

## AValiação DE CLONALIDADE T POR CITOMETRIA DE FLUXO – PAPEL DO ANTÍGENO TRCB1 EM ROTINA CLÍNICA

AVS Sousa, YH Maekawa, TTT Catelan, RG Souza, ACT Silva, DC Daniel, A Melo, MCA Silva, MV Goncalves, AF Sandes

Grupo Fleury, Brasil

**Objetivos:** Avaliar a eficácia clínica da detecção de clonalidade de linfócitos T por citometria de fluxo, utilizando um novo tubo de oito cores que inclui o marcador TRBC1. **Material e Métodos:** Para avaliação de clonalidade T, validamos recentemente um tubo de oito cores que inclui o TRBC1 (clone JOVI-1) combinado com anticorpos para identificação das subpopulações T (CD3, CD4, CD8 e CD45), assim como antígenos que ajudam a identificar a população com imunofenótipo anômalo (CD7, CD5 e CD57). O tubo de clonalidade T foi realizado quando o tubo de triagem de neoplasias linfoproliferativas apresentava relação CD4 e CD8 alterada ( $< 0,4$  ou  $> 5$ ), alterações de expressão dos marcadores de linhagem T (diminuição de expressão do CD3 e CD5) ou quando o clínico incluía uma neoplasia de células T maduras no diagnóstico diferencial. As amostras foram adquiridas no citômetro FACSLytic e analisadas pelo software Infinicyt. Para definição de clonalidade, a expressão de TRBC1 deve ser inferior a 15% ou superior a 95% na população de linfócitos T estudados. **Resultados:** Foram avaliados 97 casos com suspeita de neoplasia linfoproliferativa T (idade média 53 anos, 1-94a, 36 homens e 61 mulheres) coletadas entre março a julho de 2022. Dentre as amostras analisadas, 74 eram de sangue periférico, 18 medulas ósseas, 3 seromas de mama e dois fragmentos de linfonodo. O tubo de TRBC1 detectou clonalidade de linfócitos T em 29 amostras (29,9%), sendo o TRBC1 negativo em 14 casos e TRBC1 positivo em 15 casos. 68 casos apresentaram padrão policlonal (70,1%). O tamanho médio da população T clonal foi de 29% (3 a 74%) No sangue periférico, a contagem absoluta de linfócitos T clonais foi de 5.371/mm<sup>3</sup> (87 a 40730/mm<sup>3</sup>). Dentre os casos clonais, 18 apresentavam fenótipo de leucemia de grandes linfócitos granulares, 2 leucemia/linfoma de células T do adulto, 3 com Síndrome de Sézary e 6 casos de linfoma T periférico NOS. **Discussão:** As neoplasias de células T maduras são doenças heterogêneas caracterizadas por um amplo espectro de achados citológicos e histológicos, que, às vezes, se sobrepõem àqueles observados em linfoproliferações reacionais. Recentemente, o TRBC1 foi proposto como marcador potencial para avaliação da clonalidade de células T por citometria de fluxo, uma vez que permite a identificação rápida e precisa de populações de células T clonais. Esse anticorpo é direcionado contra um dos dois domínios constantes e mutuamente exclusivos da cadeia beta de TCR (TRBC1 e TRBC2) selecionados aleatoriamente durante o rearranjo do gene TCR. Como única limitação, o exame só não pode ser realizado em linfomas T que expressam TCR-gama-delta, o que, no entanto, corresponde a menos de 1% desses casos. **Conclusão:** O tubo de clonalidade T utilizando o antígeno TRBC1 constitui uma forma simples, barata e robusta para a detecção de clonalidade de linfócitos T por citometria de fluxo. Quando utilizado da forma apropriada, o tubo permite a identificação de populações de linfócitos T clonais em

quase 30% de casos com suspeita de neoplasia linfoproliferativa T.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.970>

## IMPLANTAÇÃO DA PESQUISA DE DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA POR CITOMETRIA DE FLUXO DE ALTA SENSIBILIDADE NAS LEUCEMIAS AGUDAS EM UM CENTRO ÚNICO NO BRASIL

