

cytometry in the peripheral blood of 18 donors. 100 μL of blood (with a leukocyte concentration between 5 and $10 \times 10^3/\mu\text{L}$) was incubated with monoclonal anti-human antibodies (CD45 PerCp, CD133 APC, CD31 FITC, and CD146 PE). FACS lysing solution was used for red blood cell removal. 300,000 events or the total volume of the tube were acquired using a FACSCalibur® flow cytometer (4). To determine the number of cells/ μL , the percentage of events was multiplied per number of leucocytes and divided per 100. Cell culture from venous blood was used to isolate ECFCs which were confirmed by their cobblestone morphology and immunophenotyping for endothelial markers (CD31, CD146, CD309, and CD144). **Results:** ECFC isolation was successful in 9 out of 18 donors (1 male, 8 females; mean age: 35.8 ± 11.1 years), and not successful in the other half of donors (2 male, 7 females; mean age: 37.7 ± 9.7 years). CEC frequency was significantly higher ($p=0.004$) in the group with successful ECFC isolation when compared to the group that did not yield ECFCs (2.9 ± 1.2 CECs/ μL against 1.2 ± 0.8 CECs/ μL). This suggests that the success in ECFC isolation might be related to the number of CECs, and therefore ECFC mobilization into circulation may also be linked to vascular injury. **Conclusion:** Increased number of CECs might be associated with the success of ECFCs isolation.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.10.757>

IMPORTÂNCIA DO CONSERVANTE TRANSFIXNA AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO: EXPERIÊNCIA DE UM SERVIÇO DE CITOMETRIA DE FLUXO DE UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO

HZ Costa ^a, LB Azevedo ^b, CC Cardoso ^a,
IM Santos-Pirath ^a, LO Walter ^c, LV Silva ^a,
NL Souza ^a, S Gkionis ^a, MC Santos-Silva ^{a,b,c}

^a Hospital Universitário Polydoro Ernani de São
Thiago, Universidade Federal de Santa Catarina
(HU/UFSC/EBSERH), Florianópolis, SC, Brasil

^b Residência Integrada Multiprofissional em Saúde,
Hospital Universitário Polydoro Ernani de São
Thiago, Universidade Federal de Santa Catarina
(RIMS/HU/UFSC/EBSERH), Florianópolis, SC, Brasil

^c Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Santa Catarina (PGFAR/
UFSC), Florianópolis, SC, Brasil

Objetivos: O envolvimento do sistema nervoso central (SNC) por neoplasias hematológicas é considerado uma complicação grave em pacientes com leucemias e linfomas. A análise do líquido cefalorraquidiano (LCR) por citometria de fluxo (CF) é bastante estabelecida e possui papel importante na definição prognóstica e avaliação de resposta ao tratamento dessas doenças. Porém, a degeneração celular rápida que ocorre neste material leva à necessidade de processamento imediato da amostra. Nesse sentido, o conservante celular Transfix® (Cytomark) tem sido amplamente utilizado, pois as amostras de LCR podem ser processadas em até 18-72h, sem perda celular. Assim, o objetivo do presente estudo

