

ONCO-HEMATOLOGIA

CITOMETRIA DE FLUXO

COMPARAÇÃO DO PAINEL EUROFLOW AML/MDS E CLEARLLAB M1/M2 NA CITOMETRIA DE FLUXO HEMATOLÓGICA PARA DIAGNÓSTICO DE LMA E SMD: VANTAGENS E DESAFIOS

GHM Oliveira ^{a,b}, AO Sales ^a, SDDN Medeiros ^a,
CCO Ramos ^a, TB Guimaraes ^a, RDA Soares ^a,
E Fernandes ^a, MF Lima ^a, HCG Duarte ^a,
RS Barroso ^b

^a Getulio Sales Diagnósticos (GSD), Natal, RN, Brasil

^b FlowMentor - Diagnóstico Integrado e Citometria de Fluxo, São Paulo, SP, Brasil

Objetivo: Este estudo teve como objetivo comparar o painel Euroflow AML/MDS e a estratégia com tubos secos ClearLab M1 e M2 na citometria de fluxo hematológica para o diagnóstico de leucemia mieloide aguda (LMA) e neoplasia mielo-displásica (SMD). Avaliamos sensibilidade, precisão e aplicabilidade de ambos os painéis. **Métodos:** Foram analisados 10 casos de LMA e 10 casos de SMD usando o painel Euroflow AML/MDS (8 cores) e o ClearLLab M1 e M2 (10 cores) para os mesmos pacientes. Os parâmetros investigados incluíram a sensibilidade e precisão dos anticorpos em comum entre os painéis, bem como a estratégia de análise utilizada. **Resultados:** Não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos em relação à sensibilidade e precisão dos anticorpos. No entanto, o ClearLLab M1 e M2 demonstrou maior facilidade na detecção dos marcadores aberrantes CD7, CD15, CD19 e CD123, que são nativos nos primeiros tubos do painel ClearLLab, enquanto para obtê-los no painel Euroflow, seria necessário utilizar tubos adicionais. Foi observado que o ClearLLab M1 e M2 apresenta um maior desafio na avaliação de promonócitos e monoblastos devido à ausência do marcador IREM-2. Além disso, a ausência dos marcadores eritróides CD36 e CD71 no ClearLLab impossibilita a análise fenotípica de diseritropoiese e aplicação do Red Score nas SMD. No entanto, identificamos que o citômetro DxFLEx - Beckman plataforma de 13 cores, oferece a possibilidade de inserção manual (*Drop In*) desses marcadores no ClearLLab, o que pode mitigar essas limitações. **Discussão:** A ausência do marcador IREM-2 no ClearLLab M1/M2 torna o diagnóstico de leucemias que envolvem a linhagem monocítica mais desafiador, e a ausência do Red Score pode dificultar uma avaliação mais precisa nas SMD. No entanto, a flexibilidade oferecida pelo DxFlex, permitindo *drop in* abre novas perspectivas para aprimorar a estratégia de análise. **Conclusão:** O painel ClearLLab M1 e M2, apesar de apresentar algumas limitações na avaliação de certas populações celulares e no Red Score em SMD, é uma opção mais econômica e rápida em comparação com a estratégia Euroflow. A possibilidade de inserção manual dos marcadores ausentes no ClearLLab usando o citômetro de fluxo com 13 cores pode ser uma alternativa viável para superar essas limitações. Considerando a escassez de profissionais especializados em citometria de fluxo no Brasil, a possibilidade de utilizar um tubo seco com todos os marcadores necessários simplifica o processo laboratorial, torna a técnica

mais acessível e confiável pois ao utilizar tubos secos, há uma diminuição do risco de erros operacionais relacionados a pipetagem de anticorpos, minimizando erros e a necessidade de repetição de testes. ClearLLab é uma alternativa econômica, padronizada, estável e pode viabilizar a realização de exames hematológicos avançados em diversas regiões do país.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.318>

ESTUDO RETROSPECTIVO DO FENÓTIPO DAS LEUCEMIAS AGUDAS “EARLY PRÉ-T” NO ESTADO DE SANTA CATARINA

MDH Périco, RS Kalfeltz, AOM Wagner,
AO Ferri, FC Delagnello, LC Bortoluzzi,
PGB Prim

Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC), Florianópolis, SC, Brasil