AP Azambuja, YC Schluga, JLP Justus, MP Beltrame, VAM Funke, C Bonfim, M Malvezzi, R Pasquini

Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brasil

**Introdução:** O uso da citometria de fluxo multiparamétrica (CFM) de 4 cores para o diagnóstico e seguimento de pacientes (pcts) com neoplasias hematológicas foi estratégico para evolução do conhecimento nesta área nas últimas duas décadas. Entretanto, o refinamento da pesquisa da Doença Residual Mínima/Mensurável (DRM) nas leucemias agudas (LA) tornou necessárias medidas para aumentar a sensibilidade e especificidade do método anteriormente utilizado. **Objetivo:** Implantar e padronizar um método de alta sensibilidade e custo-efetivo para o diagnóstico e acompanhamento de pacientes adultos ou pediátricos com leucemias agudas num centro terciário. **Métodos:** Estudo de coorte prospectivo longitudinal que incluiu pct's consecutivos com diagnóstico ou seguimento de leucemias agudas (LLA-B, LLA-T e LMA) atendidos pelos serviços de hematologia, hematopediatria e transplante de medula óssea do CHC-UFPR em Curitiba, Paraná, Brasil, entre janeiro/2019 e maio/2022. Foram excluídos da análise leucemia promielocítica aguda e doenças hematológicas crônicas. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética - CAAE 84969718.0.000.0096. O consentimento para o uso de material biológico e acesso aos registros médicos foi dado pelo paciente ou guardiões legais. **Equipamentos e reagentes:** O presente projeto foi realizado no âmbito do PRONON - Programa Nacional de Apoio à Atenção Oncológica, do Ministério da Saúde, que forneceu os equipamentos, reagentes e anticorpos monoclonais para a realização da DRM, conforme painéis propostos pelo grupo Euroflow. A execução financeira foi feita pela AAHC. **Citometria de fluxo:** Para reduzir a variabilidade em todas as fases de coleta de amostras, processamento, aquisição de dados e análise, o estudo foi iniciado após reuniões educacionais com as equipes clínicas e técnicas da instituição. As amostras de medula óssea foram processadas dentro das primeiras 24 horas após a coleta. Na primeira fase foi feita implantação da técnica de lise total (bulky-lise) para as amostras com baixa celularidade; na segunda fase foram implantados os painéis de 8 cores para diagnóstico de leucemias agudas conforme proposto pelo grupo Euroflow, além da padronização do citômetro de fluxo FACS Lyrice™. Na terceira fase foram validados os tubos de 8 cores para pesquisa da DRM LLA-B (Theunissen et al, 2017), DRM LLA-T e DRM LMA. **Resultados:** Em 40 meses foram obtidas 788 amostras/224 pct's, sendo 104 amostras de diagnóstico (46LLA-B; 52LMA;

8LLA-T), 484 amostras seguimento em diversos momentos pós quimioterapia, 43 DRM pré-TMO e 157 DRM pós-TMO. Na fase de implantação da bulky-lise demonstramos que a maioria das amostras alcançou a sensibilidade/LOD/LOQ menor que 0,001% (mais de 5.000.000 de eventos obtidos), e o uso do citômetro de fluxo de 8-10 cores foi padronizado no setor. Entre as crianças com diagnóstico de LLA, 46 (85,1%) fizeram a avaliação do D15; 42 (77,8%) d33 e 41 (75,9%) fizeram análise da semana 12; entre os pacientes com LMA a maioria realizou ao menos 2 avaliações pós quimioterapia. Os pacientes que foram submetidos ao TCTH foram seguidos para avaliação da cinética de recuperação pós transplante, e analisados em estudo específico. **Discussão:** A utilização dos recursos do PRONON permitiu a renovação do parque tecnológico do laboratório, como consequência houve uma melhoria evidente na pesquisa de Doença Residual Mínima, com aumento da sensibilidade e especificidade do teste em relação ao método de citometria de 4 cores. Além disso foi possível a capacitação de profissionais na área de hematologia e citometria de fluxo, com discussão dos aspectos técnico científicos e acompanhamento dos resultados, permitindo melhoria substancial no cuidado aos pacientes com leucemias agudas atendidos pelo SUS.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.971>

