

resultados das biópsias renais, relativos à rejeição ao transplante, foram coletados de prontuários médicos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. **Resultados e discussão:** Foram encontrados níveis plasmáticos mais elevados de CXCL10 ($p = 0,010$) e MCP-1 ($p = 0,007$) em pacientes transplantados com rejeição ao enxerto renal, em relação àqueles com função renal estável. Esses resultados estão de acordo com estudos prévios que demonstraram a capacidade desses biomarcadores em detectar precocemente o risco de falha do transplante renal. Além disso, níveis aumentados de CXCL10 e MCP-1 foram associados à insuficiência renal e a um pior prognóstico do transplante. A quimiocina CXCL10 é produzida por neutrófilos ativados, monócitos, eosinófilos, dentre outras células. É capaz de regular a resposta imune inata e adaptativa, afetando a função das células T e B. A proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1) atua no recrutamento de monócitos, células T de memória e células dendríticas para o local da inflamação. Apesar dos resultados encontrados, CXCL10 e MCP-1 não são utilizados rotineiramente na prática clínica. **Conclusão:** Os biomarcadores inflamatórios avaliados (CXCL10 e MCP-1) foram relacionados ao desfecho clínico de pacientes transplantados renais no presente trabalho. Ambos poderiam ser utilizados juntamente aos marcadores usuais para uma monitorização mais precisa de pacientes transplantados renais, fornecendo um suporte para as estratégias terapêuticas.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.1522>

AVALIAÇÃO DE DOENÇA RESIDUAL MENSURÁVEL POR CITOMETRIA DE FLUXO EM PACIENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO: VALIDAÇÃO DO TUBO DURACLONE RE PC (BECKMAN COULTER)

FA Sousa, LC Bento, AC Vaz, D Schimidell, MS Passaro, BG Nogueira, PC Miyamoto, EX Souto, NS Bacal

Laboratório de Análises Clínicas, Citometria de Fluxo, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brasil

Objetivo: Validação do tubo de reagentes seco DuraClone RE PC (Beckman Coulter-BC) na detecção de células plasmáticas residuais por citometria de fluxo (CF) por meio da comparação com o método atual padronizado baseado nas recomendações Euroflow através da combinação de anticorpos monoclonais líquidos. **Métodos:** Foram utilizadas sete amostras de medula óssea (MO) de pacientes em tratamento para neoplasias plasmocitárias para a avaliação de doença residual mensurável (DRM) e duas amostras de controle de qualidade externo do programa CAP. Comparamos a capacidade do tubo DURACLONE RE PC (CD81, CD27, CD19, CD200, CD138, CD56, CD38, CD45) com um painel de dois tubos na configuração oito cores contendo anticorpos monoclonais líquidos (CD38, CD138, CD56, CD19, CD20, CD45, CD28, CD27, CD117, CD81, cyKappa e cyLambda). Foi utilizado o equipamento FACS Canto II (Becton Dickinson – BD) para o painel de anticorpos monoclonais líquidos e Navios (BC) para o tubo

DURACLONE RE PC. As análises de ambos os painéis foram realizadas no software Infinicity (Cytognos) e comparadas com o software Kaluza (Beckman Coulter). Os dados foram plotados em planilhas de Excel e avaliados através teste de correlação. **Resultados:** A média do número total de eventos adquiridos do DuraClone foi de 1.198.689 (771.269 a 1.700.000), permitindo boa sensibilidade para o ensaio CF em comparação ao método padronizado, que foi de 2.465.072 (2.063.042 a 3.146.628), que por ser nosso método padrão foi utilizado maior volume amostral para marcação deste painel. Foi observado uma boa correlação entre o DURACLONE e o método padrão em valores percentuais na identificação de doença residual mensurável para mieloma múltiplo ($R^2 = 0,9854$) e boa correlação no percentual de células plasmocitárias normais ($R^2 = 0,9942$). Apesar da diferença do número de eventos adquiridos, ambas as metodologias apresentaram concordância na conclusão diagnóstica em todos os casos avaliados. **Conclusões:** O tubo DURACLONE RE PC demonstrou bom desempenho na pesquisa de DRM em MM. A utilização do tubo de reagentes secos na prática clínica já está bem estabelecida e nos permite redução de custos por diminuir erros técnicos de pipetagem, redução no tempo de processamento, melhora a eficiência do laboratório, simplifica o controle de inventário de reagentes e titulação dos anticorpos. Entretanto sua utilização deve ser realizada com cautela, devido a falta dos anticorpos CD117, CD28 e imunoglobulinas intracitoplasmática kappa e lambda, que podem limitar a identificação de fenótipos aberrantes. Como solução alternativa equipamentos com configuração > 10 cores, existe a flexibilidade de adicionar mais marcadores nas fluorescências vagas.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.1523>

