

# RELATO DE CASO: SOBREPOSIÇÃO DE ANEMIA APLÁSTICA (AA) COM HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA (HPN), COM EVOLUÇÃO PARA LEUCEMIA AGUDA DE FENÓTIPO MISTO

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

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

**Objetivo:** Descrever caso de paciente jovem com pancitopenia severa e clones HPN, que evoluiu rapidamente para Leucemia Aguda de fenótipo misto. **Resultados:** Paciente masc., 21 anos, sem comorbidades prévias, procura serviço de saúde com anemia e plaquetopenia. Recebe transfusão de plaquetas e hemácias; alta com Prednisona 40 mg para investigação ambulatorial. Suspeita inicial: mielofibrose. **13/12/22:** Imunofenotipagem: Medula Óssea (MO) apresentando alterações fenotípicas em granulócitos e em precursores CD34 (6,5%). Cariótipo: 46,XY[20]. Biópsia: MO hipocelular para a faixa etária (20-30%), com hiperplasia eritroide relativa, sem evidência de malignidade. Hipótese diagnóstica: AA Severa? HPN? **10/01/23:** Amostra de sangue periférico apresentando: \* Clones HPN II e III em granulócitos (12,5%), monócitos (0,1%) e eritrócitos (5%); \* 6% de células CD34++ mieloides com poucos sinais de diferenciação e com expressão parcial de CD7: CD45+dim CD34++ CD117+/++ HLADR+ CD13+ CD33+ CD7-/-; Antígenos negativos: NG2 CD56 CD2 CD64 CD35 IREM CD14. \* 22% de monócitos em vários estágios de diferenciação - 5,7% imaturos (CD14-/-; IREM-2, CD56 e NG2 negativos). Hipótese diagnóstica Overlap AAS/HPN - encaminhado ao ambulatório de Falência Medular. **06/02/23:** Reavaliação de medula para TMO: MO com 55% de células CD45+dim CD34+ HLADR+: \* 30,2% mieloides (CD117+ CD13+ CD33-/-) pouco diferenciadas (CD15-/- MPO-/-) com alterações de fenótipo (CD7-/- TDT-/-); \* 24,8% linfoides B (CD19+ CD22+ cyCD79A+ CD10+) com alterações de fenótipo (CD13+ CD304+); \* 20% série monocítica (CD64++): 2,3% monoblastos CD34+ CD117-/- CD14(-) CD35(-) IREM2(-); 4,5% promonócitos CD34, CD117, CD14 e IREM-2 negativos com expressão assíncrona de CD35; 6,6% monócitos imaturos CD14+ CD35+ IREM-2(-) com HLADR+dim; 6,6% monócitos maduros CD14+ CD35+ IREM-2+. **Interna para Indução em 09/02/23. 09/03/23:** MO com 17% de blastos linfoides B, 14% de blastos mieloides e 7% monócitos maduros. **28/04/23:** MO com 8% de blastos linfoides B, 19% de blastos mieloides e 16% monoblastos+promonócitos. Apresentou refratariedade à quimioterapia e foi a óbito. **Discussão:** Os achados anatomopatológicos associados aos achados fenotípicos e à rápida progressão para LMA sugerem que este paciente tenha uma Síndrome Mielodisplásica Hipoplásica (SMD-h). A SMD-h e a anemia aplástica (AA) são caracterizadas por pancitopenia com medula óssea hipocelular e compartilham características clinicopatológicas, dificultando o diagnóstico diferencial. Neste caso observam-se ainda clones HPN, demonstrando a sobreposição das 2 doenças. A OMS não reconhece a SMD-h como uma entidade distinta; estes pacientes são tipicamente mais jovens, têm citopenias mais graves, maior dependência transfusional e menor percentual

de blastos em comparação às SMDs normo/hipercelulares. **Conclusão:** A citometria de fluxo é indispensável na diferenciação de AA/SMD-h, uma vez que ambas têm MO hipoplásicas. A rápida evolução para Leucemia Aguda mostra a gravidade deste caso, e a necessidade da identificação adequada das SMD-h.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.323>

