33–37)

As neoplasias resultam da acumulação de variações genéticas prejudiciais no genoma e isso deve-se à existência de mutações em proto oncogenes, genes supressores tumorais, genes envolvidos na regulação da apoptose ou na reparação do ácido desoxirribonucleico (ADN). Estas alterações resultam da interação entre fatores genéticos (não modificáveis) e fatores ambientais (modificáveis). Relativamente aos fatores genéticos salienta-se a idade, o género, as características genéticas, os antecedentes reprodutivos e hormonais, entre outros. Estes fatores são fundamentais para se identificar pessoas de alto risco. No que concerne aos fatores ambientais, salienta-se a exposição à radiação ionizante, ultravioleta e eletromagnética, infeções provocadas por vírus, bactérias ou parasitas, o consumo de tabaco, álcool, sedentarismo, entre outros. Importante referir, que é possível ocorrer a invasão de tecidos circundantes ou metastização à distância, devido ao crescimento e proliferação descontrolados das células neoplásicas. (35,38)

1.2. Hematopoiese

A hematopoiese refere-se ao processo de produção, diferenciação e desenvolvimento das diferentes células sanguíneas. Os componentes celulares do sangue apresentam uma semi-vida relativamente curta, encontrando-se assim em constante renovação, nos órgãos hematopoiéticos: medula óssea, baço, timo e gânglios linfáticos. Durante as primeiras semanas de gestação, este processo inicia-se e o saco vitelino é o principal órgão hematopoiético. Entre os dois e sete meses de vida fetal, o fígado e o baço assumem o papel hematopoiético, começando a surgir os leucócitos e os megacariócitos em reduzida quantidade. Após o sétimo mês de gestação, a medula óssea torna-se o principal órgão hematopoiético, sendo que, durante a

infância este processo decorre em quase todos os ossos e, na vida adulta, decorre apenas nas epífises dos ossos longos e no esqueleto axial. (29,39)

As células estaminais hematopoiéticas são as responsáveis pela hematopoiese, as quais apresentam uma grande capacidade de autorrenovação, proliferação e diferenciação, ocupando o topo do sistema hematopoiético normal. Através do processo de diferenciação, estas células dão origem às células estaminais multipotentes (células progenitoras precoces da linhagem linfóide e mieloide), com um potencial de diferenciação mais restrito. Estes primeiros progenitores darão origem a progenitores com uma capacidade ainda mais limitada de diferenciação. Sendo através destes, que surgem as células precursoras morfológicamente reconhecíveis (mieloblastos e linfoblastos), os quais irão dar origem às diferentes células maduras, nomeadamente: eritrócitos, plaquetas, linfócitos B, linfócitos T, monócitos, eosinófilos, neutrófilos, basófilos e células *natural killer*. Estas células estão representadas na figura 1 (página 5), evidenciando todo o processo hematopoiético descrito anteriormente. (29–32)

Assim, as células estaminais hematopoiéticas, devido à sua aptidão extraordinária de autorrenovação, proliferação e diferenciação sendo capazes de produzir, diariamente, cerca de um trilhão de células sanguíneas, são amplamente utilizadas no tratamento de neoplasias hematológicas, podendo ser obtidas através da medula óssea, do sangue periférico ou do sangue do cordão umbilical. (40–43)

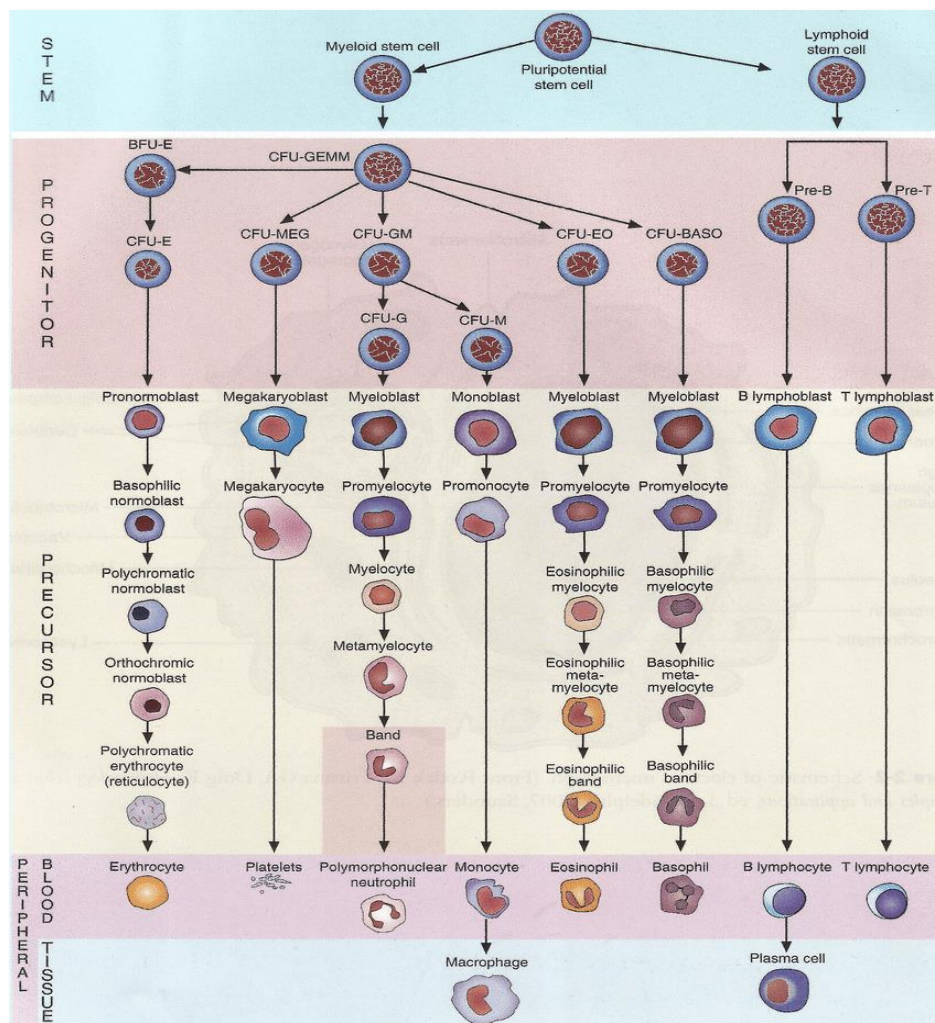


Figura 1– Representação esquemática da diferenciação das células sanguíneas.

Fonte: Hematopoiesis: Types of Haematopoietic Stem Cells, Process and Regulation, 2020. (44)

1.3. Leucemias Agudas

As leucemias agudas advêm da transformação maligna e proliferação descontrolada de uma célula precursora hematopoiética estaminal, levando a uma acumulação de células linfoblásticas ou mieloblásticas imaturas (blastos) na medula óssea e em outros órgãos. Conseqüentemente, a resposta será a supressão da produção das células sanguíneas normais, originando uma pancitopenia e, desta forma, um imunocomprometimento dos doentes. Quando não acompanhada, a leucemia aguda é rapidamente fatal, por isso torna-se fundamental a rápida e adequada intervenção terapêutica após o diagnóstico.(6,11,13,14,45)

As leucemias linfoblástica e mieloblástica apresentam diferentes alterações genéticas, morfologia e imunofenótipos, devido à sua grande diversidade. E, embora a maioria dos casos surja em indivíduos saudáveis, existem diversos fatores de risco que contribuem para o aumento

da sua incidência, nomeadamente a suscetibilidade genética, a exposição à radiação ionizante, a produtos químicos e drogas e a presença de vírus oncogénicos. Além disso, tratamentos de quimioterapia e radioterapia utilizados no tratamento de doenças hematológicas prévias, também podem contribuir para o seu desenvolvimento. (13,14,46)

Relativamente à sua classificação, em 2016 a OMS procedeu à sua revisão, onde foram incluídos novos critérios de classificação quanto às características clínicas, moleculares, morfologia, imunofenótipo e prognóstico na classificação das neoplasias hematopoiéticas e dos tecidos linfoides, de acordo com o consentimento de opinião entre hematopatologistas, hematologistas, oncologistas e geneticistas. Desta forma, para se estabelecer o diagnóstico, além de estudos morfológicos, que indicam a percentagem de células blásticas, são necessários outros exames laboratoriais para a sua confirmação, nomeadamente a história clínica, a imunofenotipagem, estudos moleculares e de citogenética. (47–50)

1.3.1. Classificação da OMS

Segundo a revisão da OMS em 2016, a nível morfológico, as leucemias linfoblásticas agudas do tipo B/T (LLB/T) caracterizam-se pela presença de pelo menos 20% de blastos linfoides na medula óssea ou no sangue periférico. Em relação às leucemias mieloblásticas agudas (LMA), estas caracterizam-se pela presença de pelo menos: 20% de blastos mielóides na medula óssea ou no sangue periférico; 50% de células eritróides e 20% de blastos na medula óssea; 80% de células eritroides precursoras na medula óssea; evidência de um sarcoma granulocítico; ou a presença de alguma alteração citogenética recorrente. Assim, a determinação do subtipo de leucemia revela-se fundamental, pois a sua classificação vai contribuir para um melhor planeamento do tratamento. (47,48,51,52)

Relativamente às leucemias de origem linfoblástica, a OMS instituiu que estas devem ser classificadas como linfóides, agrupando assim as leucemias agudas e o linfoma linfoblástico de linhagem B ou T. A distinção entre leucemia e linfoma geralmente é baseada no grau de envolvimento da medula óssea e/ou sangue periférico. Assim, a presença de linfoblastos na medula óssea ou sangue periférico superior ou igual a 20% é indicativo de leucemia. No entanto, se o envolvimento for predominantemente tecidual e a percentagem de linfoblastos for inferior a 20% na medula óssea, é designado de linfoma. A LLB é o subtipo mais comum, representando cerca de 75% dos casos adultos de leucemias agudas, enquanto a linhagem T representa apenas 25%. No entanto, a maioria dos linfomas tem origem em células T. (47,48,51,53)

A OMS efetua o agrupamento das leucemias de origem mielóide da seguinte forma: LMA com alterações genéticas recorrentes, LMA associadas a alterações mielodisplásicas, sarcoma mielóide, síndromes de proliferação mielóides associadas à síndrome de Down e LMA sem outra especificação (incluindo aqui as leucemias da classificação Francesa Americana Britânica (FAB)), reconhecendo ainda a leucemia basofílica aguda e a panmielose aguda com mielofibrose). (47,48,51,53)

Contudo, também existe a classificação FAB, que se baseia no tipo de célula afetada e o seu grau de maturidade. Assim, a LLA é dividida em 3 subtipos: L1, quando apresenta blastos uniformes, cromatina condensada, citoplasma escasso com pouca granulação e os nucléolos impercetíveis ou ausentes; L2, perante a presença de linfoblastos maiores, cromatina mais heterogénea e nucléolos; L3, presença de blastos muito distintos, com nucléolos proeminentes e citoplasma basófilo. Em relação à LMA, esta é dividida em 8 subtipos: M0, M1, M2 e M3 associados a crescentes graus de maturação e diferenciação das células mieloblásticas; M4 e M5 associados à linhagem celular monocítica; M6 associado à linhagem celular eritrocítica e M7 associado à linhagem celular megacariocítica. No entanto, apesar de ser uma classificação mais antiga, comparativamente com a classificação da OMS, também é útil, podendo servir como um complemento (por exemplo, para auxiliar no diagnóstico das LMA sem outra especificação, em caso de dúvidas). (52,54–57)

Nas tabelas 1 e 2 (páginas 8 e 9, respetivamente) encontram-se descritos os dos diferentes tipos de LLB/T e LMA, segundo a classificação da OMS.

Tabela 1 – Classificação da OMS para as LLB/T (adaptado de Arber (2016); Luca (2021)).

Leucemias Linfoides Agudas	
Leucemia/Linfoma Linfoblástico(a) de células B	Leucemia/Linfoma Linfoblástico(a) de células T
Leucemia/Linfoma linfoblástico (a) B sem outra especificação (NOS)	Leucemia/Linfoma linfoblástico (a) de células T
Leucemia/Linfoma linfoblástico (a) de células B com alterações genéticas recorrentes	Entidade provisória: Leucemia linfoblástica das células precursoras T
Leucemia/Linfoma linfoblástico (a) de células B com t(9;22) (q34.1;q11.2); BCR-ABL1	Entidade provisória: Leucemia/Linfoma linfoblástico (a) das células <i>Natural Killer</i>
Leucemia/Linfoma linfoblástico (a) de células B com t(v;11q23.3); rearranjo KMT2A	
Leucemia/Linfoma linfoblástico (a) de células B com t(12;21)(p13.2;q22.1); ETV6-RUNX1	
Leucemia/Linfoma linfoblástico (a) de células B com heperdiploidia	
Leucemia/Linfoma linfoblástico (a) de células B com hipodiploidia	
Leucemia/Linfoma linfoblástico (a) de células B com t(5;14) (q31.1;q32.3); IL3-IGH	
Leucemia/Linfoma linfoblástico (a) de células B com t(1;19) (q23;p13.3);TCF3-PBX1	
Entidade provisória: Leucemia/Linfoma linfoblástico (a) de células B, BCR-ABL1-like	
Entidade provisória: Leucemia/Linfoma linfoblástico (a) de células B com iAMP21	

Tabela 2 – Classificação da OMS para as LMA (adaptado de Arber et al (2016); Döhner et al (2017)).