VALIDAÇÃO DO MÉTODO PCR EM TEMPO REAL PARA DIAGNÓSTICO DE CITOMEGALOVÍRUS E DOS POLIOMAVÍRUS BK E JC EM AMOSTRAS DE PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS

MLMV Corgozinho^a, S Vilaça^b, A França^c, AGG Oliveira^a, LV Alves^a, JKP Reis^a, BEF Mota^a, APL Mota^a

^a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil

^b Hospital Felício Rocho (HFR), Belo Horizonte, MG, Brasil

^c Target Medicina de Precisão, Belo Horizonte, MG, Brasil

Introdução e objetivo: Os poliomavírus e citomegalovírus são vírus ubíquos na população que permanecem latentes em vários tecidos de indivíduos portadores. A reativação viral pode ocorrer em receptores do transplante renal e pode levar a leucoencefalopatia multifocal progressiva e nefropatia associada ao poliomavírus JC, nefropatia crônica do enxerto associada ao poliomavírus BK, complicações gastrointestinais, hematológicas e respiratórias associadas ao citomegalovírus humano. Vários testes diagnósticos foram desenvolvidos, mas ainda não existe uma padronização bem estabelecida

para detecção dos poliomavírus. O objetivo do presente estudo foi desenvolver uma validação da reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa em tempo real (qPCR) para permitir a detecção exata e precisa de citomegalovírus e dos poliomavírus BK e JC em amostras de pacientes transplantados renais. **Materiais e métodos:** Foram coletadas 92 amostras de plasma e 89 de urina de pacientes transplantados provenientes do Hospital Felício Rocho (HFR), Belo Horizonte/MG, Brasil. Os *primers*/sondas foram construídos de maneira inédita, utilizando-se as plataformas NCBI Blast e Primer-Blast. As amostras foram submetidas à extração de material genético com posterior padronização diagnóstica, utilizando-se a qPCR para avaliação qualitativa e quantitativa (carga viral). O gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizado como controle interno. **Resultados e discussão:** O teste desenvolvido apresentou alta sensibilidade para os alvos pesquisados com $1,518 \times 10^0$ cópias/L do poliomavírus BK, $1,113 \times 10^1$ cópias/L do poliomavírus JC e $5,000 \times 10^2$ UI/mL de citomegalovírus. Não houve reação cruzada entre os vírus pesquisados e outros vírus filogeneticamente relacionados, como os herpes-vírus. Os testes desenvolvidos foram reprodutíveis, apresentando resultados semelhantes nos testes de sensibilidade e repetibilidade. Para a determinação da carga viral, o limite de quantificação foi definido para o citomegalovírus na urina em $5,000 \times 10^2$ UI/mL e no plasma em $5,000 \times 10^3$ UI/mL. Para o poliomavírus BK na urina a carga viral foi definida em $1,518 \times 10^2$ cópias/ μ L e no plasma em $1,518 \times 10^3$ cópias/ μ L. Por fim, para o poliomavírus JC na urina e no plasma o limite de quantificação da carga viral foi estabelecido em $1,113 \times 10^3$ cópias/ μ L. **Conclusão:** O desenvolvimento e a validação da qPCR apresentada neste trabalho poderá fornecer uma excelente ferramenta para o diagnóstico de citomegalovírus e dos poliomavírus BK e JC em amostras de pacientes transplantados renais. A padronização de métodos laboratoriais se faz necessária, pois auxilia na tomada de decisões clínicas mais eficazes e precoces, contribuindo para uma melhor monitorização desta população de estudo.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.1524>