## ANÁLISES AVANÇADAS EM CITOMETRIA DE FLUXO COM R 4.3.0: CLUSTERING EM PERFIL LINFOCITÁRIO

IAF Bahia <sup>a,b</sup>, SC Fortier <sup>c</sup>, GHM Oliveira <sup>b,d</sup>,  
GBC Junior <sup>a,d</sup>, EM Cordeiro <sup>a</sup>, ES Junior <sup>b</sup>,  
FCM Theodoro <sup>a</sup>, RD Lima <sup>a</sup>, RE Martins <sup>a</sup>,  
RS Barroso <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
(UFRN), Natal, RN, Brasil

<sup>b</sup> Flowmentor, São Paulo, SP, Brasil

<sup>c</sup> Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São  
Paulo (ISCMSP), São Paulo, SP, Brasil

<sup>d</sup> Hemocentro Dalton Cunha (HEMONORTE), Natal,  
RN, Brasil

**Objetivo:** O objetivo deste estudo é explorar abordagens computacionais avançadas em análises de citometria de fluxo, com foco na utilização das bibliotecas R para manipulação de dados imunofenotípicos. Os métodos são comparados na abordagem em análise de perfil linfocitário, buscando otimizar a identificação e caracterização das populações celulares B, T e NK. **Metodologia:** A análise do perfil linfocitário foi realizada através do software Kaluza em um primeiro momento, como base comparativa para a aplicação no R através da importação, pré-processamento e transformação destes dados usando a biblioteca flowCore. Em sequência, a correção de artefatos e melhora da qualidade foi realizada através da biblioteca flowAI. A abordagem de clustering foi então realizada nas bibliotecas immuneClust e FlowSOM. Por fim, outras ferramentas foram exploradas criticamente de forma a otimizar a manipulação e exposição de dados imunofenotípicos, principalmente no que diz respeito ao racional de gates para definição e caracterização das populações celulares, sendo as principais bibliotecas relacionadas às ggcyto, openCyto, flowWorkspace e CytoML. **Resultados:** A aplicação das bibliotecas R possibilitou uma análise mais completa, automatizada e semisupervisionada das populações B, T e NK. A utilização das bibliotecas de Clustering, com destaque para o FlowSOM, permitiram uma identificação mais precisa das populações celulares, revelando subpopulações complexas que não seriam facilmente detectadas por métodos tradicionais, como na sistemática de gates através de dotplots. Além disso, a aplicação das bibliotecas ggcyto, openCyto, flowWorkspace e CytoML trouxeram possibilidades interessantes para a abordagem e averiguação dos resultados, favorecendo o desenvolvimento e exposição multivariada dos dados imunofenotípicos, seja a critério de controle interno ou liberação do laudo. **Discussão:** As abordagens de clustering avançadas proporcionam insights mais profundos sobre a heterogeneidade celular

nas amostras analisadas no perfil linfocitário, sendo também possível a aplicação destas em uma maior variedade de casos. Estes métodos computacionais elucidam a identificação de padrões relevantes nas amostras analisadas, o que é especialmente importante em estudos com grandes quantidades de dados, onde torna-se possível a aplicação de estudos de *big-data* e *machine learning*, além do comparativo com a literatura relacionada, a exemplo do entendimento e definição da ontogenia das populações B, T e NK, frente à diferentes quadros clínicos. Por fim, a visualização dos dados celulares pode ser retratada de forma mais completa, com recursos mais variados que podem reforçar o rigor e acompanhamento analítico. **Conclusão:** A integração de bibliotecas R especializadas, como *FlowSOM*, *OpenCyto*, e outras, proporcionou uma análise mais robusta e eficiente dos dados de citometria de fluxo. As abordagens avançadas de clustering permitiram identificar as populações B, T e NK, além de caracterizar subpopulações com maior precisão e eficiência, favorecendo o entendimento da ontogenia das mesmas. Essas técnicas têm o potencial de impulsionar significativamente a pesquisa e clínica em citometria de fluxo, trazendo novos parâmetros de análise e abrindo novas possibilidades para o controle interno e entrega dos resultados, por exemplo, na investigação e monitoramento de processos biológicos complexos, além do auxílio no desenvolvimento e acompanhamento de terapias personalizadas.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.324>

#### ACUTE MYELOID LEUKEMIA WITH A RARE IMMUNOPHENOTYPE AND COMPLEX GENETIC PROFILE

JFDS Tosi, AR Severino, CM Bertolucci,  
LGR Barbosa, M Higashi, ER Mattos,  
MRV Ikom-Colturato