foi avaliar as amostras de LCR antes e depois do estabelecimento do protocolo de coleta com Transfix®, em um Hospital Universitário. **Material e métodos:** Foram incluídas no estudo 142 amostras de LCR sem Transfix® e 142 com Transfix®. As amostras sem Transfix® colhidas entre 11/2017 e 09/2019 foram encaminhadas ao setor de CF em seringas contendo 1-10mL de LCR. A partir de 10/2019, tubos de EDTA 4mL contendo 100uL de Transfix® foram encaminhados às unidades do Hospital. As amostras com Transfix® obtidas entre 11/2019 e 04/2021 foram colhidas diretamente no tubo de EDTA/Transfix® contendo 1-4mL de LCR. Os LCR sem Transfix® foram processados imediatamente, enquanto aqueles colhidos com Transfix® foram acondicionados a 2 a 8°C até o momento do processamento (máximo 72h). Para a análise estatística, foram incluídos apenas os LCR com mais de 10 células analisadas. A quantidade de células analisadas representa o valor presente no laudo, obtido pelo software Infinicyt™ após a remoção de restos e agregados celulares. **Resultados:** A quantidade de células analisadas foi avaliada em 135 amostras de LCR sem Transfix® e 141 com Transfix®. A mediana de células no grupo sem Transfix® foi de 1.335 células (31 - 998.336 células) e do grupo com Transfix® foi de 1.347 células (20 - 1.000.000 células). Não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,279$). Seis amostras sem Transfix® não apresentaram células e outra apresentou apenas quatro células. Já no grupo com Transfix®, não havia células em apenas uma amostra. **Discussão:** Para prevenir a perda celular que ocorre logo após a coleta do LCR, a técnica da coleta desse material em tubos EDTA/Transfix® tem sido amplamente utilizada com objetivo de detecção de células hematológicas neoplásicas por CF. De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, não houve diferença na quantidade de células analisadas na fase pré e pós Transfix®. Porém, na fase pré Transfix® as amostras foram processadas imediatamente após a coleta. Já na fase pós Transfix® foi possível processá-las em até 72h. Essa vantagem traz tranquilidade e organização para o serviço responsável pela coleta e envio ao laboratório, assim como para o setor de CF. Além disso, na fase pré Transfix® houve maior número de amostras com ausência de células, enquanto na fase pós Transfix® este fato aconteceu apenas em uma ocasião. **Conclusão:** A experiência com o uso do conservante Transfix® para avaliação de LCR por CF tem sido positiva, pois facilita a coleta, o transporte e o processamento dessas amostras.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.10.758>

INCLUSÃO DO ANTICORPO TCRB1 NO PAINEL LINFOPROLIFERATIVO T - EXPERIÊNCIA COM RELATO DE DOIS CASOS

CMR Franzon, I Sousa, BL Scarpato,
AOM Wagner, ACW Lopes

Laboratório Médico Santa Luzia/DASA,
Florianópolis, SC, Brasil

Objetivos: O diagnóstico de doenças linfoproliferativas T normalmente são um desafio devido a dificuldade de diferenciar



as células T patológicas de células reacionais e também pela limitação dos testes de clonalidade atualmente disponíveis. O TCRB1 trata-se de um anticorpo monoclonal específico para a região 1 da constante da cadeia Beta do receptor de células T TCR, detectando populações clonais de células T TCRab positivas. O objetivo do presente trabalho é relatar a experiência de dois casos de análise imunofenotípica com doenças linfoproliferativas de células T TCRab+ com a inclusão do anticorpo TCRB1 no painel linfoproliferativo T. **Materiais e métodos:** O painel linfoproliferativo T utilizado na rotina baseado no protocolo Euroflow teve a incorporação de um tubo adicional com o objetivo de melhorar a sensibilidade do teste. O tubo teve a inclusão do anticorpo TCRB1 na cor PE associado com os marcadores âncora CD45V500, CD3PerCpcy5, CD4V450 e CD8APCH7. **Relato dos casos-caso 1:** Paciente de 61 anos, sexo feminino, indicação clínica de linfocitose em hemograma com predomínio de linfócitos granulares. A amostra enviada para avaliação imunofenotípica foi de sangue periférico. **Caso 2:** Paciente de 55 anos, sexo masculino, indicação clínica de linfonodomegalia e suspeita de linfoma. A amostra enviada para avaliação imunofenotípica foi biópsia de linfonodo. **Resultados** **Caso 1:** Amostra de sangue periférico apresentava 60% de células de linhagem T, expressando fortemente marcador CD3 no citoplasma, expressão positiva de CD4, CD2 e marcadores NK: CD56, CD16 e Perforin citoplasma, fraca expressão de CD3 na membrana, CD8, CD5, TCR alfa/beta e expressão parcial de CD7. Observado também expressão positiva restritiva de TCRB1, indicativo de clonalidade do receptor TCR. A conclusão do laudo foi de Leucemia de Células T Grandes e Granulares. **Caso 2:** Amostra de biópsia de linfonodo apresentava 22% de células de linhagem T com fraca expressão de CD3 de membrana, CD4, CD5 e TCR alfa/beta, expressão positiva de CD2 e PD1 e ausência de CD7 e CD8. Observado também expressão positiva restritiva de TCRB1, indicativo de clonalidade do receptor TCR. A conclusão do laudo foi Síndrome Linfoproliferativa Crônica de Células T. **Discussão:** O TCRB1 detecta populações clonais de células T TCRab positivas, nos casos em que sua expressão é monotípica, ou seja, sua aplicação e similar a restrição de cadeia leve para imunoglobulina na detecção de linfoproliferações de células B. Nas células normais T CD3+ TCRab+, a expressão desse marcador é polipítica, ou seja, cerca de 50% da população normal tem expressão positiva para esse marcador e a população negativa (que expressão a região 2 da constata da cadeia beta) aproximadamente com o mesmo percentual. Estudo recentes, demonstraram alta especificidade desse teste para clonalidade, desde que associado com um painel linfoproliferativo ampliado e padronizado. Os presentes casos, demonstraram boa correlação para amostras em sangue periférico e biópsia de linfonodo. **Conclusão:** As doenças linfoproliferativas T persistem como um desafio diagnóstico, devido a dificuldade de um teste simples para avaliação de clonalidade. No presente caso, a inclusão do anticorpo TCRB1 ao painel linfoproliferativo padronizado baseado no protocolo Euroflow aumentou a especificidade do teste para diagnóstico de doenças linfoproliferativas T, sendo um método de rápida execução e com um custo compatível a rotina laboratorial.