Objetivos: descrição dos casos de leucemias “Early Pre-T” no Estado de Santa Catarina. **Resultados:** De 01 de abril de 2019 a 30 de março de 2023, no Laboratório de Marcadores Celulares do Hemosc foram diagnosticados 517 novos casos de Leucemias Agudas, dentre os quais 4 casos de Leucemia Aguda “Early Pré-T” (ETP-ALL). A ETP-ALL, um subtipo de leucemia supostamente originado de progenitores hematopoieticos comuns para linhagens linfóide e mieloide, exibe características fenotípicas linfóides, mielóides e de células-tronco. Ainda que o quadro clínico da ETP-ALL seja semelhante ao da Leucemia Linfóide Aguda T (LLA-T), a ETP-ALL está associada a maior taxa de recaída, falha na indução e sobrevida global menor. A imunofenotipagem da ETP-ALL caracteriza-se pela ausência de CD1a e CD8, menos de 75% de blastos com expressão de CD5, e expressão de um ou mais dos seguintes antígenos em pelo menos 25% das células: CD117, CD34, HLADR, CD13, CD33, CD11b e/ou CD65. Um sistema de pontuação baseado na expressão de 11 marcadores (CD5 CD8 CD13 CD33 CD34 HLA-DR CD2 CD3 CD4 CD10 CD56), com especificidade de 100% e sensibilidade de 94%, distingue a ETP-ALL (score ≥ 7) da LLA-T clássica (score ≤ 6). Caso 1: 14 anos, aspirado de medula óssea (AMO) com 38% de blastos CD45+dimcyCD3-/+ CD34+ CD117-/+ CD13+25% CD33++ CD7+ + CD11b-/+ CD45RA+ CD99++ Tdt-/+ CD123+ CD38+ CD5+40% CD44+; negativos CD3 CD1a CD2 CD4 CD8 TCR CD19 cyCD79a CD10 HLA-DR. SCORE +11. Caso 2: 65 anos, AMO com 95% de blastos CD45+dimcyCD3+ CD34+25% CD117+ HLADR+/++ CD13+ CD7++ CD99+ Tdt+ CD123+ CD38+ CD44+dim; negativos: CD11B CD33 CD15 CD3sup CD1a CD2 CD4 CD5 CD8 CD25 CD56 CD19 CD10 cyCD79a. SCORE +11. Caso 3: 9 anos, amostra de sangue periférico (SP) com 92,1% de blastos CD45+ cyCD3+ CD34+ CD117-/+ HLADR-/+ CD13+20% CD33+ CD10-/+ CD4-/+ cyCD79a+30% CD7++ CD45RA+ CD2+10% CD99+ CD38+ CD44+ +; negativos CD11B CD16 MPO CD19 Tdt CD3sup CD1a CD5 CD8 TCR. SCORE +9. Caso 4: 45 anos, SP com 88,5% de blastos CD45+dimcyCD3+dim CD34+ CD117+ HLADR+ CD13+ CD2+ CD7++ Tdt+ CD15+ CD123+ CD38+; negativos: CD11B CD33 CD3 CD1a CD4 CD5 CD8 CD56 TCR. SCORE +10. **Discussão:** Apesar da complexidade dos casos descritos, foi possível

através de um amplo painel de marcadores e do sistema de pontuação proposto diagnosticá-los fenotipicamente. A triagem foi realizada com o protocolo Euroflow - tubo 1 para Síndrome Mielodisplásica / Leucemia Mieloide Aguda (LMA) e *Acute Leukemia Orientation Tube* (ALOT). Nos casos 1 e 3 (blastos com expressão fraca ou negativa de HLA-DR e fraca expressão de CD13, CD117), o painel foi estendido para LLA-T. Nos casos 2 e 4 (blastos HLA-DR, CD13 e CD117 positivos), o painel foi estendido para LMA. **Conclusão:** Mesmo marcados com diferentes painéis, os 4 casos foram inequivocamente classificados como ETP-LLA com auxílio do sistema de pontuação, sendo utilizados 45 a 48 marcadores por paciente. Demonstra-se portanto que é possível, e necessário, pela gravidade e pior evolução, diagnosticar as ETP-LLA com os painéis já utilizados habitualmente na rotina dos laboratórios de citometria de fluxo.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.319>

ESTUDO RETROSPECTIVO DO FENÓTIPO DAS LEUCEMIAS AGUDAS COM SWITCH DE LINHAGEM NO CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DE SANTA CATARINA (HEMOSC)

AOM Wagner, MDH Périco, AO Ferri, FC Delagnello, LC Bortoluzzi, RS Kalfeltz, PGB Prim

Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC), Florianópolis, SC, Brasil