Leucemias Mieloides Agudas
LMA com alterações genéticas recorrentes
• LMA com t(8;21)(q22;q22.1); mutação no gene RUNX1-RUNX1T1
• LMA com inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16) (p13.1;q22); mutação no gene CBFβ-MYH11
• LMA com t(9;11)(p21.3;q23.3); mutação no gene MLLT3-KMT2A
• LMA com t(6;9)(p23;q34.1); mutação no gene DEK-NUP214
• LMA com inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3) (q21.3;q26.2); mutação no gene GATA2, MECOM(EV11)
• LMA megacarioblástica com t(1;22)(p13.3;q13.3); mutação no gene RBM15-MKL1
• Leucemia Promielocítica Aguda com t(15;17); mutação no gene PML-RARA
• LMA com mutação no gene NPM1
• LMA com mutações bialélicas do CEBPA
• Entidade provisória: LMA com BCR-ABL1
• Entidade provisória: LMA com mutação RUNX1
LMA com alterações mielodisplásicas
Sarcoma mielóide
Síndromes de proliferação mielóides associadas à síndrome de Down
• Síndrome proliferativa transitória
• Leucemia mielóide associada à síndrome de Down
LMA, sem outra especificação (NOS)
• LMA sem diferenciação ou maturação
• LMA com maturação mínima
• LMA com maturação
• Leucemia mielomonocítica aguda
• Leucemia monoblástica/monocítica aguda
• Leucemia eritroide
• Leucemia megacarioblástica aguda
• Leucemia basofílica aguda
• Panmielose aguda com mielofibrose

1.3.2. Diagnóstico

O diagnóstico das leucemias agudas geralmente requer, a nível morfológico, a presença de pelo menos 20% de blastos linfóides ou mielóides na medula óssea ou sangue periférico; ou a presença de uma acumulação de blastos extramedular. Apesar da avaliação morfológica ser considerada critério de referência para definir a percentagem de células blásticas no diagnóstico e pós tratamento, são necessários outros exames laboratoriais para a confirmação do diagnóstico, sendo fundamental a determinação da linhagem e o estágio da diferenciação celular. Assim, para a sua confirmação, monitorização e avaliação de recidivas, para além dos estudos morfológicos, destacam-se a história clínica, a caracterização imunofenotípica, os estudos moleculares, a citogenética e a deteção da doença residual mínima (DRM). (11,49,50)

Algumas patologias requerem o conhecimento dos dados clínicos para o diagnóstico, os quais podem incluir informações sobre doenças e terapêuticas anteriores, a idade, a localização anatómica, a existência de doenças hereditárias presentes na família, entre outros. Relativamente à morfologia, muitas apresentam aspetos morfológicos característicos ou até mesmo diagnósticos e, por isso, torna-se fundamental a avaliação celular do sangue e medula óssea ao microscópio. Desta forma, consegue-se determinar o tipo de célula, a sua dimensão, forma, grau de maturação, entre outras características. A percentagem de blastos identificados é essencial, pois em condições normais estas células não estão presentes no sangue periférico e não mais de 5% na medula óssea. (11,47,49–51,58)

A imunofenotipagem por citometria de fluxo permite a identificação e caracterização das células neoplásicas, sendo considerado um critério chave para o diagnóstico, pois permite identificar a linhagem celular envolvida. Esta tecnologia permite uma análise multiparamétrica rápida, através do uso de anticorpos conjugados com fluorocromos que irão reconhecer epítópos dos antígenos celulares das amostras utilizadas (sangue periférico e/ou aspirados de medula óssea). Recentemente, o *EuroFlow Consortium* publicou painéis de anticorpos, constituídos por oito cores validados para a identificação e caracterização de células, adequados para imunofenotipagem no estabelecimento do diagnóstico de neoplasias hematológicas (tabela 3, página 12). Desta forma, para se estabelecer o diagnóstico das leucemias agudas recorre-se primeiramente a um painel de rastreio que contém marcadores imaturos e de linhagem, permitindo a classificação de células da linhagem B, linhagem T e da linhagem mielóide (tabela 3). De seguida, determina-se o grau de diferenciação e a fase de maturação dos blastos, através de um painel secundário de anticorpos. Relativamente às leucemias de origem linfóide, a

identificação da linhagem B envolve a expressão de marcadores específicos das células B e mesmo acontece para a identificação da linhagem T, com marcadores específicos de células T (tabela 3). No que concerne às leucemias de origem mieloide, a expressão dos marcadores também pode variar na presença de blastos mieloides mais diferenciados, LMA monocíticas, eritróides ou megacariocíticas (tabela 3). (11,47,49,50,53,59–61)

Além disso, é também comum a caracterização de mutações cromossômicas e genéticas que, para além de auxiliar o diagnóstico, permitem aferir quanto ao prognóstico e escolha do tratamento. (11,49,50)

A DRM deteta e quantifica a presença de células neoplásicas circulantes, o que pode indicar um maior risco de recidiva nos doentes, uma vez que, o clone neoplásico permanece detetável. O principal método para a sua deteção é a imunofenotipagem, permitindo assim a deteção da presença de antigénios presentes nas células neoplásicas do sangue periférico ou da medula óssea. Esta técnica é altamente sensível, permitindo a deteção de células neoplásicas a um nível de 1×10^{-3} , sendo que idealmente deve aproximar-se de 1×10^{-6} , o que corresponde a uma deteção de pelo menos uma célula neoplásica em 1 000 e 1 000 000 células normais, respetivamente. Perante o estado de remissão completa, a sua sensibilidade permite detetar valores inferiores a 0,01% de células neoplásicas. Assim, a avaliação da DRM é importante por vários motivos, pois para além de permitir a identificação precoce da recidiva após o transplante, permite a orientação do tratamento e confirmação do estado de remissão do doente. Contudo, devido à heterogeneidade de clones neoplásicos e à ausência de marcadores específicos, a avaliação da DRM fica limitada. Desta forma, o estudo do quimerismo e da DRM em conjunto permitirá potenciar o valor preditivo da recidiva, possibilitando assim criar a base da estratégia de uma imunoterapia individual preventiva na recorrência da doença. (62–68)

Tabela 3 –Tipos de marcadores expressos no painel de anticorpos do *EuroFlow Consortium* (Adaptado de Arber et al (2016); Bewersdorf et al (2020)).

Painel de Rastreio	Marcadores imaturos	CD34, TdT, HLA-DR
	Marcadores de linhagem B	CD19, CD79a, cCD22
	Marcadores de linhagem T	cCD3
	Marcadores de linhagem Mieloide	MPO
Painel Secundário	Marcadores específicos das células B	CD10, CD20, CD58, CD38
	Marcadores específicos de células T	CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, TCR
	LMA com blastos mieloides mais diferenciados	CD13, CD33, CD117, CD16, CD11b
	LMA monocíticas	CD14, CD15, CD36, CD4, CD300e
	LMA eritróides	CD36, CD71, CD105, CD235a
	LMA megacariocíticas	CD41, CD61, CD42

1.4. Transplante Alogénico de Células Estaminais Hematopoiéticas

O alo-HSCT é considerado uma abordagem terapêutica altamente curativa para as neoplasias hematológicas, com grande potencial de sobrevivência a longo prazo como terapia pós-remissão, quando a resposta a tratamentos anteriores não foi eficaz. (6,11,21,40)

Numa etapa inicial, é necessário selecionar um dador saudável e avaliar a sua compatibilidade com o doente, através da histocompatibilidade do sistema HLA. Após a realização do transplante, as células estaminais do dador entram em circulação e irão alojar-se na medula óssea, onde irão dar início à hematopoiese. No entanto, são diversos os fatores que podem influenciar o sucesso do transplante, nomeadamente, o tipo de patologia, o estágio da doença, a resposta a tratamentos anteriores, a biologia do tumor, o estado geral do doente, a presença de DRM ao transplante, bem como as opções do dador. De forma a prevenir a rejeição do transplante e a doença do enxerto contra o hospedeiro, existe um regime preparatório que antecede a infusão das células estaminais hematopoiéticas, denominando-se fase de condicionamento. Trata-se de uma terapia, cujo objetivo passa por erradicar as células neoplásicas existentes e promover a imunossupressão, no sentido de reduzir a atividade ou eficiência do sistema imunitário, através da eliminação de células imunitárias do doente que possam ser capazes de rejeitar as células transplantadas. Contudo, estas terapêuticas imunossupressoras aumentam o risco de infeções

nestes doentes e, quando isso se verifica, é habitual recorrer-se ao uso de fármacos para voltar a promover a produção de leucócitos, como o fator estimulador de colónias de granulócitos (G-CSF), assim como à administração de antibióticos, antivíricos, entre outros. (21,62–65,69–72)

Antigamente, os doentes eram submetidos a regimes de condicionamento mieloablativos, que tinham por base a combinação de tratamentos de quimioterapia e/ou radioterapia de maior intensidade, levando à destruição das células neoplásicas e também de todo o sistema hematopoiético do doente. No entanto, atualmente, considera-se que os regimes de intensidade reduzida são preferíveis, pois apesar de apresentarem menor atividade anti tumoral, não comprometem de forma tão agressiva o sistema imunitário do doente. Isso acontece porque, a duração e gravidade da neutropenia induzida é menor, as células imunocompetentes do doente não são eliminadas imediatamente e a recuperação do *pool* de linfócitos T parece ser mais rápida e mais consistente. (71,73,74)

Estudos mostram que cerca de 40% dos doentes submetidos a alo-HSCT, apresentam recidiva da doença, sendo que os mais jovens apresentam uma sobrevida a longo prazo mais favorável, comparativamente com doentes mais idosos (idade superior 60 anos). Desta forma, é necessário implementar estratégias de monitorização após o transplante que sejam mais eficazes na antecipação das recidivas, dada a biologia agressiva deste tipo de patologias e, apesar das terapias direcionadas, podem apresentar prognósticos incertos. (6–10,75)

1.5. Citometria de Fluxo e *Cellsorting*

A citometria de fluxo consiste na análise multiparamétrica e simultânea de células ou partículas (biológicas ou não biológicas) em suspensão, permitindo a sua avaliação individual. O seu princípio subjacente está relacionado com a dispersão de luz e a emissão de fluorescência, que ocorre quando há a passagem das partículas em suspensão, alinhadas uma a uma, num fluxo laminar, frente a um feixe de luz de um aparelho medidor, obtendo-se assim, informação sobre os aspetos físico e químicos das partículas. O tamanho, a granularidade e a fluorescência emitida são exemplos de parâmetros usados para analisar e diferenciar as células. A citometria de fluxo permite identificar o tipo de células presentes na amostra, quantificar, bem como verificar quais podem ser as suas características funcionais. Desta forma, possibilita o estudo da imunofenotipagem das células sanguíneas, a medição de marcadores de apoptose e da viabilidade celular, ensaios de fagocitose, estudo das populações linfocitárias. Apesar da percentagem de células estaminais ser muito baixa no sangue periférico, este é considerado a

principal fonte das células estaminais, após a estimulação da medula óssea. Deste modo, antes da realização do transplante, torna-se importante recorrer à citometria de fluxo, permitindo determinar a altura ideal para a colheita das células do dador. Isso é possível através da contagem absoluta das células CD34⁺ do sangue periférico, sendo considerado um método confiável para prever a taxa de sucesso das colheitas. (59,76–80)

As células são colhidas pela técnica de aférese, de um dador saudável e compatível, após a sua mobilização da medula óssea para o sangue periférico, sendo esta técnica usada em aproximadamente 70% dos transplantes alogénicos. A aférese consiste num procedimento que se destina à obtenção de células, realizada em separadores celulares automáticos, os quais separam a fração celular pretendida, de acordo com a densidade e, os restantes componentes celulares são reinfundidos ao dador. Desta forma, inicialmente há a mobilização das células progenitoras hematopoiéticas da medula óssea para o sangue periférico, juntamente com fatores de crescimento hematopoiéticos (por ex, o G-CSF), de um dador saudável; de seguida, são realizadas várias colheitas de amostras de sangue periférico, para análises sucessivas, que permitem a monitorização das células CD34⁺ no sangue através da sua quantificação por citometria de fluxo (valor absoluto); assim, consegue determinar-se a altura ideal para a colheita, normalmente realizada cerca de 5 dias após, pelo processo de aférese. Após a colheita, faz-se novamente a sua contagem absoluta por citometria de fluxo e, por fim, procede-se à infusão das mesmas no doente. Importante referir que um transplante de medula óssea requer um mínimo de $2 - 4 \times 10^6$ células CD34⁺/Kg de peso corporal do doente no produto transfundido. (40,76,81,82)

Para efetuar a sua contagem, recorre-se à estratégia em plataforma única, onde inicialmente se isola a população de leucócitos, para que posteriormente, seja possível identificar as diferentes populações celulares, de acordo com o tipo de marcadores usados. Neste caso, recorre-se ao uso dos anticorpos monoclonais CD34⁺ (marcador das células estaminais) e CD45⁺ (marcador dos leucócitos), conjugados com fluorocromos. A região positiva para as células CD45⁺ representa todos os leucócitos e a região CD34⁺ representa todas as células imaturas (figura 2, página 15). Além desses, é usado o marcador 7-ADD que permite avaliar a viabilidade celular. Para o cálculo dos valores absolutos, recorre-se a tubos *trucount* (com um n^o conhecido de esferas fluorescentes), pois desta forma, o número absoluto de células positivas na amostra pode ser determinado através da comparação entre os eventos celulares e os eventos das esferas. Assim sendo, a contagem absoluta das células estaminais hematopoiéticas permite aumentar a taxa de

sucesso das colheitas por aférese, tornando-se um procedimento mais eficiente, eliminando procedimentos extras nos doadores.(40,82–84)

