



APLICAÇÕES DA CITOMETRIA DE FLUXO DE ÚLTIMA GERAÇÃO NO DIAGNÓSTICO DE HEMOPATIAS MALIGNAS

LUIZ FLAVIO DE OLIVEIRA QUEIROZ JUNIOR; GABRIEL LIMA DE ALMEIDA; ANA LÚCIA FIGUEIREDO; TÂMARA GABRIELA DA SILVA; LAYSA MARIA FEITOSA MARTINS

RESUMO

Introdução: As hemopatias malignas englobam um grupo diverso de neoplasias hematológicas que podem evoluir de forma lenta ou agressiva, com impacto significativo na morbimortalidade global. O diagnóstico precoce é fundamental para melhorar os desfechos clínicos, sendo a citometria de fluxo uma ferramenta essencial nesse cenário. Inicialmente limitada, essa técnica evoluiu para um método multiparamétrico robusto, utilizado no diagnóstico, estratificação e monitoramento de neoplasias hematológicas. **Objetivo:** Avaliar o desempenho da citometria de fluxo de última geração (NGF) no diagnóstico e acompanhamento dessas patologias, comparando-a com a citometria convencional e outras técnicas, como PCR e sequenciamento de nova geração. **Metodologia:** Realizou-se uma revisão narrativa da literatura publicada entre 2020 e 2025, com busca nas bases PubMed, Scopus, Web of Science e SciELO. A seleção dos estudos foi orientada pela estratégia PICO, seguida pelas etapas de triagem e leitura na íntegra dos artigos elegíveis. **Resultados:** os resultados evidenciam que a NGF, com painéis expandidos, algoritmos de aprendizado de máquina e protocolos padronizados do consórcio EuroFlow, oferece maior sensibilidade e especificidade para detecção da doença residual mínima (DRM), inclusive em amostras de baixa celularidade. Na leucemia mieloide aguda e no mieloma múltiplo, a avaliação da DRM por NGF demonstrou ser fator prognóstico independente, permitindo intervenções terapêuticas mais precisas e personalizadas. A aplicação seriada da NGF também favorece a reclassificação dinâmica do risco e o monitoramento precoce de recidivas, além de reduzir a subjetividade diagnóstica. Apesar dos desafios relacionados à infraestrutura e à capacitação técnica, a padronização e a automação da NGF ampliam sua aplicabilidade e confiabilidade, posicionando-a como padrão-ouro emergente na onco-hematologia. **Conclusão:** O avanço das terapias gênicas, como a edição CRISPR/Cas9, representa uma revolução no tratamento de doenças hematológicas monogênicas, reforçando a necessidade de diagnóstico preciso e acompanhamento sensível. Assim, a NGF consolida-se como ferramenta indispensável para o manejo moderno das hemopatias malignas, com impacto direto na medicina personalizada e nos desfechos clínicos.

Palavras-chave: Monitoramento terapêutico; Neoplasias hematológicas; Doença hematológica residual;

1 INTRODUÇÃO

As hemopatias malignas constituem um grupo diverso de patologias que se desenvolvem no sangue periférico, na medula óssea ou no sistema linfático, variando desde formas indolentes, de progressão mais lenta e assintomática por anos (como certos linfomas e leucemias crônicas), até quadros agressivos de rápida evolução e alto potencial letal, como as leucemias agudas (Dall'Olio et al., 2024). Nesse contexto, essas doenças são uma das principais causas da carga tumoral global, atingindo 1.343,85 mil casos incidentes em 2019. No entanto, ainda segundo o autor, mesmo com dados limitados, a taxa de mortalidade para todos os tipos

de malignidades hematológicas tem decrescido nas últimas décadas, tendo o diagnóstico precoce como um fator decisivo nesse resultado, pois permitir intervenções terapêuticas oportunas aumentando as chances de remissão completa e reduzindo complicações clínicas graves (Zhang et al., 2023).

