

NOVAS TÉCNICAS PARA DETECÇÃO DE DOENÇA RESIDUAL EM NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS: REVISÃO SISTEMÁTICA

GM Guedes, MF Rezende, LO Campos, LS Salgarello

Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brasil

Objetivos: Objetivou-se analisar e sintetizar as novas técnicas emergentes para a detecção de doença residual mínima (DRM) em neoplasias hematológicas, identificando avanços tecnológicos como Polymerase Chain Reaction digital (PCRd), sequenciamento de nova geração (NGS) e citometria de fluxo multiparamétrica (CFM). Buscou-se comparar sua eficácia, precisão diagnóstica, sensibilidade e especificidade, além de avaliar sua aplicação clínica em diferentes tipos de neoplasias hematológicas, com o objetivo de compreender seu impacto no prognóstico e na tomada de decisões terapêuticas. **Materiais e métodos:** Realizou-se revisão sistemática da literatura com trabalhos nos idiomas português e inglês, publicados nos últimos 5 anos, nas bases de dados científicos PubMed e Scientific Electronic Library Online (SciELO), a partir dos descritores “Minimal Residual Disease Detection” e “Minimal Residual Disease Detection in Hematologic Malignancies”. **Resultados:** A revisão revela melhorias substanciais na precisão e eficácia dos novos métodos para a identificação da DRM. A técnica de PCRd permite a detecção de quantidades absolutas de pequenas amostras de material genético, aumentando a acurácia na análise molecular e refinando a detecção de alterações genéticas em neoplasias hematológicas. Analogamente, o NGS avançou na cobertura genética e na bioinformática, proporcionando uma análise mais abrangente do perfil genético das células tumorais e identificando mutações com alta sensibilidade. Além disso, os recentes avanços em bioinformática têm aprimorado a precisão e agilidade na interpretação dos dados do NGS. Em paralelo, a CFM foi aprimorada para analisar múltiplos marcadores simultaneamente, aumentando a sensibilidade e a resolução na identificação de pequenas quantidades de material genético e expandindo sua aplicação clínica para monitoramento e ajuste de estratégias terapêuticas. **Discussão:** Como apresentado, esses métodos revolucionaram o diagnóstico da DRM, proporcionando uma avaliação mais precisa e detalhada na prática clínica das neoplasias hematológicas. Isso permite a personalização do manejo terapêutico, facilitando ajustes rápidos nas terapias conforme necessário. Dessa forma, viabiliza-se um tratamento mais preciso, com menor exposição a terapias não efetivas e reduzindo os efeitos colaterais. Considerando esses avanços, é fundamental analisar as indicações específicas de cada técnica. O PCRd é eficaz na detecção de pequenas quantidades de material genético em leucemias, como a leucemia linfoblástica aguda (LLA) e leucemias mieloides agudas (LMA), além de linfomas não-Hodgkin. O NGS oferece uma análise abrangente do perfil genético em LMA e linfomas. Por sua vez, a CFM é útil no monitoramento de LLA e mieloma múltiplo, permitindo a análise simultânea de múltiplos marcadores. Essas técnicas se complementam, proporcionando uma abordagem adaptativa e eficaz no manejo das neoplasias hematológicas. **Conclusão:** Conclui-se que

os métodos diagnósticos supracitados impactam profundamente o manejo clínico da DRM, possibilitando um diagnóstico apurado e precoce, além de uma abordagem terapêutica adequada. Contudo, não são amplamente difundidos, sobretudo devido ao alto valor atribuído. Ainda assim, devem ser encaradas como escolhas assertivas para identificação da DRM, quando necessário, se bem indicadas.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2024.09.326>

CORRELAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DE CRLF2 POR CITOMETRIA DE FLUXO E FISH EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS B

FA Sousa, EX Souto, LC Bento, BG Nogueira, RMSO Safranauskas, EDRP Velloso, NS Bacal

Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), São Paulo, SP, Brasil

Introdução/Objetivo: A leucemia linfoblástica aguda B Ph like ou BCR::ABL1 like (LLA-B Ph-like) constitui um subtipo genético da LLA-B, mais frequente em crianças e adultos jovens, em pacientes de origem hispânica e apresenta risco adverso. A LLA-B Ph-like é definida por um perfil de expressão gênica semelhante ao da LLA B Ph+, porém não há o rearranjo t(9;22) (q34;q11;2)/BCR::ABL1, apresenta alterações genéticas moleculares envolvendo várias vias das quinases incluindo fusões das classes ABL, rearranjos EPOR/JAK, alterações da via JAK-STAT, mutações RAS, ou alterações desconhecidas na via da quinase. A “cytokine receptor-like factor 2” (CRLF2), localizada no cromossomo Xp22.3 e Yp11.3 é hiperexpressa em aproximadamente metade das LLA-B Ph-like. A expressão de CRLF2 pode ser avaliada por métodos quantitativos por PCR, FISH ou por citometria de fluxo. Como sabemos atualmente novos anticorpos monoclonais estão sendo utilizados por Citometria de Fluxo (CF), para prever alterações genéticas/moleculares. Este é um estudo retrospectivo para determinar a expressão do antígeno CRLF2 através da CF e comparar com o teste de hibridização in situ de fluorescência (FISH) em pacientes com diagnóstico de LLA-B. **Materiais e métodos:** Foram avaliadas 24 amostras de Medula Óssea e 2 de Sangue Periférico ao diagnóstico de pacientes com LLA-B durante o período de janeiro/2022 a junho/2024. Na CF o painel utilizado para o diagnóstico foi composto por CD15FITC/CD13PE/CD33PC5.5/CD34PC7/CRFL-2APC/CD19APC-700/CD25PB/CD45KO e a expressão do antígeno CRLF2 foi avaliada através da porcentagem deste marcador, as amostras foram adquiridas no Navios Flow Cytometry (Beckman Coulter - BC) e analisadas no Kaluza (BC). Os rearranjos CRLF2 foram identificados pela técnica de FISH utilizando a sonda Breakapart CRLF2 (Xp22.33/Yp11.32) (Cytocell). **Resultados:** Observamos que as idades variaram de 24 a 44 anos. Na CF a hiperexpressão de CRLF2 foi detectada em 4 (16,6%) pacientes, sendo que nestes, o FISH também demonstrou rearranjo de CRLF2. Além disso, a expressão de CD10 de forte intensidade estava presente em 3 destes pacientes e a expressão aberrante de CD13 e CD33 em dois deles. A expressão de CRLF2 foi negativa em 20 (83,4%) pacientes na CF, e nestes o FISH não apresentou o rearranjo

do gene CRLF2. Portanto, houve uma concordância de 100% entre os resultados da CF tanto nos casos positivos, quantos nos negativos para CRLF2, com equivalência estatística entre as metodologias de $r=1$. **Discussão:** A interação entre caracterização imunofenotípica e genotípica pode definir subtipos distintos de LLA B com valores preditivos de sobrevida e influenciar nas decisões terapêuticas. Portanto, a utilização de marcadores imunofenotípicos que predizem alterações moleculares é bastante útil no diagnóstico e monitoramento de doença residual mensurável na LLA B. A citometria de fluxo é a principal ferramenta para o diagnóstico de LLA e pode ser também um método de triagem para direcionar o estudo genético e molecular. **Conclusão:** A CF permite uma detecção rápida, de baixo custo e confiável de LLA-B com hiper expressão de CRLF2.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2024.09.327>

CITOMETRIA DE FLUXO MULTIPARAMÉTRICA NA AVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA E SEGUIMENTO DE CÉLULAS TUMORAIS METASTÁTICAS EM TUMORES SÓLIDOS PEDIÁTRICOS – TUBO STOT (“SOLID TUMOR ORIENTATION TUBE”)

ARF Fingolo^a, EB Riscarolli^a, CA Abraham^a, PM Lima^a, GSGA Xavier^a, E Oliveira^a, PFR Siqueira^a, RC Torres^a, VC Lisboa^a, R Camargo^b, RM Pontes^b, CSF Facio^a, ES Costa^a

^a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^b Hospital da Criança de Brasília José Alencar (HCB), Brasília, DF, Brasil