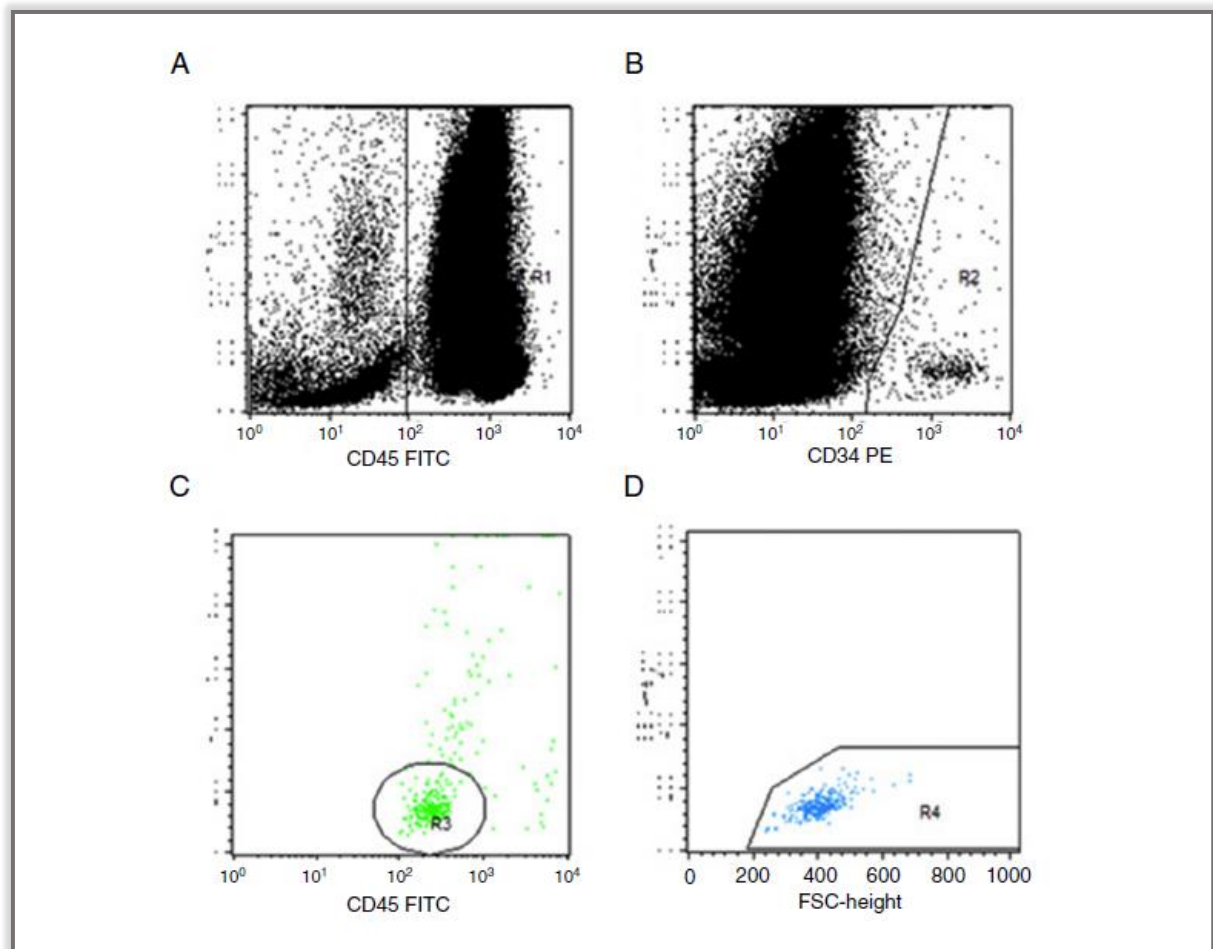


Figura 2 – Estratégia para a quantificação das células CD34⁺, de acordo com as recomendações da ISHAGE (Sociedade Internacional de Hemoterapia e Engenharia de Enxertos). Gráfico A: Identificação da população de leucócitos CD45⁺ (R1). Gráfico B: Identificação da população de células imaturas CD34⁺ (R2). Gráfico C: Eventos combinados de R1 e R2, em que o gate R3 representa as células CD45⁺ de baixa complexidade. Gráfico D: Obteve-se a região R4, de acordo com os gates anteriores, juntamente com a avaliação da dispersão de luz frontal (FSC) e lateral (SSC). É a partir desta região que se determina a contagem absoluta de células CD34⁺.

Fonte: Adaptado de Lemos et al, 2018. Quantification of peripheral blood CD34⁺ cells prior to stem cell harvesting by leukapheresis (40).

Além disso, a citometria de fluxo também permite o estudo de diferentes populações celulares, na avaliação do quimerismo. Assim, para isso recorre-se ao classificador de células ativadas por fluorescência (FACS), técnica esta que permite a *cellsorting*, ou seja, a separação das diferentes populações celulares. (85–87)

O seu princípio é semelhante à citometria de fluxo, mas envolve uma etapa extra, pois à medida que as células são marcadas com anticorpos fluorescentes e ocorre a sua passagem, alinhadas uma a uma, num fluxo laminar, são também isoladas. Desta forma, há a sua classificação e separação, permitindo que fiquem retidas apenas as células de interesse, pois tem a capacidade de direcionar as partículas para diferentes tubos de colheita. À medida que as partículas passam pelo laser, ocorre a emissão de luz que é recebida pelos detetores e de seguida é aplicada uma carga positiva ou negativa, de acordo com o tipo de célula identificada (figura 3). E é através dessa carga que se consegue direcionar a célula para o tubo de colheita correto. Além disso, através do FACS consegue atingir-se uma alta pureza, viabilidade e rendimento das células, aumentando assim a sensibilidade e especificidade da análise do quimerismo. Após a separação das diferentes populações celulares a estudar, segue-se a aplicação da técnica de PCR, tornando assim possível a posterior análise do quimerismo do doente. (59,85–88)

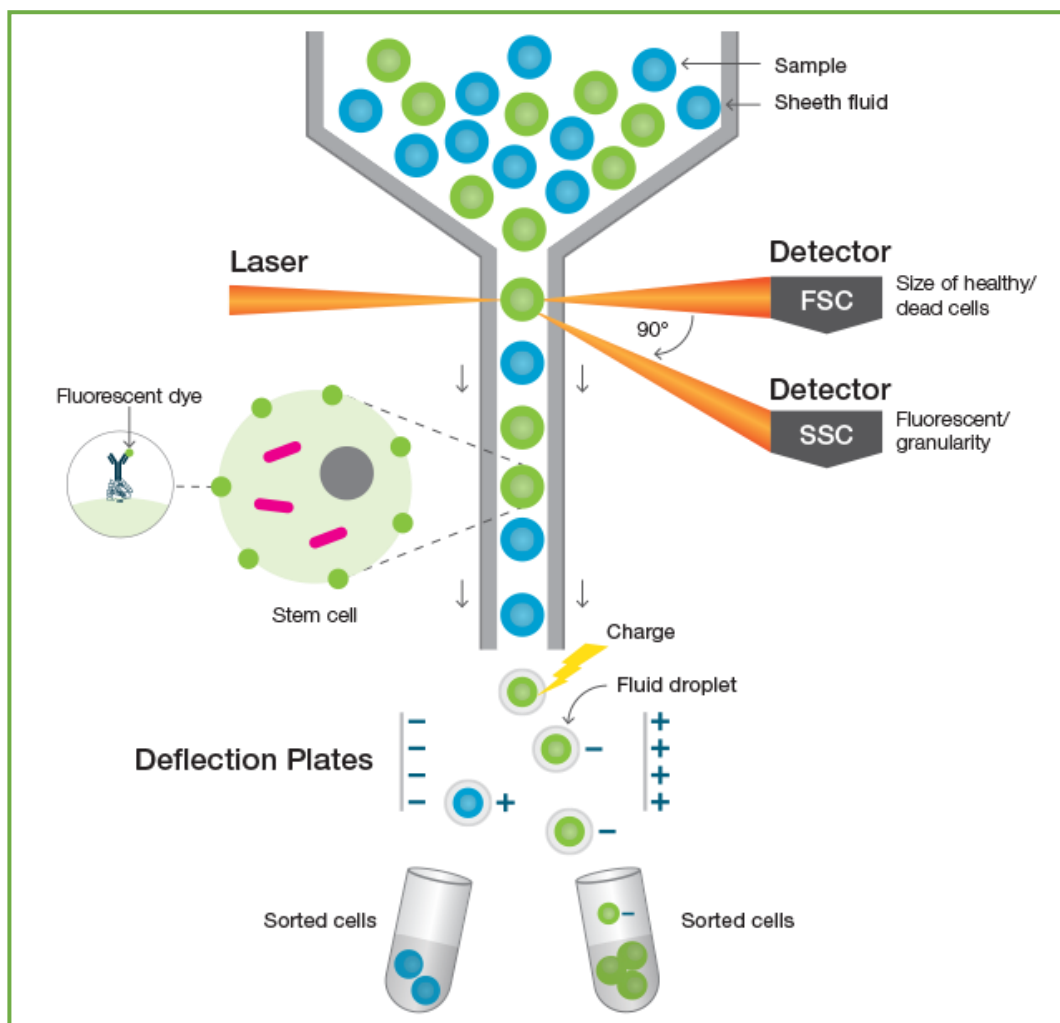


Figura 3 – Representação esquemática da técnica FACS.

Fonte: Benefits of fluorescence activated cell sorting in stem cell research. Available from: <https://www.bio-rad.com/en-pt/applications-technologies/benefits-fluorescence-activated-cell-sorting-stem-cell-research?ID=Q0JH51RT8IG9> (89)

1.6. Quimerismo

Atualmente, o termo quimerismo é aplicado à presença de células num indivíduo, com diferentes origens genéticas, o qual pode ter uma etiologia natural ou artificial. O quimerismo natural ocorre em situações muito raras, como por exemplo na fusão de zigotos, na troca de sangue entre o feto e a progenitora, em dupla contribuição parental, entre outros. O quimerismo artificial ocorre nas transfusões sanguíneas e nos alotransplantes de células estaminais (9,17).

Assim, após a realização do transplante, é fundamental a monitorização do quimerismo, pois a recidiva e a progressão da doença são as principais causas na falha do *engraftment* do enxerto. O seu estudo permite avaliar a recuperação hematológica das leucemias agudas após o transplante alogénico, antecipar possíveis recidivas antes da sua deteção morfológica e orientar para intervenções preventivas em doentes de alto risco. Desta forma, a análise do quimerismo, principalmente em indivíduos com leucemias sem características citogenéticas, moleculares ou imunofenotípicas específicas, representa uma ferramenta essencial na recorrência da patologia. (17–19,23,24)

Atualmente, sabe-se que o transplante é efetivo mesmo na presença de células hematopoiéticas do dador e recetor, contudo, se após a realização do transplante todas as células forem de origem do dador, o doente apresenta um quimerismo completo. No entanto, perante a presença de células de origem do dador e recetor, denomina-se quimerismo misto, considerando atualmente uma situação comum. Sendo o quimerismo um processo dinâmico, são várias as condições pré-transplante que o influenciam, nomeadamente o tipo de condicionamento, o tipo de células de enxerto, a quantidade de células infundidas, o tipo de dador e a intensidade do tratamento imunossupressor após transplante. Como consequência, pode haver mudanças quanto ao tipo de quimerismo, por exemplo, pode passar de completo a misto e vice-versa. Nestes casos, a percentagem de células autólogas pode aumentar ou diminuir e os indivíduos desenvolvem um quimerismo misto ascendente ou descendente, respetivamente. Além disso, também é possível a existência de quimerismo *split*, perante a análise de subpopulações leucocitárias, onde o doente apresenta quimerismo misto somente em algumas linhagens celulares e completo em outras. Na tabela 4 (página 19) encontra-se descrita a classificação do quimerismo, de forma mais detalhada. (17,18,22)

Atualmente, para a monitorização dos doentes transplantados, no que diz respeito à avaliação do quimerismo, o método de referência utilizado é a tecnologia de reação polimerase em cadeia (PCR) multiplex. Desta forma, a determinação do grau de quimerismo no doente passa pela

amplificação de sequências de ADN altamente polimórficas, os microssatélites ou repetições curtas em tandem (*STR*), através da técnica de PCR, pela marcação de *primers* fluorescentes e a separação dos fragmentos de DNA por eletroforese capilar. Assim, consegue-se determinar a percentagem de células do dador e recetor, identificando-se o tipo de quimerismo, permitindo assim, a monitorização regular e precisa após o transplante, importante no controlo da rejeição. (17–21)

Desta forma, após a realização do transplante alogénico, a análise do quimerismo é uma ferramenta valiosa, prática e útil para a sua monitorização, na medida em que, o estudo de uma linhagem celular específica permite detetar especificamente o quimerismo de um ou mais subconjuntos de células, aumentando a sua sensibilidade e especificidade. Assim, apesar da sua determinação poder ser efetuada nas diferentes células hematopoiéticas, destaca-se o marcador CD34⁺ pelas razões já invocadas anteriormente. (20,23–26,90,91)

O antigénio CD34⁺ é expresso pelas células blásticas em mais de 50% em doentes com LLB/T e em mais de 80% em doentes com LMA. Assim, em doentes com fenótipo leucémico CD34⁺, o seu estudo revela-se vantajoso, pois através do seu isolamento é possível analisar o quimerismo específico de linhagem, permitindo detetar a presença de células autólogas e potencialmente neoplásicas. Vários estudos demonstram que a monitorização do quimerismo específico de linhagem CD34⁺ permite uma maior sensibilidade e especificidade na sua deteção, comparativamente com o estudo do quimerismo convencional, pois consegue obter-se informações mais precisas relativamente aos processos subjacentes da dinâmica do quimerismo. Além disso, a diminuição do quimerismo das células CD34⁺ está associada a uma subsequente recidiva, a qual se verifica semanas antes da sua deteção a nível morfológico. Simultaneamente, também fornece informação acerca dos doentes que se mantêm estáveis e sem recidiva, os quais não apresentam uma diminuição do marcador CD34⁺. Desta forma, na presença de níveis elevados deste marcador, o doente apresenta bom prognóstico, sem a presença de recidiva. Quando se verifica o oposto, o doente poderá apresentar um pior prognóstico, possivelmente associado a uma recidiva ou rejeição do enxerto, pois indica que grande parte das células CD34⁺ são autólogas. Relativamente às outras linhagens, o mesmo não se verifica, pois a sua diminuição não é tão evidente nem atempada, daí o estudo do marcador CD34⁺ revelar-se primordial nestes doentes. (90–92)

Tabela 4–Classificação dos tipos de quimerismo (adaptado de Lejman et al (2017); Bader et al (2005)).

Quimerismo:	Definição
Completo	Existência de 100% células do dador na amostra avaliada (bom prognóstico).
Misto estável	Presença de células do dador e recetor na amostra avaliada. Cerca de 1 a 20% são células do recetor e o restante são células do dador, mantendo-se assim e estável por um longo período de tempo após o transplante.
Misto transitório	Presença de células do dador e recetor na amostra avaliada. Cerca de 1 a 5% células do recetor e o restante são células do dador, mantendo-se assim cerca de 6–8 meses após o transplante, evoluindo para quimerismo completo ao fim desse tempo.
Misto descendente	Presença de células do dador e recetor na amostra avaliada, contudo verifica-se a diminuição das células do recetor.
Misto ascendente	Presença de células do dador e recetor na amostra avaliada, contudo verifica-se o aumento das células do recetor.
Split	Presença de duas ou mais populações celulares: <ul style="list-style-type: none"> • uma com células do dador e recetor; • outra com quimerismo completo.
Micro quimerismo	Existência de $\leq 1\%$ células do dador (mau prognóstico).

2. Metodologia

2.1. Tipo de Estudo

O presente estudo baseia-se numa revisão sistemática da literatura, realizada com base na metodologia PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis*), a qual engloba uma *checklist* com 27 itens. A fim de se obter resposta aos objetivos propostos, desenvolveu-se a seguinte questão de investigação: Qual a importância do estudo das células CD34⁺ no *follow-up* do transplante alogénico de células estaminais hematopoiéticas, em leucemias agudas face a outros marcadores existentes?