A citometria de fluxo, inicialmente restrita à pesquisa de parâmetros celulares básicos, transformou-se radicalmente com avanços como os anticorpos monoclonais. Hoje, é uma ferramenta essencial e multiparamétrica na rotina laboratorial biomédica, aplicada em diversas áreas como hematologia, biologia molecular e reprodução assistida. Essa técnica permite a análise detalhada de células sanguíneas, utilizando anticorpos monoclonais ligados a fluorocromos. Isso possibilita o entendimento de alterações fisiológicas e patológicas no sistema hematopoético. Na área oncológica, a imunofenotipagem por citometria de fluxo é crucial para o diagnóstico diferencial de leucemias, inclusive identificando subtipos como a LMA M0, que só é diagnosticada por essa metodologia. Ela também monitora a eficácia do tratamento ao quantificar células leucêmicas antes e depois da quimioterapia, sendo vital na detecção da doença residual mínima – a persistência de poucas células blásticas resistentes. Compreender a célula que originou a doença e seu mecanismo leucemogênico é fundamental para um tratamento eficaz. Para isso, a citometria de fluxo é combinada com outros métodos diagnósticos, garantindo um diagnóstico preciso de leucemias e seus subtipos (Martins & Gagliani, 2013).

A Citometria de Fluxo de Última Geração (NGF) está se estabelecendo como a metodologia mais sensível e padronizada para detectar a doença residual mínima (DRM) em pacientes com mieloma múltiplo (MM). Validada em comparação com técnicas convencionais de citometria de fluxo (painéis de oito cores) e sequenciamento de última geração (NGS), a

NGF incorpora inovações do Consórcio EuroFlow, como protocolos otimizados de preparação de amostras, painéis de anticorpos aprimorados e sistemas automatizados para identificação de plasmócitos usando bancos de dados de referência. Estudos prospectivos em dois centros independentes comprovaram a robustez analítica e a sensibilidade superior da NGF em relação à citometria de fluxo convencional. Seus resultados foram equivalentes aos métodos baseados em NGS, com desempenho prognóstico superior na previsão de desfechos clínicos, o que sugere o potencial da NGF como o novo padrão-ouro para a avaliação da DRM em MM (J FloresMonteiro et al., 2017).

No contexto da leucemia mieloide aguda (LMA), a avaliação da doença residual mensurável (DRM) é um desafio importante devido à heterogeneidade das plataformas tecnológicas e à falta de padronização. Apesar disso, a detecção de DRM durante a remissão morfológica, após quimioterapia convencional, é um marcador prognóstico robusto, indicando maior risco de recidiva e menor sobrevida global. O monitoramento da DRM tem se mostrado útil na estratificação de risco, na individualização do tratamento, na identificação precoce de recidivas e como desfecho substituto em ensaios clínicos. O crescente interesse de clínicos, pesquisadores e da indústria farmacêutica ressalta a urgência de harmonizar e validar os protocolos diagnósticos para consolidar o papel da DRM na prática clínica e na pesquisa da LMA (Michael Heuser et al., 2021). Um estudo recente de Takeshi Yorodaika et al. (2025) investigou a avaliação anual da DRM por NGF em pacientes com MM em manutenção contínua com lenalidomida. Os resultados mostraram que pacientes com negatividade sustentada para DRM por dois anos não apresentaram progressão da doença. Em contrapartida, aqueles que transitaram de negatividade para positividade de DRM tiveram um prognóstico desfavorável em comparação com os que mantiveram negatividade ou positividade persistente.

Dessa forma, esse cenário que abrange desde a complexidade diagnóstica das hemopatias malignas e a evolução da citometria de fluxo tradicional até o advento da Citometria de Fluxo de Última Geração (NGF) e seu impacto na detecção da doença residual mínima

(DRM), justifica a necessidade desta revisão narrativa. É crucial compilar e analisar o conhecimento atual sobre essas metodologias, especialmente no que tange à sua aplicação e ao valor prognóstico na hematologia oncológica, dada a rápida inovação tecnológica e a urgência em padronizar e otimizar os métodos para o diagnóstico, monitoramento e manejo eficaz dessas patologias. O objetivo geral desta revisão narrativa é avaliar o desempenho da citometria de fluxo de última geração (NGF) no diagnóstico e acompanhamento de hemopatias malignas, com base em evidências científicas recentes, comparando-a com a citometria convencional e outras técnicas diagnósticas. Para isso, a revisão se propõe a analisar o impacto da NGF na acurácia diagnóstica, comparar sua sensibilidade com outras técnicas na detecção da doença residual mínima (DRM), avaliar seu papel na estratificação de risco de pacientes, e investigar sua utilidade no monitoramento da resposta terapêutica, incluindo a predição de recaídas e remissão profunda.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Esta revisão narrativa foi elaborada com base em uma estratégia de busca abrangente, utilizando as plataformas MeSH e termos livres para identificar a literatura relevante. A pesquisa foi realizada com a seguinte combinação de termos: (("Hematologic Neoplasms" [MeSH] OR "Leukemia" [MeSH] OR "Lymphoma" [MeSH] OR "Multiple Myeloma" [MeSH] OR "Myelodysplastic Syndromes" [MeSH] OR "hematological malignancies" OR "blood cancer")) AND (("Flow Cytometry" [MeSH] OR "High-Throughput Screening" [MeSH] OR "Minimal Residual Disease" [MeSH] OR "next-generation flow cytometry" OR "highdimensional flow cytometry" OR "multi-color flow cytometry" OR "EuroFlow")) AND (("Diagnosis" [MeSH] OR "Prognosis" [MeSH] OR "Minimal Residual Disease"[MeSH] OR "MRD detection" OR "diagnostic accuracy" OR "disease monitoring" OR "risk stratification"))).