Células tumorais metastáticas na medula óssea são encontradas em cerca de 15% dos pacientes pediátricos ao diagnóstico. A detecção precisa do envolvimento metastático é essencial para o estadiamento, estratificação terapêutica e prognóstico. A citometria de fluxo multiparamétrica (CFM) é uma ferramenta indispensável para o diagnóstico e seguimento de neoplasias hematológicas. Porém, pouco explorada para diagnóstico e seguimento de tumores sólidos não-hematopoiéticos. Nesse estudo, desenvolvemos um método de detecção e identificação de células tumorais metastáticas na medula óssea por citometria de fluxo multiparamétrica. Para o processamento, alíquotas de medula óssea foram submetidas a uma solução de cloreto de amônio (BulkyLise) para lise de hemácias. As amostras foram marcadas com um painel de anticorpos monoclonais para orientação de tumores sólidos (STOT): cyCD3+CD271/ CD45/ CD8+CD99/ nuMiogenina/ CD4+EpCAM/ CD56/ GD2/ smCD3+CD19+FVS780 (marcador de viabilidade). Foram adquiridos 5 milhões de eventos (ou a amostra total) em um citômetro FACSCantoII® (BDB), com a utilização do FACSDiVa® (BDB) e a análise dos dados foi feita através do Infinicyt® (Cytognos). Um total de 135 amostras de medula óssea de 86 pacientes; mediana de idade 3 anos (0-18 anos); de 3 centros pediátricos brasileiros (IPPMG, INCA e Hospital José Alencar) e 2 Europeus (Ghent e Monza); com

suspeita de câncer pediátrico foram estudados com um tubo de 12 marcadores/8 cores, STOT- “Solid Tumor Orientation Tube” para detecção de células metastáticas tumorais. Dessas amostras, 45/135 (33%) estavam infiltradas por células metastáticas (31 neuroblastomas, 5 rhabdomyosarcomas, 9 neoplasias hematológicas - 4 LLAB, 4 LMA, 1 LLAT). A mediana do número de eventos adquiridos foi de 4.000.000 de eventos adquiridos ($6,5 \times 10^4 - 1 \times 10^7$) com um limiar de detecção de 1×10^{-5} (mediana 1,2%; 0,0038% a 96,8%), 28/136 (20%) pacientes sem neoplasias malignas e 62/135 (45,5%) livres de doença (estadiamento de pacientes com câncer). A concordância entre o diagnóstico histopatológico/imunohistoquímico (HP/IQ) foi de 97,8%, sendo que em 3/45 (6,5%) amostras infiltradas por neuroblastoma, as células metastáticas foram detectadas apenas pela CFM e não pela HP/IQ, devido a sua baixa frequência (0,012 até 9,5), com uma sensibilidade de 100% e especificidade de 96,74%. O diagnóstico de infiltração metastática da medula óssea por citometria de fluxo é amplamente utilizado na rotina diagnóstica e detecção de doença residual mínima para neoplasias hematológicas, mas não para neoplasias não-hematológicas. Nesse estudo, a técnica da CFM apresentou resultados preliminares superiores à técnica “padrão-ouro” atual HP/IQ com uma taxa de concordância de 97,8. Nossos resultados sugerem que, a detecção de células metastáticas de neoplasias não-hematológicas por citometria de fluxo através do STOT podem integrar o fluxo diagnóstico da rotina dos laboratórios, acelerando a detecção do envolvimento metastático. A implementação na rotina clínica da CFM para diagnóstico e seguimento de neoplasias não-hematológicas pode permitir o diagnóstico em sítios menos invasivos, acrescentar informações valiosas para estratificação terapêutica e avaliar resposta ao tratamento.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2024.09.328>

CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES POR CITOMETRIA DE FLUXO DE NOVA GERAÇÃO EM TUMORES SÓLIDOS PEDIÁTRICOS – BIÓPSIA LÍQUIDA PARA DIAGNÓSTICO E SEGUIMENTO

CA Abraham^{a,b}, EB Riscarolli^{a,b}, ARF Fingolo^{a,b}, PM Lima^{a,b}, GSGA Xavier^{a,b}, VC Lisboa^{a,b}, E Oliveira^{a,b}, PFR Siqueira^{a,b}, RC Torres^{a,b}, R Camargo^c, RM Pontes^c, CSF Facio^{a,b}, ES Costa^{a,b}

^a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^b Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^c Hospital da Criança de Brasília José Alencar (HCB), Brasília, DF, Brasil

Objetivos: Células tumorais circulantes (CTCs) são células raras no sangue periférico de pacientes com câncer, refletindo o estado tumoral em tempo real. A detecção de CTCs pode indicar disseminação metastática e formação de