2.2. Fontes de Informação e Estratégia de Pesquisa

Para a recolha dos artigos que fundamentam este estudo, foram intentadas pesquisas avançadas nas bases de dados *PubMed*, *b-on*, *Cochrane Library*, *Science Direct*, *Clinicalkey* e *EBSCO*, até ao dia 14 de dezembro. De forma a direcionar a pesquisa, recorreu-se ao uso dos seguintes termos: "*allogeneic stem cell transplantation*", "*acute leukemia*", "*chimerism*", "*lineage specific chimerism*", "*stem cell CD34+*", "*cellsorting*" e "*stem cell cytopheresis*". Além desta pesquisa, procedeu-se à pesquisa das referências bibliográficas de todos os artigos previamente selecionados, a fim de se identificar e recolher outros artigos potencialmente elegíveis, que abordassem o estudo do quimerismo CD34⁺.

2.3. Critérios de Elegibilidade

Todos os artigos incluídos neste estudo cumpriram os seguintes critérios de inclusão: estudos de coorte (prospetivos ou retrospectivos), caso-controlo ou de ensaio clínico randomizado, escritos em língua inglesa, disponíveis em formato completo e sem limite temporal do ano de publicação. Além disso, foram selecionados apenas estudos realizados em doentes com leucemia aguda, submetidos a alo-HSCT e, que abordavam a monitorização do quimerismo CD34⁺ e convencional, comparando assim o estudo do marcador CD34⁺ com outros marcadores. Desta forma, para que os estudos pudessem ser selecionados, foi necessário a existência de um grupo controlo, neste caso o estudo do quimerismo convencional. Assim, permitiu obter-se conclusões quanto à monitorização do quimerismo CD34⁺ em doentes com leucemias agudas, após alo-HSCT.

Por outro lado, foram definidos os seguintes critérios de exclusão: estudos que não tinham como objetivo principal a monitorização do quimerismo em doentes que realizaram alo-HSCT, não abordar questões relevantes para esta revisão, estudos não disponíveis em formato completo e sem um grupo controlo.

De referir que, a seleção dos artigos foi realizada por duas pessoas individualmente e, em caso de divergência, foi necessário chegar a consenso.

2.4. Avaliação da Qualidade Metodológica

A análise da qualidade metodológica dos artigos selecionados, foi avaliada por duas ferramentas diferentes, de acordo com o tipo de estudo. Desta forma, recorreu-se à Escala de *Newcastle Ottawa*, para avaliar o risco de viés em estudos de coorte e caso-controlo. Esta escala está subdividida em 3 grupos: seleção dos doentes, comparabilidade e avaliação dos resultados/exposição, constituídos por uma série de questões, onde são atribuídas estrelas de acordo com a resposta. É através do número total de estrelas em cada grupo, que se determina o risco de viés associado. Além desta, recorreu-se também à Escala de *Jadad*, para avaliar o risco de viés em ensaios clínicos randomizados. Esta ferramenta é constituída por 5 questões, cujo objetivo passa por avaliar três aspetos dos ensaios clínicos: se é randomizado, cego e se há descrição das perdas ao longo do seguimento. De acordo com a resposta, é atribuída uma pontuação, conseguindo assim aferir-se quanto ao risco de viés.

Todos os artigos que apresentaram fraca qualidade metodológica foram excluídos, pois o risco de viés associado é alto, comprometendo o seu estudo. Todos eles foram analisados por duas pessoas individualmente, sendo assim alvo de duas avaliações independentes, o que permitiu reduzir o risco de viés.

2.5. Extração dos Dados dos Estudos

Tendo em consideração a questão de investigação definida, foram recolhidos, analisados e sintetizados os dados de cada estudo, numa tabela. Assim, foram extraídos dados sobre os autores, ano de publicação, tipo e objetivo do estudo, tamanho da amostra, características dos doentes, parâmetros avaliados, respetivo tempo de estudo, bem como os principais resultados nos parâmetros de interesse. Esta etapa também foi realizada por duas pessoas individualmente.

3. Resultados

Na pesquisa nas diferentes bases de dados utilizadas, foram identificados um total de 429 artigos, adicionando-se 11 provenientes da recuperação de referências, a partir dos artigos já selecionados. No fluxograma da figura 4 (página 24) evidencia-se todo o processo aplicado para a sua seleção. Assim, numa fase inicial, dos 440 artigos foram excluídos 57, pelo facto de se encontrarem em duplicado. Dos 383 artigos selecionados foi efetuada uma nova triagem, tendo sido eliminados 246, uma vez que, o título não era sugestivo de enquadramento no âmbito do trabalho. Na etapa seguinte, procedeu-se à leitura do resumo de 137 artigos, tendo sido apenas selecionados aqueles que apresentaram informação relevante ao tema em estudo, obtendo-se assim um total de 48 artigos para leitura e análise completa. No final, foram considerados elegíveis apenas 17 artigos para incorporar esta revisão sistemática, visto que, cumpriam todos os critérios de inclusão definidos. Adicionalmente, procedeu-se a avaliação do risco de viés destes 17 artigos, recorrendo à escala de *Newcastle Ottawa* (tabela 5, página 23) e *Jadad* (tabela 6, página 23). Assim, através da sua avaliação, verificou-se que 88,2 % (n = 15) dos artigos apresentaram um risco de viés baixo, 5,9% (n = 1) um risco de viés moderado e 5,9 % (n = 1) um risco de viés elevado. Desta forma, os artigos que apresentaram um risco de viés elevado foram excluídos, obtendo-se assim um total de 16 artigos para incluir nesta revisão sistemática (tabela 7, páginas 25-29), com um desvio padrão de 0,7 (93-95).

Tabela 5 – Avaliação do risco de viés pela Escala de *Newcastle Ottawa*.

Autor e Ano	Seleção	Comparabilidade	Resultados/Exposição	Risco de Viés
Geissler et al. 2001	★★★	★★	★	Elevado
Thiede et al. 2002	★★★	★	★★	Moderado
Scheffold et al. 2004	★★★★	★★	★★	Baixo
Zeiser et al. 2005	★★★★	★★	★★	Baixo
Bornhäuser et al. 2009	★★★★	★★	★★	Baixo
Lange et al. 2011	★★★★	★★	★★	Baixo
Norkin et al. 2012	★★★★	★	★★	Baixo
Rosenow et al. 2013	★★★	★★	★★	Baixo
Hoffmann et al. 2014	★★★★	★★	★★	Baixo
Terwey et al. 2014	★★★★	★★	★★	Baixo
Preuner et al. 2016	★★★★	★★	★★★★	Baixo
Kim et al. 2016	★★★★	★	★★	Baixo
Unnikrishnan et al. 2018	★★★★	★	★★	Baixo
Kinsellaa et al. 2019	★★★★	★★	★★	Baixo
Das et al. 2020	★★★★	★	★★	Baixo
Bris et al. 2022	★★★★	★★	★★	Baixo

Tabela 6 – Avaliação do risco de viés pela Escala de *Jadad*.

Autor e Ano	Questão	Pontuação	Risco de Viés
Zielijska et al. 2014	1- Estudo descrito como randomizado?	+1 (sim)	Baixo
	2- Estudo descrito como duplo-cego?	0 (não descrito)	
	3- Houve descrição das perdas?	+1	
	4- Randomização apropriada?	+1	
	5- Estudo cego apropriado?	0	

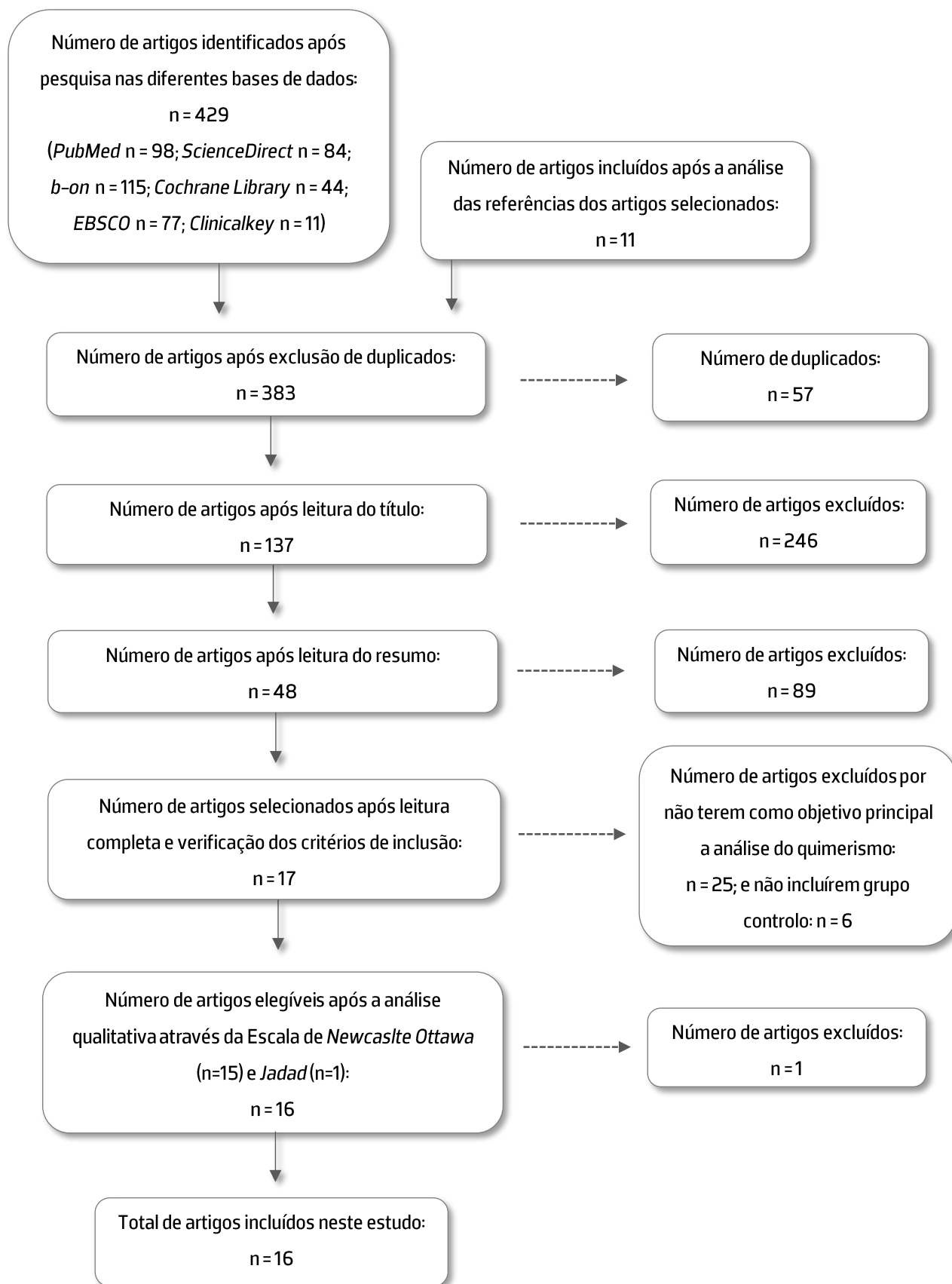


Figura 4 – Fluxograma para a seleção dos artigos a incluir no estudo.

Tabela 7 – Descrição de todos os estudos incluídos nesta revisão.

Autor e Ano	Tipo de Estudo	Objetivo do Estudo	Tamanho da Amostra	Caraterísticas dos Doentes	Parâmetros Avaliados	Tempo de Estudo	Principais Resultados
Thiede et al. 2002	Estudo de Coorte (prospetivo)	Verificar se a análise do quimerismo CD34 ⁺ pode ser um método viável para monitorizar a DRM em doentes que realizaram alo-HSCT.	N=87	LMA (28), LLA (10), Síndrome Mielodisplásica, SMD (6) e outros (43).	Quimerismo CD34 ⁺ e Convencional (células CD4 ⁺ e CD8 ⁺ , NK CD56 ⁺ , e granulócitos CD15 ⁺).	Acompanhamento médio de 295 dias (realizadas cerca de 8 análises do quimerismo).	Quimerismo CD34 ⁺ antecipou o convencional na deteção de recidiva. Diminuição do quimerismo convencional, aquando do diagnóstico morfológico de recidiva.
Scheffold et al. 2004	Estudo de Coorte (prospetivo)	Verificar se a análise do quimerismo do dador específico de linhagem permite detetar precocemente a recidiva, após o alo-HSCT e, se pode ser utilizado como marcador da DRM.	N=20	LMA (20); Idade média 50 anos (entre 21-65 anos).	Quimerismo CD34 ⁺ e Convencional (células CD19 ⁺ , CD3 ⁺ e monócitos CD14 ⁺).	Acompanhamento médio de 546 dias. Análise do quimerismo em intervalos de 4 semanas nos 1 ^{os} 12 meses após o transplante e posteriormente, a cada 2-3 meses (com um n ^o médio de 10 análises por doente).	Quimerismo CD34 ⁺ antecipou o convencional na deteção de recidiva.
Zeiser et al. 2005	Estudo de Coorte (prospetivo)	Comparar a análise do quimerismo convencional e específico de linhagem, aferindo quanto à sua sensibilidade e especificidade para detetar a DRM, em doentes submetidos a alo-HSCT.	N=168	LMA(137) e SMD(31).	Quimerismo CD34 ⁺ , e Convencional (células CD3 ⁺ e leucócitos totais).	Acompanhamento médio 22 meses. Avaliação do quimerismo 100 e 365 dias após o transplante em doentes com SMD que atingiram quimerismo completo, 30 dias após o transplante; nos casos em que isso não se verificou ou em doentes com LMA, a análise do quimerismo foi realizada em intervalos mensais.	Não se verificaram diferenças significativas quanto à sensibilidade e especificidade entre as linhagens celulares estudadas, na deteção de recidiva.