Objetivos: Descrição de 2 casos de leucemias com Switch de linhagem, diagnosticados no HEMOSC. **Resultados:** Caso 1: 1a5m, amostra de sangue periférico (SP) com 86% de células imaturas (CD45+dim) com sinais de diferenciação a monócitos (CD64+ CD4+ CD36+ CD11b-/+) e aberrância fenotípica (NG2+ CD19-/+ CD123+) - diagnóstico Leucemia Aguda de Linhagem Monocítica. Estudos citogenético e molecular não realizados (indisponíveis no serviço SUS onde a paciente foi tratada). Iniciado protocolo St Jude 2002 – 1 indução e 3 consolidações– doença residual mensurável (DRM) por citometria, de controle após esses ciclos abaixo de 0,1%; 6m após apresentou recidiva isolada em sistema nervoso central (SNC) com 99% de blastos linfoides B (CD45+dim CD19+ CD10-/+ CD22+) e avaliação de medula óssea (MO) negativa. Tratamento substituído por BFM; após 4m 2ª recidiva em SNC, agora associada à recidiva medular com blastos de Leucemia Linfoblástica Aguda B (LLA-B). Protocolo modificado para R3; manteve MO com blastos linfoides B, e SNC variando entre positivo e negativo. Após 1a6m do diagnóstico apresentou troca de linhagem em amostra de MO com 18% de blastos (CD45+dim CD64+ CD15++ CD33++ CD19+dim CD22(-) NG2+), novamente com derivação à linhagem mieloide, e liquor com 70% de blastos linfoides B. Reiniciado protocolo R3 associado a Bortezomib. Após 3m do protocolo seguia com LLA-B em SNC e MO. Óbito por sepse durante nova tentativa de indução. Caso 2: 9m, SP com 82% de células imaturas (CD45-/dim) linfoides B (cyCD79A+ CD19+) com alterações de fenótipo (CD73+ CD304-/ NG2-/+) - diagnóstico de LLA-B. Cariótipo 46XY [20];

BioMol rearranjo MLL; avaliação SNC: 76% de blastos linfoides B. Iniciado protocolo Interfant - após bloco MARMA DRM 0,02%. Iniciou Blinatumumab com resposta; submetido a TMO Alogênico não aparentado; 4m após recidiva da doença sem resposta a 2 ciclos de Blinatumumab - iniciado protocolo R3+Bortezomib; nesse momento apresentou switch de linhagem com blastos derivando à linhagem monocítica (CD45+dim CD64+ CD15+ CD33+ NG2+) - trocado tratamento para azacitidina e Venetoclax 2 cursos, seguido de terapia com CAR-T cell. Apresentou uma 4ª recidiva com óbito. **Discussão:** Leucemias com switch de linhagem ao longo do tratamento são extremamente raras, mais frequentes na infância e normalmente associadas à presença do rearranjo do KMT2-A. A transdiferenciação é uma forma de reprogramação dos progenitores hematopoiéticos, que passam a apresentar diferenciação a uma linhagem distinta, sendo mais observada a mudança de precursor linfóide B para precursor mieloide. Nos casos apresentados tivemos mudança de linhagem mieloide para linfóide B, primeiramente em SNC e após medular, e no segundo caso switch Linfóide B para Mieloide em MO. **Conclusão:** Apesar da complexidade dos casos descritos, sabe-se que a presença do rearranjo KMT2A está ligada à transdiferenciação das células progenitoras, e pode ser associada à expressão de NG2 nos blastos, marcador detectado por citometria de fluxo. Sendo assim, o estudo molecular das leucemias NG2+ é primordial para a estratificação de gravidade destes pacientes e programação de terapia.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.320>

LINFOMA T/NK – RELATO DE CASO

MDH Périco, RF Cardoso, AOM Wagner, AO Ferri, FC Delagnello, LC Bortoluzzi, RS Kalfeltz, PGB Prim

Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC), Florianópolis, SC, Brasil

Objetivo: descrever caso de paciente jovem com diagnóstico de Linfoma T/NK. **Resultados:** Masc., 42a, inicia com linfonomegalia cervical e inguinal. Submetido a PET-CT em 28/04/23: linfonomegalias nas regiões inguinais, ilíacas, pericavais, paraaórtica esquerda, retrocraurais, em hilos pulmonares e diversos compartimentos do mediastino, axilares e cervicais, além de hipermetabolismo difuso na medula óssea e esplenomegalia. Realiza biópsia de linfonodo inguinal em 05/05/23 – Imunohistoquímica liberada em 21/05/23 – Células patológicas positivas para BCL2 CD10 CD4 CD5 CD7 CD8 Tdt, KI67+100%, CD3+ difuso, padrão citoplasmático. Evoluiu com piora progressiva do quadro clínico e pancitopenia. Coletado aspirado de medula óssea em 26/05/23 para Imunofenotipagem, apresentando: - 15% de células linfoides T (CD3++) MADURAS (CD45++) POLICLONAIS: . 3,8% CD4+ TCR ALFA/BETA+ (TCRCBETA1+ 50% - REF NORMAL 15 A 85%); . 8,8% CD8+ TCR ALFA/BETA+ (TCRCBETA1+ 20%); . 0,5% CD8+ TCR GAMA/DELTA+; . 1,3% CD4+CD8+ TCR ALFA/BETA+ (TCRCBETA1+ 30%); . 0,6% duplo-negativos: 0,1% TCR ALFA/BETA+ E 0,5% TCR GAMA/DELTA+ - 4,1% de células NK CD56+ CD3(-) CD8-/ CD4(-); - 11,3% de células linfoides maduras