Foram incluídos na análise artigos originais, revisões e diretrizes publicadas entre 2020 e 2025. Os idiomas aceitos para a seleção dos artigos foram português, inglês e espanhol. Em contrapartida, foram excluídos estudos em animais, relatos de caso isolados e resumos sem texto completo. A presente revisão narrativa busca avaliar o desempenho da citometria de fluxo de última geração (NGF) no diagnóstico e acompanhamento de hemopatias malignas, comparando-a com a citometria convencional e outras técnicas diagnósticas, e analisando seu impacto na acurácia diagnóstica, sensibilidade na detecção de doença residual mínima (DRM), papel na estratificação de risco e utilidade no monitoramento da resposta terapêutica.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A citometria de fluxo de última geração (NGF), com seus painéis multiparamétricos expandidos (12, 20 ou mais núcleos), representa um avanço significativo na acurácia diagnóstica e na classificação de hemopatias malignas como leucemias agudas (LMA, LLA), mieloma múltiplo e síndromes mielodisplásicas (SMD), superando os métodos anteriores, como a citometria de fluxo convencional (4-8 núcleos) e a morfologia isolada. Em leucemias agudas, a NGF possibilita a análise simultânea de diversos antígenos, permitindo a identificação precisa da linhagem, estágio de maturação e fenótipos aberrantes, crucial para diferenciar leucemias de linhagem ambígua, subtipos de LLA e variantes de LMA, além de detectar populações minoritárias de blastos mesmo em amostras de baixa celularidade (Cai et al., 2025). A incorporação de algoritmos de aprendizado de máquina e análise multidimensional (t-SNE e FlowSOM) potencializa a discriminação de subpopulações e a identificação de padrões imunofenotípicos associados a alterações genéticas específicas, como demonstrado em estudos com painéis de 20 núcleos. No mieloma múltiplo, a NGF diferencia com precisão plasmócitos neoplásicos e normais, identificando subclones com implicações prognósticas e terapêuticas; em SMD, detecta alterações sutis na maturação de precursores mielóides e na

distribuição de subpopulações hematopoéticas, auxiliando no diagnóstico diferencial e estratificação de risco (Matthes, 2024).

Comparada a métodos anteriores, a NGF aumenta a sensibilidade e especificidade diagnóstica, reduz a subjetividade e o tempo de resultado, e permite análises em amostras de sangue periférico quando a punção de medula óssea é inviável, além de facilitar a integração com técnicas de citogenética e biologia molecular (FISH, NGS) para uma abordagem diagnóstica mais abrangente e alinhada às recomendações atuais de classificação e estratificação de risco (Lam et al., 2023; Ally et al., 2024). A NGF revolucionou a detecção e quantificação da doença residual mínima (DRM) em neoplasias hematológicas como LLA, mieloma múltiplo e LLC, oferecendo sensibilidade superior (até 10⁻⁵) e maior padronização em relação aos métodos anteriores, equiparando-se a PCR e NGS em sensibilidade. A detecção de DRM é um fator prognóstico independente para risco de recidiva e sobrevida, guiando decisões terapêuticas como intensificação ou desescalamento do tratamento (Verbeek, 2024).