Autor e Ano	Tipo de Estudo	Objetivo do Estudo	Tamanho da Amostra	Caraterísticas dos Doentes	Parâmetros Avaliados	Tempo de Estudo	Principais Resultados
Bornhäuser et al. 2009	Estudo de Coorte (prospetivo)	Avaliar o valor preditivo da análise do quimerismo CD34 ⁺ após alo-HSCT.	N=90	LMA (67), LLA(16), SMD e leucemia relacionada com a terapia (7).	Quimerismo CD34 ⁺ e Convencional (leucócitos totais).	Acompanhamento médio de 44 meses. Análise do quimerismo CD34 ⁺ 28,56,84,112 dias e 6,12 e 18 meses após o transplante; análise do quimerismo convencional semanalmente desde o dia 14 ao 56 e, a cada 4 semanas até 18 meses após o transplante.	Quimerismo CD34 ⁺ antecipou o convencional na deteção de recidiva. Quimerismo CD34 ⁺ <80% = maior risco de recidiva.
Lange et al. 2011	Estudo de Coorte (prospetivo)	Avaliar a capacidade de diferentes biomarcadores preverem a recidiva após alo-HSCT (quimerismo CD34 ⁺ e convencional e níveis de expressão do gene WT1 em células do SP).	N=88	LMA(68) e SMD(20); Idade média 61 anos (entre 22-74); Género feminino: 40 e masculino: 48	Quimerismo CD34 ⁺ e Convencional (leucócitos totais).	Análise do quimerismo 28,56, 84 dias após o transplante ou até à recidiva.	Associação prognóstica evidente entre recaída iminente e a diminuição do quimerismo CD34 ⁺ . A sua análise antecipou o quimerismo convencional na deteção de recidiva.
Norkin et al. 2012	Estudo de Coorte (prospetivo)	Verificar se a análise do quimerismo CD34 ⁺ permite a deteção precoce de recidiva após alo-HSCT.	N=6	LMA e SMD.	Quimerismo CD34 ⁺ e convencional (células B, T e granulócitos).	Análise do quimerismo mensal até 60, 90 ou 150 dias após o transplante.	Quimerismo CD34 ⁺ antecipou o convencional na deteção de recidiva, tendo este último permanecido com níveis elevados mesmo na presença de recidiva.

Autor e Ano	Tipo de Estudo	Objetivo do Estudo	Tamanho da Amostra	Caraterísticas dos Doentes	Parâmetros Avaliados	Tempo de Estudo	Principais Resultados
Rosenow et al. 2013	Estudo retrospectivo de caso controlo	Verificar se a monitorização do quimerismo CD34 ⁺ é um método sensível para detetar recidivas iminentes, conseguindo prevenir-se a recidiva hematológica.	N=134	LMA (126) e SMD (8); Idade média 53 anos (entre 17-72); Género feminino: 58 e masculino: 76	Quimerismo CD34 ⁺ e Convencional (células CD19 ⁺ , CD3 ⁺ e monócitos CD14 ⁺).	Acompanhamento médio de 1030 dias. Análise do quimerismo de MO realizada 30 e 100 dias após o transplante; análise do quimerismo do SP realizada mensalmente no 1ºano e depois a cada 2-3 meses.	Quimerismo CD34 ⁺ antecipou o convencional na deteção de recidiva.
Hoffmann et al. 2014	Estudo de Coorte (prospetivo)	Verificar se a análise do quimerismo CD34 ⁺ é útil para monitorizar o enxerto e prever recidivas.	N=85	LMA(79) e SMD(6); Idade média 48 anos (entre 18-68 anos); Género feminino: 38 e masculino: 47	Quimerismo CD34 ⁺ e Convencional (leucócitos totais).	Acompanhamento médio de 467 dias, tendo sido realizadas cerca de 6 análises do quimerismo CD34 ⁺ e 5 do quimerismo convencional.	Quimerismo CD34 ⁺ antecipou o convencional na deteção de recidiva.
Terwey et al. 2014	Estudo de Coorte (retrospectivo)	Monitorizar o quimerismo e a DRM em doentes que realizaram alo-HSCT, aferindo quanto à previsão da recidiva.	N=101	LLA (101); Idade média 33 anos (entre os 17-55); Género feminino: 36 e masculino: 64	Quimerismo CD34 ⁺ e Convencional (células CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e CD19 ⁺)	Acompanhamento médio de 74 meses. Análise do quimerismo 1,3,6,9,12,18,24,36,48 e 60 meses após o transplante.	Aumento da incidência da recidiva perante quimerismo misto ascendente. Aumento de células autólogas CD34 ⁺ , considerado fator prognóstico negativo para a sobrevida geral e recidiva. Quimerismo CD34 ⁺ antecipou o convencional na deteção de recidiva.

Autor e Ano	Tipo de Estudo	Objetivo do Estudo	Tamanho da Amostra	Caraterísticas dos Doentes	Parâmetros Avaliados	Tempo de Estudo	Principais Resultados
Zielińska et al. 2014	Estudo clínico randomizado	Avaliar o quimerismo convencional e específico de linhagem após alo-HSCT, aferindo quanto à sensibilidade e especificidade de ambos.	N=12	LMA(8) e LLA(4); Idade média 35 (entre 19–61 anos); Género feminino: 4 e masculino: 8	Quimerismo CD34 ⁺ e Convencional (leucócitos totais, células CD19 ⁺ , CD3 ⁺ ou CD7 ⁺ , monócitos CD14 ⁺ e plasmáticas CD38 ⁺)	Análise do quimerismo 1,2,3,6,9,12 meses após o transplante	Quimerismo CD34 ⁺ antecipou o convencional na deteção de recidiva.
Preuner et al. 2016	Estudo de Coorte (prospetivo)	Investigar o impacto do estudo do quimerismo específico de linhagem, em relação ao risco de recidiva em doentes pediátricos com LLA, após alo-HSCT.	N=162	LLA (162); Idade média 10 anos (entre 0,5–23); Género feminino: 58 e masculino: 104	Quimerismo CD34 ⁺ e Convencional (células CD8 ⁺ e leucócitos totais do SP).	Acompanhamento médio 10 anos. Análise semanal do quimerismo entre os dias 7 e 49 após o transplante; depois em intervalos de duas semanas até ao dia 100; depois 120, 150, 180, 360 dias após o transplante.	Células autólogas em circulação associadas a um risco elevado de recidiva. Quimerismo CD34 ⁺ antecipou o convencional na deteção de recidiva.
Kim et al. 2016	Estudo de Coorte (retrospectivo)	Verificar se a persistência de células CD34 ⁺ autólogas, após alo-HSCT, permitem prever a recidiva iminente.	N=76	LMA (45), LLA (14), LLC (3), SMD (14).	Quimerismo CD34 ⁺ e Convencional (leucócitos totais).	Análise do quimerismo 30,100 dias, 6 meses e 1 ano após o transplante ou conforme indicado clinicamente. Avaliou-se a persistência das células do doente quando a % de células recetoras foi superior a 5% e 10%.	Quimerismo CD34 ⁺ antecipou o convencional na deteção de recidiva. Quimerismo CD34 ⁺ detetou 16 de 17 doentes com recidiva; enquanto o convencional, detetou apenas 2 recidivas.

Autor e Ano	Tipo de Estudo	Objetivo do Estudo	Tamanho da Amostra	Caraterísticas dos Doentes	Parâmetros Avaliados	Tempo de Estudo	Principais Resultados
Unnikrishnan et al. 2018	Estudo de Coorte (prospetivo)	Avaliar a viabilidade da monitorização do quimerismo CD34 ⁺ , a fim de perceber se permite detetar a recidiva após o alo-HSCT.	N=14	LMA (13) e SMD (1).	Quimerismo CD34 ⁺ e convencional (células CD19 ⁺ , CD2 ⁺ e granulócitos CD15 ⁺).	Acompanhamento médio de 188 dias. Análise do quimerismo mensal até à recidiva ou 1 ano após o transplante.	Quimerismo CD34 ⁺ antecipou o convencional na deteção de recidiva. Quimerismo convencional não permitiu prever a recidiva, permanecendo acima dos 80%.
Kinsellaa et al. 2019	Estudo de Coorte (prospetivo)	Monitorizar o quimerismo CD34 ⁺ e CD3 ⁺ após alo-HSCT, relacionando isso com a recidiva da doença e sobrevida geral.	N=144	LMA e SMD (90) e linfoma(54); idade média 53 anos (entre 22-71 anos); Género feminino: 52 e masculino: 92	Quimerismo CD34 ⁺ e Convencional (células CD3 ⁺).	Acompanhamento médio de 1006 dias. Análise do quimerismo 50,100 e 180 dias após o transplante.	3 grupos de doentes identificados, através do padrão combinado das células CD34 ⁺ e T. Doentes com quimerismo completo em ambas as frações ou apenas na fração CD34 ⁺ , apresentaram menor risco de recidiva.
Das et al. 2020	Estudo de Coorte (prospetivo)	Avaliar o quimerismo CD34 ⁺ e CD3 ⁺ , verificando qual deles é o melhor marcador para prever a recidiva.	N=136	LMA (113) e SMD (23).	Quimerismo CD34 ⁺ e Convencional (células CD3 ⁺).	Análise do quimerismo 30,60,90,120 e 180 dias após o transplante.	Quimerismo CD34 ⁺ antecipou o convencional na deteção de recidiva. Estudo do CD3 ⁺ apenas foi útil em cerca de 24% das recidivas.
Bris et al. 2022	Estudo de Coorte (prospetivo)	Verificar se a avaliação do quimerismo CD34 ⁺ é preditivo de recidiva. Além disso, comparar o estudo do marcador CD34 ⁺ , CD3 ⁺ e dos leucócitos totais, analisando qual o seu impacto na recidiva e sobrevida.	N=261	LMA (161), SMD(68), NPM(18),SMD/NPM(14); Idade média 61 anos (entre 22-74); Género feminino: 104 e masculino: 157	Quimerismo CD34 ⁺ e Convencional (células CD3 ⁺ e de leucócitos totais).	Acompanhamento médio 45 meses. Análise do quimerismo CD34 ⁺ entre os dias 50 e 150 após o transplante; leucócitos totais 30 e 60/90 dias após o transplante e para CD3 ⁺ no dia 60/90.	Quimerismo CD34 ⁺ antecipou o convencional na deteção de recidiva. Marcador CD34 ⁺ apresentou maior sensibilidade.

3.1. População

De acordo com os 16 artigos selecionados, foram incluídos um total de 1 584 indivíduos nesta revisão, sendo que o tamanho da amostra variou entre 6 e 261 doentes. Nestes estudos, participaram doentes com leucemias agudas de todas as faixas etárias (jovens, adultos e idosos), do género masculino e feminino, com idades inferiores a 1 ano até aos 74. Estes indivíduos realizaram alo-HSCT entre o período de janeiro 1996 e abril de 2020, tendo sido na maioria especificado o regime de condicionamento, o tipo de enxerto e a terapêutica imunossupressora utilizada. Nos estudos em que foi possível calcular a idade média da população, verificou-se que esta se enquadra principalmente na faixa etária de adultos.

3.2. Protocolo

Todos os estudos abordaram a monitorização do quimerismo CD34⁺ e convencional, após a realização do alo-HSCT em doentes com leucemias agudas (90–92,96–108).

A determinação do grau de quimerismo no doente passou pela amplificação de sequências de ADN altamente polimórficas, através da técnica de PCR. Para a sua análise, recorreu-se a amostras de sangue periférico e/ou medula óssea de cada doente. (90–92,96–108)

Separação das Populações Celulares

As células mononucleares e granulócitos foram separados por gradiente de densidade, através da solução de *Ficoll*. Posteriormente, os linfócitos CD3, CD19 e CD56 foram separados através do método imunomagnético, por um separador celular automático. A técnica FACS permitiu também, a separação e purificação das diferentes células nucleadas a estudar (em alguns estudos só se verificou a aplicação desta técnica). (90–92,96–108)

Extração e Quantificação do ADN

A extração e quantificação do ADN das diversas populações celulares, foi realizada em equipamentos automáticos, tendo sido ajustado para valores entre 1,5 - 2 ng. (90–92,96–108)

Avaliação do Quimerismo

A determinação do quimerismo foi realizada através da técnica de PCR multiplex, tendo sido utilizados *kits* da casa comercial *Biotype* e *Biosystems*. A sua monitorização foi realizada em diferentes momentos após o transplante, sendo que o tempo médio de acompanhamento dos doentes variou de acordo com cada estudo (tabelas 7) (90–92,96–108).

3.3. Parâmetros avaliados e a sua forma de avaliar

De forma a verificar qual importância do estudo das células CD34⁺, no *follow-up* do alo-HSCT das leucemias agudas face a outros marcadores existentes, selecionaram-se artigos que abordassem o estudo da avaliação do quimerismo das células CD34⁺ e convencional (células B, T, monócitos, granulócitos ou leucócitos totais) permitindo assim comparar e aferir quanto à informação dada pelos diferentes marcadores estudados (90–92,96–108).

Desta forma, a análise do quimerismo CD34⁺ foi avaliada em 100% dos artigos, através da técnica de PCR multiplex. Simultaneamente, também se procedeu à análise do quimerismo convencional, por 100% dos artigos, sendo que grande parte especificaram a linhagem a estudar. Assim, em cerca de 75% (n=12) dos artigos procedeu-se ao estudo de células da linhagem T, 38% (n=6) incluíram o estudo das células B, 19% (n=3) incluíram o estudo dos monócitos e granulócitos, 13% (n=2) incluíram o estudo das células *Natural Killer*, 6% (n=1) incluíram o estudo das células plasmáticas e, cerca de 44% (n=7) incluíram o estudo dos leucócitos totais (90–92,96–108).

Assim sendo, após a realização do alo-HSCT, procedeu-se à análise do quimerismo em todos os doentes, tendo sido realizadas análises em diferentes momentos e de forma regular. Em média, a primeira análise iniciou-se cerca de 30 dias após o transplante, contudo os momentos seguintes para avaliação do quimerismo variaram entre estudos, encontrando-se descritos de forma pormenorizada na tabela 7 (90–92,96–108).