Hospital Amaral Carvalho (HAC), Jaú, Brazil

Acute Myeloid Leukemia (AML) presents a wide immunophenotypic variability and defining molecular alterations, used for the revised WHO 2022 classification. The genetic profile is also used for risk stratification according to the European LeukemiaNet (ENL) 2021 and treatment definition. Here we present a case with an unusual immunophenotype and complex genetic alterations. Case report: 42-year-old woman, with increased menstrual flow in the last 10 days and no other alterations. On physical examination, she was in good condition, with slight paleness, without hemorrhagic suffusions, absence of lymph node enlargement and hepatosplenomegaly. Complementary tests showed Hb 9.4 g/dL WBC 2850/mm<sup>3</sup> (2% blast cells) Platelets 48,000/mm<sup>3</sup> Fibrinogen 56 mg/dL (normal: 200 – 400), normal biochemistry and coagulogram. The myelogram showed massive infiltration by hyper granular blasts suggesting basophilic leukemia. Immunophenotyping revealed 3 blast populations, all expressing cyMPObright, CD13, CD33bright, CD34, CD38dim/negative, CD44, CD45intermediate, CD45RA, CD96, CD97, CD99, CD123, CD244, CLL1, TIM3. The differences between the expressions

of the blast populations were: 1st population (41%) expressed partial CD7, CD117bright and homogeneous, heterogeneous HLA-DR (positive to negative), not expressing CD11b and CD203c; 2nd population (40%) expressed CD11b, CD203c bright, without expressions of CD7 and HLA-DR (basophilic component); 3rd population (19%) did not express CD7, CD11b, CD203c and HLA-DR (promyelocytic component). The 3 populations did not express cyCD3, SmCD3, CD4, CD10, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD42a+CD61, CD54, CD56, CD64, CD71, cyCD79a, CD105, CD300e. This profile was consistent with AML with basophilic and acute promyelocytic (APL) components. The karyotype was complex: 46,XX, del(3)(p21), del(5)(q15), t(15;17)(q22;q21)[6]/46,XX[14]. The NGS panel revealed the presence of the PML::RARA gene fusion, negative for NPM1, FLT3 ITD and TKD mutations and others. The patient was treated with Cytarabine plus Daunorubicin (7+3) and ATRA. Assessment of measurable residual disease (MRD) by flow cytometry (FC) on D28 of induction showed 0.2% non-APL myeloblasts and 0.29% basophilic blasts. Despite preventive therapies, the patient experienced life-threatening bleeding and sepsis, but had a favorable outcome. She received 2 cycles of consolidation and maintenance therapy. FC MRD and PML::RARA RT-PCR was undetectable after the 2 consolidation cycles and during maintenance therapy. PML::RARA was also undetectable at the end of therapy and 3 months later. The probability of severe bleeding in APL with the concomitant presence of basophilic blasts has already been described, as was seen in this case. The patient had a good therapeutic response. Monitoring MRD in AML is essential to guide treatment, and the methods must be complementary, especially in cases with multiple leukemic clones. The identification of different leukemia clones by immunophenotype reflected the genetic complexity of this case. Therefore, it is important to integrate diagnostic methods for better patient management.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.325>

#### FLOW CYTOMETRY IMMUNOPHENOTYPING OF HEALTHY PLATELETS AND HOSPITALIZED PATIENTS WITH SUSPECTED PLATELET DYSFUNCTION: CHALLENGES FOR ESTABLISHING A CUTOFF VALUE

DK Cecconello<sup>a</sup>, F Spagnol<sup>b</sup>, AP Alegretti<sup>b</sup>,  
DA Pilger<sup>a</sup>, MG Farias<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
(UFRGS), Porto Alegre, Brazil

<sup>b</sup> Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil

**Introduction/Objective:** Platelets play an essential role in hemostasis, for their characterization, several platelet surface glycoproteins (GP) were identified as GPIIb, evaluated by the expression of CD41, and non-covalently binds to GPIIIa, recognized by the CD61 marker, making up the GPIIb-GPIIIa complex (CD41/CD61). GPIX is identified by CD42a and GPIb by CD42b that interacts together with GPV (CD42d), forming the