REFERÊNCIA

1. Horna P, Shi M, Olteanu H, Johansson U, et al. Emerging role of cell receptor constant/chain-1 expression in the flow cytometric diagnosis of t-cell malignancies. *Int J Mol Sci.* 2021;22:1817.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.10.759>

NEUTRÓFILOS DE BAIXA DENSIDADE (LDNS) EM PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME



BC Leal ^{a,b}, E Moritz ^a, MS Figueiredo ^a,
AF Sandes ^{a,b}, JO Bordin ^a

^a Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP, Brasil

^b Grupo Fleury, Brasil

Introdução: Os neutrófilos são células efetoras importantes do sistema imune inato e correspondem às células mais frequentes do sangue humano. De acordo com o gradiente de densidade, os neutrófilos podem ser classificados em duas subpopulações: neutrófilos de alta densidade (HDNs) e neutrófilos de baixa densidade (LDNs). Estudos mostram que, em condições inflamatórias, ocorre um aumento de neutrófilos LDNs e que estes apresentam uma maior capacidade promover inflamação. **Objetivos:** Analisar quantitativamente as subpopulações de neutrófilos de pacientes com Doença Falciforme em comparação aos indivíduos saudáveis. **Materiais e métodos:** Foram coletadas amostras de sangue periférico de 17 pacientes com doença falciforme e 8 indivíduos saudáveis. As amostras obtidas foram utilizadas para a dosagem de hemograma e separação das subpopulações em duas camadas por gradiente de densidade em protocolo com Ficoll. As subpopulações leucocitárias foram avaliadas nos dois gradientes de densidade por citometria de fluxo de oito cores, utilizando os anticorpos CD13, CD11b, CD16, CD45 e CD177. A análise estatística foi realizada pelo programa SPSS. **Resultados:** Na camada de baixa densidade, pacientes com Doença Falciforme apresentaram maior número de LDNs em comparação com o Grupo Controle (3,85% vs. 0,18%; p=0,001). De acordo com a maturação neutrofilica, o compartimento de LDNs na Doença Falciforme é composto por um maior número de LDNs maduros (CD13+/CD16+/CD11b+) em comparação ao Grupo Controle (69% vs. 6,28%; p=0,011), enquanto o número de neutrófilos imaturos está reduzido (30,1 vs. 93,7%; p=0,011). O número de monócitos na camada de baixa densidade também foi superior na Doença Falciforme (35,9% vs. 26,8%). **Discussão:** Nossos resultados mostram um aumento de neutrófilos de baixa densidade nos pacientes com Doença Falciforme. Estudos recentes associam o aumento do número de LDNs em doenças inflamatórias, como o de Li et al (2019) em pacientes com Síndrome Trombocitopênica associada a Febre Elevada e Ramanathan et al (2017) em pacientes com Artrite Idiopática Juvenil. **Conclusão:** Os achados preliminares neste estudo sugerem que a elevação da subpopulação de neutrófilos LDN na Doença Falciforme pode estar associada ao modelo inflamatório proposto por Jablonska et al em 2017. Entretanto, o número de