3.4. Principais resultados

Tal como pode ser observado nas tabelas dos resultados, cerca de 94% (n=15) dos estudos obtiveram resultados satisfatórios e pertinentes, relativamente à análise do quimerismo específico da linhagem CD34⁺, no *follow-up* dos doentes, visto que, este foi altamente preditivo de recidivas. Apenas o estudo de Zeiser et al. 2005 não obteve resultados significativos ($p < 0,05$), contudo não excluíram a possibilidade do quimerismo específico de linhagem apresentar maior sensibilidade e antecipar o quimerismo convencional, na deteção de recidivas, com intervalos de monitorização mais curtos. (90–92,96–108)

Assim sendo, destaca-se o facto da avaliação do marcador CD34⁺ ter precedido a recidiva, face aos outros marcadores, com um tempo médio entre a sua diminuição e a deteção da recidiva bastante superior ao quimerismo convencional. O estudo do marcador CD34⁺ apresentou maior sensibilidade. Relativamente ao quimerismo convencional, em cerca de 56% dos estudos, não se

conseguiu prever a recidiva e, em 25% só se verificou a sua diminuição aquando do diagnóstico morfológico de recidiva (90–92,96–108)

4. Discussão

Como referido anteriormente, apesar do alo-HSCT ser considerado uma abordagem terapêutica altamente curativa para doentes com neoplasias hematológicas, a recidiva e a progressão da doença continuam a ser as principais complicações após o transplante. Atualmente, sabe-se que o tempo médio no desenvolvimento da recidiva após o transplante é inferior a 12 meses, desta forma, torna-se fundamental a identificação destes doentes precocemente. Assim sendo, destaca-se o quimerismo como um dos biomarcadores utilizados para a monitorização destes doentes, após a realização do alo-HSCT. A sua análise fornece informação acerca da alo-reatividade ou da rejeição do enxerto, funcionando assim como um excelente fator de prognóstico. Desta forma, é possível uma melhor abordagem na recuperação hematológica das leucemias agudas e conseqüentemente uma orientação mais ajustada em intervenções preventivas, em caso de recidiva. (17–19,23,24,106)

De acordo com os estudos analisados nesta revisão e outros presentes na literatura, o CD34⁺ é considerado um marcador altamente preditivo de recidiva. Deste modo, 15 dos 16 artigos selecionados, apresentaram resultados relevantes quanto à sua monitorização em doentes que realizaram o alo-HSCT, face a outros marcadores estudados. Assim, o estudo de Thiede et al, 2002 apresentou resultados interessantes ao mostrar que 90% dos doentes com recidiva, apresentaram uma diminuição do quimerismo das células CD34⁺ (isto indica um aumento das células CD34⁺ autólogas do doente e a diminuição das células do dador). O intervalo médio entre a sua diminuição e a deteção morfológica foi cerca de 52 dias. Em contraste, relativamente aos resultados obtidos no quimerismo convencional, só se verificou a sua diminuição no momento do diagnóstico morfológico de recidiva. O estudo de Scheffold et al, 2004 demonstrou que o quimerismo das células CD34⁺ inferior a 75% foi altamente preditivo de recidiva ($p < 0,001$). Essa diminuição verificou-se cerca de 21–91 dias antes do diagnóstico de recidiva por morfologia, citogenética ou imunofenotipagem. Porém, o mesmo não se verificou através da análise do quimerismo convencional. Assim, este estudo mostrou que a análise do quimerismo das células CD34⁺, em intervalos mensais durante o 1º ano após o alo-HSCT, revelou ser um método apropriado para a monitorização da DRM. Além disso, este marcador apresentou uma sensibilidade superior, permitindo a orientação em intervenções terapêuticas, possibilitando o

tratamento precoce no sentido de prever uma possível recidiva. O estudo de Bornhäuser et al, 2009 demonstrou que a análise do quimerismo das células CD34⁺ permitiu prever a recidiva em 80% dos casos. Verificou-se que doentes com marcador CD34⁺ inferior a 80% apresentaram maior risco de recidiva ($p=0,0001$), menor sobrevida geral ($p=0,009$) e livre de doença ($p=0,001$), comparativamente com doentes que apresentaram um quimerismo das células CD34⁺ superior a 80% ($p=0,0001$). O intervalo médio entre a sua diminuição e a deteção da recidiva morfológica foi de 61 dias. No entanto, a diminuição do quimerismo convencional foi detetada apenas 9 dias antes da recidiva morfológica. O estudo de Lange et al, 2011 mostrou que a análise do quimerismo das células CD34⁺ permitiu uma associação prognóstica evidente, entre a sua diminuição (28 e 56 dias após o transplante, $p<0,001$ e $p<0,01$ respetivamente) e a recidiva iminente, com uma sensibilidade de 71% e especificidade de 91%. Assim, verificou-se que doentes com recidiva, apresentaram uma maior diminuição do quimerismo das células CD34⁺ (mediana de 73%), comparativamente com os doentes sem recidiva (mediana de 99%). Paralelamente, procedeu-se à análise do quimerismo convencional, não se tendo verificado a sua diminuição na presença de recidiva (encontrando-se semelhante aos doentes sem recidiva, $p=0,883$). Desta forma, de acordo com os resultados, a cinética do quimerismo convencional não foi um bom preditor da recidiva, pois apresentou uma sensibilidade de apenas 25%, apesar da especificidade ter sido de 92%. O estudo de Norkin et al, 2012 apresentou resultados relevantes, ao mostrar que todos os doentes com recidiva apresentaram uma diminuição do quimerismo das células CD34⁺ inferior a 15%, antes da sua confirmação a nível morfológico. Contudo, nesses mesmos doentes, o quimerismo convencional permaneceu superior a 80%. Além disso, verificou-se que a linhagem CD34⁺ manteve-se estável em todos aqueles que não apresentaram recidiva. Assim, foi possível concluir que o estudo do quimerismo das células CD34⁺ precedeu significativamente a recidiva morfológica, face aos outros marcadores. No estudo de Rosenow 2013, 43 doentes apresentaram recidiva, a qual foi detetada através da análise do quimerismo das células CD34⁺, uma vez que, foi verificada a sua diminuição e as restantes linhagens celulares mantiveram-se estáveis. Verificou-se também, que o tempo médio entre a diminuição dos níveis do marcador CD34⁺ e a confirmação de recidiva morfológica, foi de 56 dias. Para além disso, os resultados deste estudo mostraram que a rápida intervenção imunológica, aquando da deteção da diminuição do quimerismo das células CD34⁺, permitiu a sua conversão em quimerismo completo e, desta forma, impediu o aparecimento de recidiva morfológica. Doentes que mantiveram o quimerismo das células CD34⁺ estável, apresentaram em 3 anos uma sobrevida livre de recidiva

(74% vs 40%) e sobrevida geral (79% vs 52%) superior, em relação àqueles com quimerismo misto ascendente ($p < 0,05$). Assim, a monitorização do quimerismo das células CD34⁺ mostrou ser uma ferramenta valiosa na identificação de doentes em risco de recidiva após o alo-HSCT e, permitiu orientação da terapêutica na prevenção da recidiva. No estudo de Hoffmann et al, 2014 todos os 22 doentes com recidiva apresentaram o quimerismo das células CD34⁺ inferior a 80%, entre 29 e 42 dias antes da sua deteção morfológica. No entanto, o quimerismo convencional mostrou-se inferior a 94%, apenas cerca de 0 a 7 dias antes da sua deteção morfológica. Assim, a análise do quimerismo das células CD34⁺ mostrou ser um biomarcador altamente sensível e preditivo na deteção da recidiva. Além disso, a sua deteção foi significativamente mais célere, comparativamente com o quimerismo convencional ($p = 0,043$). O estudo de Terwey et al, 2014 demonstrou que um aumento do quimerismo misto ascendente foi associado a um aumento da incidência de recidiva, assim como a diminuição do quimerismo das células CD34⁺. Apesar de uma especificidade menor (70% vs 87%), o estudo da linhagem CD34⁺ apresentou uma sensibilidade superior na deteção da recidiva (79% vs 55%), em relação às outras linhagens. Verificou-se que o aumento de células CD34⁺ autólogas foi considerado um fator de prognóstico negativo para a sobrevida geral ($p = 0,003$) e foi associado a recidiva ($p = 0,017$), não se tendo verificado o mesmo em doentes com quimerismo completo ou perante a diminuição das células autólogas. Relativamente ao quimerismo das células CD34⁺, o intervalo de tempo médio entre a sua diminuição e a deteção da recidiva, foi de 116 dias. Contudo, para as outras populações celulares (células B e T) foi de apenas 25 dias ($p = 0,091$). No estudo de Zielińska et al, 2014, 2 doentes apresentaram recidiva. Em 1 deles, não foi estudada a linhagem CD34⁺ e a diminuição das outras linhagens verificou-se 6 meses após o transplante. Relativamente ao outro doente com recidiva, foi estudada a linhagem CD34⁺, a qual apresentou uma diminuição do quimerismo para 59%, ao contrário das outras linhagens, que se mantiveram perto dos 100%. De referir que, a DRM foi detetada aquando da diminuição do quimerismo das células CD34⁺, 2 meses após o transplante. Através dos resultados obtidos, os autores concluíram que o quimerismo específico de linhagem apresenta elevada sensibilidade e especificidade na deteção de recidiva. Contudo, referem que é necessário avaliar várias linhagens celulares diferentes e, a sua escolha depende do fenótipo encontrado nas células neoplásicas do doente, no momento do diagnóstico. O estudo de Preuner et al, 2016 apresentou resultados interessantes, ao mostrar que a presença de células autólogas CD34⁺ e CD8⁺ em circulação no sangue periférico (consequente diminuição do quimerismo) estava associado a um risco elevado de recidiva. Contudo, o estudo da linhagem CD34⁺ mostrou

maior significância estatística, comparativamente com as células T e leucócitos totais. Assim, doentes com recorrência de quimerismo misto relativamente às células CD34⁺, CD8⁺ ou leucócitos totais, apresentaram um risco significativamente aumentado de recidiva, com taxas de risco de 5,2% (p=0,003), 2,8% (p=0,008) e 2,1% (p=0,024) respetivamente. Isto significa que doentes com a presença de células CD34⁺ autólogas, apresentaram um maior risco de recidiva, comparativamente com as outras linhagens. A sua presença foi associada ao regime de condicionamento mieloablativo, persistência ou recorrência do tumor maligno. Desta forma, este estudo demonstrou que a análise do quimerismo específico de linhagem fornece uma abordagem sensível na deteção precoce da recidiva, destacando-se o marcador CD34⁺. O estudo de Kim et al, 2016 demonstrou que 17 dos 76 doentes apresentaram recidiva, tendo sido feita a análise simultânea do quimerismo das células CD34⁺ e convencional. Assim, avaliou-se a persistência das células CD34⁺ autólogas, quando a sua percentagem se mostrou superior a 5% e 10%. Foi possível verificar que 10 evidenciaram recidiva com uma percentagem de células CD34⁺ autólogas superior a 5% e 6 quando a percentagem se mostrou superior a 10%, com um tempo médio anterior à deteção da recidiva morfológica de 168 dias e 99 dias, respetivamente (p=0,05). Em relação à análise do quimerismo convencional, apenas 2 dos 17 doentes apresentaram recidiva, a qual foi prevista devido à presença de uma percentagem de células autólogas superior a 5%. Deste modo, verificou-se que a análise do quimerismo das células CD34⁺ apresentou maior sensibilidade e especificidade, comparativamente com a análise do quimerismo convencional, indicando que a deteção de células CD34⁺ autólogas foi altamente preditiva de recidiva. O estudo de Unnikrishnan et al, 2018 apresentou resultados relevantes ao evidenciar que, 29% (n=2) e 71% (n=5) dos doentes com recidiva apresentaram o quimerismo das células CD34⁺ inferior a 60% e 20%, respetivamente. Essa diminuição ocorreu pelo menos 30 dias antes da recidiva morfológica, em 5 desses doentes. No entanto, através da análise do quimerismo convencional, não foi possível prever a recidiva (exceto em 1 dos doentes), uma vez que, o quimerismo das linhagens de células B, T e granulócitos permaneceu acima dos 80%, um mês após a deteção da recidiva. De referir, que o mesmo se verificou em todos os doentes que não apresentaram recidiva, onde o quimerismo convencional permaneceu acima dos 80%. Assim, foi possível verificar que a análise do quimerismo das células CD34⁺ apresentou uma sensibilidade (100% vs 14%) e precisão (86% vs 46%) superior na deteção de recidiva, comparativamente com o quimerismo convencional, permitindo de uma forma mais célere, uma intervenção terapêutica mais ajustada. Além disso, o quimerismo das células CD34⁺ também apresentou superioridade

no valor preditivo positivo e negativo, face ao convencional, de 80% vs 50% e 100% vs 45% respetivamente. O estudo de Kinsella et al, 2019 permitiu identificar 3 grupos de doentes através do padrão combinado das células CD34⁺ e T: doentes com quimerismo completo em ambas as frações de células; quimerismo misto em ambas as frações; e doentes com quimerismo completo nas células CD34⁺ e quimerismo misto nas células T. Foi possível verificar que doentes com quimerismo misto na fração CD34⁺ e T, apresentaram maior risco de recidiva. Por outro lado, aqueles que apresentaram quimerismo completo em ambas as frações ou apenas na fração CD34⁺, foram associados a um menor risco de recidiva. Além disso, verificou-se que o grupo com maior sobrevida geral foi aquele em que se verificou a presença de quimerismo completo apenas na fração CD34⁺, com uma sobrevida de 75% em 5 anos. Por sua vez, aqueles que apresentaram quimerismo completo ou misto em ambas as frações, a sobrevida foi de apenas 60% e 40% em 5 anos, respetivamente. Desta forma, foi possível demonstrar que o estudo adicional das células CD34⁺ é vantajoso, pois apresenta valor prognóstico significativo, permitindo aferir quanto à recidiva de forma mais precoce ($p=0,0046$), bem como à sobrevida geral ($p=0,01$). O estudo de Das et al, 2020 apresentou resultados relevantes ao demonstrar que a análise do quimerismo da linhagem CD34⁺ superou o estudo da linhagem CD3⁺, relativamente à sensibilidade (66% vs 29%), especificidade (95% vs 93%), valor preditivo positivo (84% vs 63%) e negativo (87% vs 75%). Desta forma, demonstrou que o quimerismo das células CD34⁺ abaixo dos 80% foi altamente preditivo para recidiva, associado a uma menor sobrevida livre da doença, comparativamente com aqueles doentes que apresentaram níveis superiores a 80%. Assim, verificou-se que doentes com recidiva apresentaram uma diminuição evidente do quimerismo das células CD34⁺, não se tendo verificado o mesmo para o marcador CD3⁺, visto que, este apenas foi útil em cerca de 24% de todas as recidivas. O estudo de Bris et al, 2022 permitiu demonstrar através das curvas de ROC, que a melhor especificidade para prever a recidiva foi obtida com um limite de 90% para a análise do quimerismo das células CD34⁺ (especificidade de 91%, sensibilidade de 35% e valor $p=0,009$), demonstrando superioridade relativamente ao estudo dos leucócitos totais ($p<0,001$) e células T CD3⁺ ($p=0,01$). Além disso, verificou-se que apesar da análise do quimerismo de leucócitos totais, 30 dias após o transplante, apresentar uma boa sensibilidade (mas não superior ao marcador CD34⁺) na deteção da recidiva, o mesmo não se verificou nos dias 60, 90 quer para os leucócitos totais, como para as células T. Desta forma, estes marcadores não se correlacionaram com a recidiva. Além disso, também se verificou que doentes com quimerismo misto na linhagem CD34⁺, apresentaram menor sobrevida livre da