No mieloma múltiplo, a NGF padronizada pelo consórcio EuroFlow alcança sensibilidade de 10⁻⁵ ou superior, identificando pacientes DRM-positivos que seriam classificados como negativos por métodos menos sensíveis, e correlacionando-se com maior sobrevida livre de progressão. A padronização e automação da NGF reduziram a variabilidade interlaboratorial, tornando a DRM por NGF um marcador robusto de resposta profunda e

prognóstico (Riva et al., 2021). A maior sensibilidade da NGF permite identificar níveis subclínicos de doença residual para intervenções precoces e personalizadas; pacientes que atingem DRM indetectável por NGF apresentam menor risco de recaída e melhores desfechos, enquanto a persistência de DRM, mesmo em níveis baixos, identifica subgrupos de alto risco que podem se beneficiar de intensificação terapêutica ou novas terapias (Logan, 2022). A NGF demonstrou ser uma ferramenta altamente sensível e reproduzível na estratificação prognóstica, com a avaliação da DRM emergindo como um dos principais marcadores preditivos de desfecho clínico; pacientes com DRM negativa após os ciclos iniciais de tratamento apresentaram taxas significativamente superiores de sobrevida livre de progressão (PFS) e sobrevida global (OS) (Flores-Montero et al., 2017). A NGF também detecta alterações discretas em precursores hematopoéticos em SMD, confirmando o diagnóstico mesmo sem alterações morfológicas clássicas, e serve como instrumento essencial para o monitoramento sensível da resposta terapêutica e reclassificação dinâmica do risco (van Dongen et al., 2012).

No monitoramento terapêutico, a NGF permite a identificação precisa da DRM em diferentes fases do tratamento, fornecendo subsídios para decisões terapêuticas individualizadas; pacientes com DRM negativa após indução apresentaram desfechos mais favoráveis em OS e PFS (De la Torre, 2024). A aplicação seriada da NGF no seguimento pós-tratamento detectou precocemente a reemergência de clones neoplásicos semanas antes da manifestação clínica ou hematológica da recidiva, possibilitando intervenções precoces, e auxiliou na diferenciação entre repopulação hematopoética normal e recidiva verdadeira após transplante, evitando tratamentos desnecessários (Charalampous & Kourelis, 2022). A NGF permite a reclassificação dinâmica do risco, onde pacientes de baixo risco com DRM detectável são reavaliados para terapias mais intensivas, enquanto aqueles com resposta imunofenotípica profunda podem ser poupados de terapias agressivas (van der Velden et al., 2023). A automação e padronização da NGF, como pelos protocolos EuroFlow, aumentaram a reprodutibilidade intra e interlaboratorial, consolidando a NGF como ferramenta confiável para diagnóstico, estratificação prognóstica e monitoramento. Observou-se que a padronização promoveu ganhos na sensibilidade diagnóstica, permitindo a identificação de populações celulares aberrantes em frequências inferiores a 0,01%, e a automação facilitou o processamento em larga escala, ampliando a aplicabilidade da técnica (BloodCancer, 2024).

Apesar dos desafios como o alto investimento e a necessidade de treinamento

especializado, a automação e padronização da NGF são fundamentais para consolidar práticas diagnósticas mais precisas, construir bancos de dados robustos e viabilizar a validação regulatória de biomarcadores, ampliando seu uso na medicina personalizada. Portanto, os resultados reforçam que a padronização e automação da NGF são componentes estratégicos para garantir a qualidade, confiabilidade e aplicabilidade clínica dos dados gerados, posicionando a NGF como ferramenta indispensável para a prática da onco-hematologia moderna, sustentada por evidências robustas e comparabilidade internacional.

4 CONCLUSÃO

A citometria de fluxo de última geração (CFUG) firmou-se como uma ferramenta essencial na onco-hematologia moderna, impulsionando diagnósticos mais precisos, detecção de doença residual mínima com alta sensibilidade, e um guia para a estratificação de risco e o monitoramento do tratamento. Esses avanços têm um impacto direto na melhora dos desfechos para pacientes com hemopatias malignas. A contínua evolução da tecnologia, aliada à integração de inteligência artificial (IA) e à padronização, promete solidificar ainda mais seu papel na medicina personalizada do futuro.

Em paralelo aos progressos diagnósticos, inovações terapêuticas como a tecnologia CRISPR/Cas9 emergiram como estratégias altamente promissoras e com grande potencial curativo. Essas abordagens visam doenças genéticas, como as hemoglobinopatias, que resultam de mutações em genes que codificam as cadeias de globina, levando à produção anormal ou insuficiente de hemoglobina. Nos últimos cinco anos, a pesquisa e os ensaios clínicos nessa área têm avançado rapidamente, consolidando a edição gênica como uma verdadeira revolução terapêutica. A edição gênica por CRISPR/Cas9 já é uma realidade clínica para hemoglobinopatias, com eficácia e segurança demonstradas em ensaios clínicos, especialmente para a reativação da hemoglobina fetal (HbF) via BCL11A. O campo segue em rápida evolução, com novas estratégias e alvos moleculares em desenvolvimento, e a aprovação regulatória do exa-cel marca um marco histórico na terapia gênica de doenças monogênicas (Paschoudi et al., 2023).