CÉLULAS MIELOIDES SILENCIADAS PARA A RHO GTPASE RHOC APRESENTAM MENOR MARCAÇÃO DE DANO NO DNA APÓS TRATAMENTO COM DOSES ESTABELECIDAS DE UVC

SSC Sampaio^a, CS Souza^a, AD Ferreira^a,
BA Rodrigues^a, ASS Duarte^b, KPV Ferro^b,
CRR Rocha^a, STO Saad^b, M Lazarini^a

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

^b Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, SP, Brasil

Introdução: RhoA e RhoC são proteínas homólogas que participam de processos celulares controlados por p53, como o reparo a danos no DNA. RhoA e RhoC atuam na promoção do desenvolvimento tumoral, porém suas funções em células

leucêmicas não foram exploradas. **Objetivos:** Neste estudo, padronizamos o tratamento com luz UVC em linhagens mieloides. Os efeitos do silenciamento de RhoC na indução de danos ao DNA causados por UVC também foram avaliados. **Materiais e métodos:** As densidades de energia da radiação UVC ($10\text{--}80 \text{ J/m}^2$) foram padronizadas utilizando o ensaio de MTT nas linhagens celulares OCI-AML3 (TP53 selvagem) e U937 (TP53 mutado) por 24, 48 e 72 horas. Após a determinação das intensidades de UVC, a expressão de p53, RhoA e RhoC foi avaliada por Western blot. O silenciamento de RhoA e RhoC foi realizado com lentivírus nas células U937. O ciclo celular e a expressão de γ H2AX (marcador de dano no DNA) foram avaliados por citometria de fluxo. **Resultados:** O tratamento com UVC reduziu a viabilidade das linhagens celulares. Os IC₅₀ (índices que representam 50% de inibição) de células OCI-AML3 e U937 foram respectivamente 20 e 10 J/m^2 em 48 horas. Estas doses foram utilizadas nos experimentos subsequentes. Houve aumento e posterior redução de p53 e RhoA nas células OCI-AML3 após as primeiras horas de irradiação. A expressão de RhoC, por sua vez, reduziu gradativamente. Em células U937, RhoA também apresentou aumento e posterior redução, enquanto a expressão de RhoC não foi alterada após a irradiação. Observamos um aumento gradativo da população de células OCI-AML3 na fase G1 do ciclo celular após a irradiação, enquanto células U937 apresentaram aumento nas fases G1 e G2/M. Esse aumento foi acompanhado pela indução de γ H2AX. Após 24 horas, a expressão de γ H2AX foi reduzida em células OCI-AML3 e manteve-se alta em U937. O silenciamento de RhoA e RhoC foi efetivo nas células U937 (redução da expressão gênica e proteica de 85%). Porém, o silenciamento de RhoA resultou no bloqueio da proliferação celular, impedindo a realização de ensaios. Houve aumento da população de U937 na fase G1 do ciclo celular tanto na cultura de células shCTRL quanto em shRhoC. Interessantemente, as células silenciadas para RhoC apresentaram menor expressão de γ H2AX após radiação com UVC em comparação ao controle. **Discussão:** Nossos dados indicam que células OCI-AML3 e U937 apresentam diferentes respostas no ciclo celular e marcação de γ H2AX frente à irradiação UVC, o que pode estar relacionado ao status mutacional de TP53. O aumento e posterior redução de p53 em células OCI-AML3 após a exposição à UVC indica que foi utilizada uma baixa dose de radiação. A alteração na expressão de RhoA e RhoC induzida por UVC sugere que estas proteínas estejam envolvidas na resposta a danos no DNA. De fato, células silenciadas para RhoC apresentaram menor marcação de γ H2AX em comparação às células controle. **Conclusão:** Neste trabalho, foram estabelecidas as doses de UVC que induzem danos ao DNA de forma moderada em células U937 e OCI-AML3, com parada no ciclo celular. O tipo de resposta celular parece ser dependente do status mutacional de p53. Nosso estudo mostra, pela primeira vez, a alteração da expressão de RhoA e RhoC após a irradiação UVC em linhagens mieloides e que o silenciamento de RhoC reduz a marcação de γ H2AX induzida por UVC. **Financiamento:** FAPESP.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.1525>