doença (inferior a 6 meses) comparativamente com aqueles que apresentaram quimerismo completo (2 anos). Assim, a análise do quimerismo das células CD34⁺, mostrou ser um marcador essencial na antecipação da recidiva após o transplante, bem como na avaliação da recuperação hematológica e da DRM. Por fim, o estudo de Zeiser et al, 2005 foi o único que, ao comparar a análise do quimerismo das células CD34⁺ com o quimerismo convencional, não apresentou diferenças significativas entre ambos, relativamente à sensibilidade (89% vs 86%) e especificidade (96% vs 94%), na detecção da recidiva. Um aumento do quimerismo misto ascendente foi observado cerca de 28 e 30 dias antes da recidiva morfológica, através da monitorização do quimerismo convencional e das células CD34⁺, respetivamente ($p < 0,05$). Neste estudo, verificaram-se alguns fatores que possivelmente contribuíram para estes resultados, nomeadamente: a baixa pureza das células; a possibilidade da recidiva ter sido demasiado rápida e a detecção da expansão das células autólogas não ter sido imediata; e a reduzida quantidade das amostras, que implicou a realização de um número menor de determinações e em intervalos de tempo mais longos. Desta forma, alerta-se para a importância da monitorização do quimerismo em intervalos de tempo mais curtos, principalmente em doentes de alto risco, tornando possível a detecção da recidiva mais precoce e, conseqüentemente, a rápida e atempada intervenção terapêutica. Deste modo, com intervalos de monitorização mais curtos, os autores não excluíram a hipótese do quimerismo específico de linhagem apresentar maior sensibilidade, por exemplo, análises com intervalos inferiores a 1 mês ou a 2 semanas em doentes de alto risco. (90–92,96–108)

Desta forma, a maioria dos estudos demonstraram que a monitorização do quimerismo específico da linhagem CD34⁺ mostrou ser mais vantajosa face ao quimerismo convencional, na detecção de recidiva, tendo-se verificado que o tempo médio entre a diminuição do quimerismo das células CD34⁺ e a detecção da recidiva foi bastante superior. Assim, estes resultados mostraram que a diminuição do quimerismo das células CD34⁺ está fortemente associada à evidência de recidiva e a uma menor sobrevida livre de doença, indicando o aumento de células autólogas, associado à possível presença de clones neoplásicos. Relativamente ao estudo das outras linhagens, no quimerismo convencional (células B, T, *Natural Killer*, monócitos e granulócitos), o mesmo não se constatou, ou seja, na presença de recidiva, não se verificou a sua diminuição atempada, nem mesmo grandes oscilações nas percentagens das células. Desta

forma, estes marcadores não se mostraram tão informativos no *follow-up* destes doentes, nem apresentaram superioridade face ao marcador CD34⁺, na deteção de recidiva (90–92,96–108). Embora a maioria dos estudos tenha concluído que o quimerismo das células CD34⁺ antecipou o estudo convencional na deteção da recidiva, esta revisão sistemática defrontou-se com uma limitação no que diz respeito ao número de artigos encontrados sobre o tema. Para além disso, alguns artigos referem ser necessário um maior número de doentes, para se obter resultados mais fidedignos, daí a sugestão para a realização de mais estudos nesta área, no sentido de fundamentações mais consistentes e robustas acerca da mais valia do estudo do marcador CD34⁺ na deteção da recidiva, face aos marcadores convencionais.

5. Conclusão

Através da análise e compilação de informação, foi possível obter resposta à questão de investigação formulada inicialmente, pelo que se pode inferir que os objetivos propostos para esta revisão foram amplamente atingidos. Desta forma, este estudo permitiu demonstrar a importância do estudo das células CD34⁺, no *follow-up* do alo-HSCT das leucemias agudas, face a outros marcadores existentes.

De acordo com os resultados obtidos nos estudos selecionados para esta revisão, a análise do quimerismo específico de linhagem CD34⁺ apresentou maior sensibilidade face ao quimerismo convencional, na deteção de recidiva. Assim, o estudo do quimerismo das células CD34⁺ mostrou ser uma abordagem viável e sensível para avaliar a efetivação do transplante e do prognóstico da patologia, permitindo a monitorização da evidência de recidiva. Importante referir que, perante a deteção tardia de recidiva, a probabilidade do doente se encontrar numa fase de estadiamento da doença mais avançada será maior e conseqüentemente, com pior prognóstico, o que poderá também dificultar o tratamento e, em muitos casos, condicionar a cura. Assim, o seguimento destes doentes deve ser efetuado de uma forma regular e orientada, devendo incidir não só no tratamento, mas também na prevenção e monitorização. Através deste estudo, concluiu-se que um dos marcadores mais sensíveis e relevantes para a monitorização dos doentes sujeitos a alo-HSCT é o CD34⁺.

Após o trabalho desenvolvido neste projeto e atendendo ao facto de que os resultados levantam algumas questões, consideram-se como perspetivas e trabalhos futuros: aumentar os momentos de avaliação do quimerismo nos doentes, bem como o período de acompanhamento, na tentativa de aferir de forma mais pormenorizada quanto à progressão e regressão do quimerismo, à resposta ao transplante e ao valor prognóstico.

6. Referências Bibliográficas

1. WHO - International Agency for Research on Cancer. Globocan 2020 - Global fact sheet. 2020;419:1-2. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>
2. 2020 [Internet]. Pordata. Base de Dados Portugal Contemporâneo.
3. International Agency for Research on Cancer. Cancer Today - Portugal Population Fact Sheets. 2020;501:1-2. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/620-portugal-fact-sheets.pdf>
4. International Agency for Research on Cancer. Estimated number of deaths from 2020 to 2040, Incidence, Both sexes, age [0-85+] Leukaemia [Internet]. 2020 [cited 2023 Feb 13]. Available from: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/tables?types=1&sexes=0&mode=population&group_populations=0&multiple_populations=1&multiple_cancers=1&cancers=36&populations=620&apc=cat_ca20v1.5_ca23v-1.5&group_cancers=1&years=2040
5. International Agency for Research on Cancer. Estimated number of new cases from 2020 to 2040, Incidence, Both sexes, age [0-85+] Leukaemia [Internet]. 2020 [cited 2023 Feb 13]. Available from: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/tables?types=0&sexes=0&mode=population&group_populations=0&multiple_populations=1&multiple_cancers=1&cancers=36&populations=620&apc=cat_ca20v1.5_ca23v-1.5&group_cancers=1&years=2040
6. Selim AG, Moore AS. Molecular Minimal Residual Disease Monitoring in Acute Myeloid Leukemia. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2018 Jul;20(4):389-97.
7. Rautenberg C, Germing U, Haas R, Kobbe G, Schroeder T. Relapse of Acute Myeloid Leukemia after Allogeneic Stem Cell Transplantation: Prevention, Detection, and Treatment. *Int J Mol Sci*. 2019 Jan 8;20(1):228.
8. Copelan EA, Chojecki A, Lazarus HM, Avalos BR. Allogeneic hematopoietic cell transplantation; the current renaissance. *Blood Rev*. 2019 Mar;34:34-44.
9. Sanz-Piña E, Santurtún A, Zarrabeitia MT. Forensic implications of the presence of chimerism after hematopoietic stem cell transplantation. *Forensic Sci Int*. 2019 Sep;302:109862.
10. Wong E, Mason K, Collins J, Hockridge B, Boyd J, Gorelik A, et al. Prognostic Limitations of Donor T Cell Chimerism after Myeloablative Allogeneic Stem Cell Transplantation for

- Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2017 May;23(5):840–4.
11. Blum W, Bloomfield C. Acute Leukemia in Adults [Internet]. *Conn's Current Therapy* 2021. Elsevier; 2021. 397–402 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-79006-2.00082-3>
 12. Wayne AS, Baird K, Egeler RM. Hematopoietic stem cell transplantation for leukemia. Vol. 57, *Pediatric Clinics of North America*. 2010. p. 1–25.
 13. Malard F, Mohty M. Acute lymphoblastic leukaemia [Internet]. Paris; 2020 Apr. Available from: www.thelancet.com
 14. Appelbaum FR. The Acute Leukemias [Internet]. Twentieth. Vol. 1, *Goldman's Cecil Medicine: Twenty Fourth Edition*. Elsevier Inc.; 2012. 1203–1209 p. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-53266-2.00173-9>
 15. Lee HC, Saliba RM, Rondon G, Chen J, Charafeddine Y, Medeiros LJ, et al. Mixed T Lymphocyte Chimerism after Allogeneic Hematopoietic Transplantation Is Predictive for Relapse of Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2015 Nov;21(11):1948–54.
 16. Lejman M, Zaucha-Prażmo A, Zawitkowska J, Mroczkowska A, Grabowski D, Kowalczyk JR, et al. Impact of early chimerism status on clinical outcome in children with acute lymphoblastic leukaemia after haematopoietic stem cell transplantation. *BMC Cancer*. 2019 Dec 26;19(1):1141.
 17. Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, editors. *The EBMT Handbook*. Cham: Springer International Publishing; 2019.
 18. Lejman M, Drabko K, Styka B, Winnicka D, Babicz M, Jaszczuk I, et al. Usefulness of Post-Transplant Hematopoietic Chimera Monitoring by Use of the Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction Method. *Transplant Proc*. 2017 Oct;49(8):1903–10.
 19. Cechova H, Leontovycova M, Pavlatova L. Chimerism as an important marker in post-transplant monitoring chimerism monitoring. *HLA*. 2018 Dec;92:60–3.
 20. Clemente I, Goncalo A, Faria C, Dias M, Barbosa I, Mendes C. Relevance of Chimerism Analysis After Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Transplant Proc*. 2017 May 1;49(4):890–2.
 21. Ahci M, Stempelmann K, Buttkeireit U, Crivello P, Trilling M, Heinold A, et al. Clinical Utility of Quantitative PCR for Chimerism and Engraftment Monitoring after Allogeneic Stem Cell

- Transplantation for Hematologic Malignancies. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2017 Oct 1;23(10):1658–68.
22. Bader P, Niethammer D, Willasch A, Kreyenberg H, Klingebiel T. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? Vol. 35, *Bone Marrow Transplantation*. 2005. p. 107–19.
 23. Barrios M, Jiménez-Velasco A, Román-Gómez J, Madrigal M, Castillejo J, Torres A, et al. Chimeral state is a useful predictor of relapse after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. 2003 Jul.
 24. Huisman C, de Weger RA, de Vries L, Tilanus MGJ, Verdonck LF. Chimerism analysis within 6 months of allogeneic stem cell transplantation predicts relapse in acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 2007 Mar 29;39(5):285–91.
 25. Lee HC, Saliba RM, Rondon G, Chen J, Charafeddine Y, Medeiros LJ, et al. Mixed T Lymphocyte Chimerism after Allogeneic Hematopoietic Transplantation Is Predictive for Relapse of Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2015 Nov 1;21(11):1948–54.
 26. Kricke S, Rao K, Adams S. The significance of mixed chimaerism and cell lineage chimaerism monitoring in paediatric patients post haematopoietic stem cell transplant. Vol. 198, *British Journal of Haematology*. John Wiley and Sons Inc; 2022. p. 625–40.
 27. Norkin M, Cogle CR, Leather H, Meacham A, Rosenau E, Moreb JS, et al. Monitoring of GRAFT Versus Leukemia Effect with CD34+ Specific DONOR Chimerism Analysis. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2014 Feb;20(2):S276–7.
 28. Dharmani-Khan P, Berka M, Tripathi G, England S, Storek J, Khan F. Modified chimerism approach for predicting acute myeloid leukemia relapse after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Hum Immunol*. 2019 Sep;80:39.
 29. Rodrigues CP, Shvedunova M, Akhtar A. Epigenetic Regulators as the Gatekeepers of Hematopoiesis. *Trends in Genetics*. 2021 Feb;37(2):125–42.
 30. Wei C, Yu P, Cheng L. Hematopoietic Reprogramming Entangles with Hematopoiesis. *Trends Cell Biol*. 2020 Oct;30(10):752–63.
 31. Mitchell SR, Gopakumar J, Jaiswal S. Insights into clonal hematopoiesis and its relation to cancer risk. *Curr Opin Genet Dev*. 2021 Feb;66:63–9.