REFERÊNCIAS

ALLY, F.; CHEN, X. Acute Myeloid Leukemia: Diagnosis and Evaluation by Flow Cytometry. **Cancers** (Basel), v. 16, n. 22, p. 3855, 17 nov. 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39594810/>. Acesso em: 11 jul. 2025.

CAI, Q. et al. Flow cytometry in acute myeloid leukemia and detection of minimal residual disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 564, p. 119945, 1 jan. 2025. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39209245/>. Acesso em: 11 jul. 2025.

CHARALAMPOUS, C.; KOURELIS, T. Minimal residual disease assessment in multiple myeloma patients: Minimal disease with maximal implications. **Frontiers in Oncology**, v. 11, p. 801851, 2022.

DALL'OLIO, D. et al. Emerging signatures of hematological malignancies from gene expression and transcription factor–gene regulations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 24, p. 13588, 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39769352/>. Acesso em: 10 jul. 2025.

DE LA TORRE, P. et al. Minimal residual disease in multiple myeloma: defining the role of next generation sequencing and flow cytometry in routine diagnostic use. **Canadian**

Hematology Today, v. 3, n. 3, 2024.

FLORES-MONTERO, J. et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. **Leukemia**, v. 31, n. 10, p. 2094–2103, out. 2017.

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

LAM, S. J.; HUI, H. Y. L.; FULLER, K. A.; ERBER, W. N. Assessing chromosomal abnormalities in leukemias by imaging flow cytometry. **Methods in Cell Biology**, v. 195, p. 71–100, 2025. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40180455/>. Acesso em: 11 jul. 2025.

LOGAN, A. C. Measurable residual disease in acute lymphoblastic leukemia: How low is low enough? Best Practice & Research. **Clinical Haematology**, v. 35, n. 4, p. 101407, dez. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36517126/>. Acesso em: 11 jul. 2025.

MARTINS, D. M.; GAGLIANI, L. H. Importância da citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das leucemias. **UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 5, p. 5–24, 2013.

MATTHES, T. Phenotypic Analysis of Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Populations in Acute Myeloid Leukemia Based on Spectral Flow Cytometry, a 20-Color Panel, and Unsupervised Learning Algorithms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 5, p. 2847, 29 fev. 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38474094/>. Acesso em: 11 jul. 2025.

PASCHOUDI, K.; YANNAKI, E.; PSATHA, N. Precision editing as a therapeutic approach for β -hemoglobinopathies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 11, 2023.

REALFONZO, S. et al. Real-life sensitivity of flow cytometry minimal residual disease assessment in multiple myeloma. **Blood Cancer Journal**, 2024.

RIVA, G. et al. Multiparametric Flow Cytometry for MRD Monitoring in Hematologic Malignancies: Clinical Applications and New Challenges. **Cancers (Basel)**, v. 13, n. 18, p. 4582, 12 set. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34572809/>. Acesso em: 11 jul. 2025.

VAN DER VELDEN, V. H. J. et al. Clinical relevance of MRD detection in ALL. **Haematologica**, v. 108, n. 1, p. 1-3, 2023.

VANDONGEN, J. J. M. et al. EuroFlow antibody panels for standardized ndimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. **Leukemia**, v. 26, n. 10, p. 1908-1975, 2012.

VERBEEK, M. W. C.; VANDER VELDEN, V. H. J. The Evolving Landscape of Flowcytometric Minimal Residual Disease Monitoring in B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 9, p. 4881, 30 abr. 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38732101/>. Acesso em: 11 jul. 2025.

YOROIDAKA, T. et al. Prognostic value of minimal residual disease detected by EuroFlow next-generation flow cytometry and next-generation sequencing in patients with multiple myeloma achieving complete response and receiving lenalidomide maintenance after autotransplant: a prospective comparison study. **Haematologica**, 17 abr. 2025.

ZHANG, N. et al. Global burden of hematologic malignancies and evolution patterns over the past 30 years. **Blood Cancer Journal**, v. 13, n. 82, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37193689/>. Acesso em: 10 jul. 2025.