32. Papa V, Marracino L, Fortini F, Rizzo P, Campo G, Vaccarezza M, et al. Translating Evidence from Clonal Hematopoiesis to Cardiovascular Disease: A Systematic Review. *J Clin Med*. 2020 Aug 2;9(8):2480.
33. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre. Vol. 100, *Cell*. 2000.
34. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov G v., Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*. 2013;499(7457):214–8.
35. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res*. 2017;7(5):1016–36.
36. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022 Jan 1;12(1):31–46.
37. King WD, Friedenreich CM, Brenner DR, De P, Demers PA, Hystad P, et al. The contribution of lifestyle, environment, genetics and chance to cancer risk in individuals and populations. *Prev Med (Baltim)*. 2015 Jul;76:132–4.
38. OMS. Data and statistics. [Internet]. 2020 [cited 2022 Dec 27]. Available from: <https://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/cancer/data-and-statistics>
39. Vinay KAAK, AJC. Diseases of White Blood Cells, Lymph Nodes, Spleen, and Thymus. In: Bowes J, ed. *Patologic Basis of Disease*. 2021; Tenth Edit. (Elsevier Inc):583–633.
40. Lemos NE, Farias MG, Kubaski F, Scotti L, Onsten TGH, Brondani L de A, et al. Quantification of peripheral blood CD34+ cells prior to stem cell harvesting by leukapheresis: a single center experience. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2018 Jul;40(3):213–8.
41. Liga Portuguesa Contra o Cancro. National Cancer Institute. [Internet]. [cited 2023 Feb 11]. Available from: <https://www.ligacontracancro.pt/leucemia-metodos-de-tratamento/>
42. Instituto Português do Sangue e da Transplantação [Internet]. [cited 2023 Feb 11]. Available from: <https://www.ipst.pt/index.php/pt/bpccu-faq/160-o-que-sao-celulas-progenitoras-hematopoieticas>
43. Mitchell SR, Gopakumar J, Jaiswal S. Insights into clonal hematopoiesis and its relation to cancer risk. *Curr Opin Genet Dev*. 2021 Feb;66:63–9.
44. Karbi G. 7 July. 2020 [cited 2023 Apr 20]. Hematopoiesis: Types of Haematopoietic Stem Cells, Process and Regulation. Available from:

<https://www.onlinebiologynotes.com/hematopoiesis-types-of-haematopoietic-stem-cells-process-and-regulation/>

45. Wayne AS, Baird K, Egeler RM. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Leukemia. *Pediatr Clin North Am.* 2010 Feb;57(1):1–25.
46. Shen Z, Gu X, Mao W, Yin L, Yang L, Zhang 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.* 2018 Dec 23;18(1):755.
47. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016 May 19;127(20):2391–405.
48. Luca DC. Update on Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma. *Clin Lab Med.* 2021 Sep;41(3):405–16.
49. Cassaday R. Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) in Adults [Internet]. 2020. Available from: www.LLS.org/Community
50. Odenike O. Acute Myeloid Leukemia [Internet]. 2019. Available from: www.LLS.org/Community
51. Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Dombret H, Ebert BL, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. 2017; Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/129/4/424/1402046/blood733196.pdf>
52. Hasserjian RP. Controversies in the recent (2016) World Health Organization classification of acute myeloid leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2021 Mar;34(1):101249.
53. Bain BJ, Béné MC. Morphological and Immunophenotypic Clues to the WHO Categories of Acute Myeloid Leukaemia. *Acta Haematol.* 2019;141(4):232–44.
54. Souza V. Classificação Morfológica French American British das Leucemias Mielóides Agudas. 2007;1–12.
55. Bain, Barbara J.; Bates, Imelda; Laffan M. *Dacie and Lewis Practical Haematology*. Twelfth ed. Elsevier;2017.
56. Walter FRARB. *Goldman-Cecil Medicine*. Twenty Six. Elsevier Inc.; 2020.
57. Rick D. Kellerman; David P. Rakel. *Conn's Current Therapy 2021*. Elsevier; 2021.

58. Test for acute lymphocytic leukemia. American cancer society. [Internet]. 2018 [cited 2023 Mar 1]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/acute-lymphocytic-leukemia/detection-diagnosis-staging/how-diagnosed.html>
59. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018 Jan 21;120(1).
60. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017 Jan 26;129(4):424–47.
61. Bewersdorf JP, Shallis RM, Boddu PC, Wood B, Radich J, Halene S, et al. The minimal that kills: Why defining and targeting measurable residual disease is the “Sine Qua Non” for further progress in management of acute myeloid leukemia. Vol. 43, *Blood Reviews*. Churchill Livingstone; 2020.
62. Tsirigotis P, Byrne M, Schmid C, Baron F, Ciceri F, Esteve J, et al. Relapse of AML after hematopoietic stem cell transplantation: methods of monitoring and preventive strategies. A review from the ALWP of the EBMT. *Bone Marrow Transplant*. 2016 Nov 13;51(11):1431–8.
63. Chojceki A. Minimal Residual Disease in Acute Myelogenous Leukemia Is Predictive, Unless You Are Over Age 60 and Treated with Decitabine. *Transplant Cell Ther*. 2021 Mar;27(3):197–8.
64. Appelbaum FR. Measurement of minimal residual disease before and after myeloablative hematopoietic cell transplantation for acute leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2013 Sep;26(3):279–84.
65. Associação Portuguesa Contra a Leucemia. Transplante de Medula e Células Estaminais. [Internet]. 2017 [cited 2023 Feb 9]. Available from: <https://www.apcl.pt/pt/doencas-do-sangue/leucemias/leucemias-agudas>
66. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Béné MC, Buccisano F, Cloos J, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2018 Mar 22;131(12):1275–91.
67. Chen X, Wood BL. Monitoring minimal residual disease in acute leukemia: Technical challenges and interpretive complexities. *Blood Rev*. 2017 Mar;31(2):63–75.
68. Buccisano F, Maurillo L, Schuurhuis GJ, del Principe MI, di Veroli A, Gurnari C, et al. The emerging role of measurable residual disease detection in AML in morphologic remission. *Semin Hematol*. 2019 Apr;56(2):125–30.

69. Haugaard AK, Kofoed J, Masmus TN, Madsen HO, Marquart HV, Heilmann C, et al. Is microchimerism a sign of imminent disease recurrence after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation? A systematic review of the literature. *Blood Rev.* 2020 Nov;44:100673.
70. Owattanapanich W, Leelakanok N, Sanpakit K, Buaboonnam J. A Comparison of the Clinical Outcomes of Haploidentical Transplantation and Other Graft Sources in Acute Lymphoblastic Leukemia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2022 Mar;22(3):174–91.
71. Park H, Byun JM, Koh Y, Yoon SS, Park H, Lee J, et al. Comparison of Different Conditioning Regimens in Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation Shows Superiority of Total Body Irradiation-Based Regimen for Younger Patients With Acute Leukemia: A Nationwide Study. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2019 Nov;19(11):e605–15.
72. Bertaina A, Andreani M. Major Histocompatibility Complex and Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Beyond the Classical HLA Polymorphism. *Int J Mol Sci.* 2018 Feb 22;19(2):621.
73. Khimani F, Dutta M, Faramand R, Nishihori T, Perez AP, Dean E, et al. Impact of Total Body Irradiation-Based Myeloablative Conditioning Regimens in Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia Undergoing Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Systematic Review and Meta-Analysis. *Transplant Cell Ther.* 2021 Jul;27(7):620.e1–620.e9.
74. Kassim AA, Savani BN. Hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: A review. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2017 Dec;10(4):245–51.
75. Wong E, Mason K, Collins J, Hockridge B, Boyd J, Gorelik A, et al. Prognostic Limitations of Donor T Cell Chimerism after Myeloablative Allogeneic Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2017 May;23(5):840–4.
76. Mishra S, Kulkarni U, Mathews N, V R, Ch. Nair S, George B, et al. A study to compare Hematopoietic Progenitor Cell count determined on a next-generation automated cell counter with flow cytometric CD34 count in peripheral blood and the harvested peripheral blood stem cell graft from autologous and allogenic donors. *Int J Lab Hematol.* 2021 Feb 14;43(1):76–83.

77. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2017 Feb 17;37(2):163–76.
78. O que é a citometria de fluxo e qual a sua aplicação para a saúde? [Internet]. 2020 [cited 2023 Jan 13]. Available from: <https://bioemfoco.com.br/noticia/o-que-e-citometria-de-fluxo-e-qual-sua-aplicacao-para-a-saude/>
79. Associação Portuguesa Contra a Leucemia [Internet]. 2017 [cited 2023 Feb 16]. Available from: <https://www.apcl.pt/pt/informacoes/seja-dador-de-medula>
80. What is Flow Cytometry? [cited 2023 Jan 13]; Available from: <https://www.akadeum.com/technology/flow-cytometry/>
81. Norooznehad AH, Malek Mohammadi A, Fumani HK, Aminian P, Jalili M, Nikbakht M, et al. Peripheral blood stem cell apheresis in low-weight children: A single centre study. *Transfusion and Apheresis Science*. 2019 Jun;58(3):300–3.
82. SUTHERLAND DR, ANDERSON L, KEENEY M, NAYAR R, CHIN-YEE I. The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry. *J Hematother*. 1996 Jun;5(3):213–26.
83. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2017 Feb 17;37(2):163–76.
84. BD Trucount™ Tubes. 2020.
85. FACS vs. Flow Cytometry: Differences Between Flow Cytometry and FACS Cell Sorting [Internet]. 2021 [cited 2023 Jan 13]. Available from: <https://www.akadeum.com/blog/flow-cytometry-vs-facs-analysis/>
86. Witek MA, Freed IM, Soper SA. Cell Separations and Sorting. *Anal Chem*. 2020 Jan 7;92(1):105–31.
87. Kriegsmann K, Löffler H, Eckstein V, Schulz R, Kräker S, Braun U, et al. CD7 is expressed on a subset of normal CD34-positive myeloid precursors. *Eur J Haematol*. 2018 Sep;101(3):318–25.
88. Benefits of Fluorescence-Activated Cell Sorting in Stem Cell Research. Bio-Rad Laboratories. [Internet]. [cited 2023 Jan 18]. Available from: <https://www.bio-rad.com/en-pt/applications-technologies/benefits-fluorescence-activated-cell-sorting-stem-cell-research?ID=Q0JH51RT8IG9>
89. Benefits of fluorescence activated cell sorting in stem cell research. BIO RAD. [Internet]. [cited 2023 Mar 21]. Available from: <https://www.bio-rad.com/en-pt/applications->

technologies/benefits-fluorescence-activated-cell-sorting-stem-cell-research?ID=Q0JH51RT8IG9

90. Bornhäuser M, Oelschlaegel U, Platzbecker U, Bug G, Lutterbeck K, Kiehl MG, et al. Monitoring of donor chimerism in sorted CD34+ peripheral blood cells allows the sensitive detection of imminent relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2009 Nov;94(11):1613–7.
91. Preuner S, Peters C, Pötschger U, Daxberger H, Fritsch G, Geyeregger R, et al. Risk assessment of relapse by lineage-specific monitoring of chimerism in children undergoing allogeneic stem cell transplantation for acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2016 May 31;101(6):741–6.
92. Unnikrishnan A, Meacham AM, Goldstein SS, Ta M, Leather HL, Cogle CR, et al. CD34+ chimerism analysis for minimal residual disease monitoring after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Leuk Res*. 2018 Nov;74:110–2.
93. Newcastle Ottawa – Quality Assessment Scale Case Control Studies and Cohort Studies [Internet]. [cited 2023 Feb 23]. Available from: https://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/nosgen.pdf
94. Luchini C, Stubbs B, Solmi M, Veronese N. Assessing the quality of studies in meta-analyses: Advantages and limitations of the Newcastle Ottawa Scale. *World J Metaanal*. 2017;5(4):80.
95. Escala de qualidade das fontes de pesquisa [Internet]. [cited 2023 Mar 9]. Available from: <https://guiadamonografia.com.br/escala-de-qualidade-fontes-pesquisadas/>
96. Thiede C, Lutterbeck K, Oelschlagel U, Kiehl M, Steudel C, Platzbecker U, et al. Detection of relapse by sequential monitoring of chimerism in circulating CD34+ cells. 2002.
97. Scheffold C, Kroeger M, Zuehlsdorf M, Tchinda J, Silling G, Bisping G, et al. Prediction of relapse of acute myeloid leukemia in allogeneic transplant recipients by marrow CD34+ donor cell chimerism analysis [7]. Vol. 18, *Leukemia*. Nature Publishing Group; 2004. p. 2048–50.
98. Zeiser R, Spyridonidis A, Wäsch R, Ihorst G, Grüllich C, Bertz H, et al. Evaluation of immunomodulatory treatment based on conventional and lineage-specific chimerism analysis in patients with myeloid malignancies after myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Leukemia*. 2005;19(5):814–21.

99. Lange T, Hubmann M, Burkhardt R, Franke GN, Cross M, Scholz M, et al. Monitoring of WT1 expression in PB and CD34 donor chimerism of BM predicts early relapse in AML and MDS patients after hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Leukemia*. 2011;25(3):498–505.
100. Norkin M, Meacham A, Ta MH, Benson N, Goldstein S, Rosenau E, et al. Peripheral Blood CD34+ Specific Donor Chimerism Analysis As an Early Indicator of Disease Relapse After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant in Patients with Myelodysplastic Syndromes and Acute Myelogenous Leukemia. *Blood*. 2012 Nov 16;120(21):3074–3074.
101. Rosenow F, Berkemeier A, Krug U, Müller-Tidow C, Gerss J, Silling G, et al. CD34 + lineage specific donor cell chimerism for the diagnosis and treatment of impending relapse of AML or myelodysplastic syndrome after allo-SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2013 Aug;48(8):1070–6.
102. Hoffmann JC, Stabla K, Burchert A, Volkmann T, Bornhäuser M, Thiede C, et al. Monitoring of acute myeloid leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation employing semi-automated CD34+ donor cell chimerism analysis. *Ann Hematol*. 2014 Feb;93(2):279–85.
103. Terwey TH, Hemmati PG, Nagy M, Pfeifer H, Gökbüget N, Brüggemann M, et al. Comparison of chimerism and minimal residual disease monitoring for relapse prediction after allogeneic stem cell transplantation for adult acute lymphoblastic leukemia. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2014 Oct 1;20(10):1522–9.
104. Zielińska P, Markiewicz M, Dzierzak-Mietła M, Kocłęga A, Białas K, Kopera M, et al. Assessment of lineage-specific chimerism after allogeneic stem cell transplantation. *Acta Haematol Pol*. 2014 Oct 1;45(4):360–9.
105. Kim A, Zhou Z, Cerny J, Ramanathan M, Raffel G, Shanahan L, et al. Role of Recipient CD34 Specific Chimerism (CSC) in the Bone Marrow (BM) to Predict BM Relapse Post Allogeneic (Allo) Stem Cell Transplant (SCT). *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2016 Mar;22(3):S343–4.
106. Kinsella FAM, Inman CF, Gudger A, Chan YT, Murray DJ, Zuo J, et al. Very early lineage-specific chimerism after reduced intensity stem cell transplantation is highly predictive of clinical outcome for patients with myeloid disease. *Leuk Res*. 2019 Aug 1;83.
107. Das T, North D, Fleming S, Kliman D, Spencer A, Wei AH, et al. Peripheral Blood CD34+ Donor Chimerism Is Superior to CD3+ Donor Chimerism for Predicting Relapse Following

Allogeneic Stem Cell Transplantation for Myeloid Malignancies. *Blood*. 2020 Nov 5;136(Supplement 1):47–8.

108. le Bris Y, Costes D, Bourgade R, Guillaume T, Peterlin P, Garnier A, et al. Impact on outcomes of mixed chimerism of bone marrow CD34+ sorted cells after matched or haploidentical allogeneic stem cell transplantation for myeloid malignancies. *Bone Marrow Transplant*. 2022 Sep 1;57(9):1435–41.