#### RELATO DE CASO LLA PRÉ-B CD19 NEGATIVO

SHT Silva<sup>a</sup>, FFS Zacchi<sup>a</sup>, AVS Sousa<sup>a</sup>,  
YH Maekawa<sup>a</sup>, TTT Catelan<sup>a</sup>, MCA Silva<sup>a</sup>,  
CE Miguel<sup>b</sup>, AF Sandes<sup>a</sup>, MV Goncalves<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Grupo Fleury, Brasil

<sup>b</sup> Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, Brasil

**Introdução:** A leucemia linfoblástica aguda B (LLA-B), é uma neoplasia originária de células linfóides imaturas já comprometidas com a linhagem B, sendo o tipo mais comum de LLA tanto em adultos quanto em crianças. Nas LLAs, o exame de Imunofenotipagem é essencial para a definição da origem celular, se T ou B, para identificação de subtipos imunofenotípicos para a pesquisa de doença residual. Classicamente, a linhagem B é demonstrada pela expressão do CD19 associado na, à expressão de CD79a, CD10, CD22 (estes quase sempre positivos), CD20 e IgM (estes em proporções variáveis). Casos de LLA-B sem expressão do CD19 são extremamente raros e representam um grande desafio diagnóstico. **Objetivo:** Descrever um caso com diagnóstico de LLA pré-B sem expressão de CD19. **Relato de caso:** Paciente do sexo feminino, 55 anos, apresentando esplenomegalia, e com hemograma mostrando Hb = 9,6 g/dL, Leucócitos totais = 5.400/mm<sup>3</sup> (30% de células anômalas de aspecto linfóide) e plaquetas = 35.000/mm<sup>3</sup>. Foi realizado mielograma e imunofenotipagem para investigação da pancitopenia, mas o aspirado da medula mostrou-se de difícil execução, com relato de punção seca e hemodiluição. À morfologia, observou-se cerca de 40% de células de pequeno tamanho, alta relação núcleo citoplasma, cromatina frouxa a intermediária e sem grânulos, sugerindo linhagem linfóide. A imunofenotipagem (BD FACSLytic, 8

cores) utilizou os seguintes marcadores para estudo: MPO citop, CD79a citop, CD34, CD19, CD7, CD3, CD3 cit, CD45, TdT nuclear, CD81, CD10, CD38, CD20, IgM cit, CD58, CD22, CD66c, NG2, CD13, CD44. Foram positivos nas células neoplásicas: CD45 (moderada intensidade), TdT, HLA-DR, CD79a, CD10 (elevada intensidade), CD81, CD38, CD20 parcial, CD22, CD24, CD58 (baixa intensidade) e IgM (citoplasmático). Os demais marcadores foram negativos. Apesar da positividade para CD10, CD20 e CD79a, geralmente presentes em células B, o CD19 foi negativo tanto com o fluorocromo PE quanto o PE-Cy7. Para descartar leucemias raras, foram realizados marcadores para pesquisa de LMA e leucemia de células dendríticas (CD13, CD33, CD117, CD64, CD36, CD14, CD123), todos negativos, excluindo estas hipóteses. Por fim, para resolução clínica, a amostra foi encaminhada para o setor de anatomia patológica onde foi submetida à centrifugação e inclusão em agarose. Posteriormente, foram realizados cortes histológicos corados por hematoxilina/eosina e por imuno-histoquímica para os marcadores TdT, Pax5 e CD34, que demonstraram fraca positividade de TdT e Pax5 nas células de interesse. Os achados em agregados foram compatíveis com o diagnóstico de LLA pré-B CD19 negativo. **Discussão:** Casos de LLA-B CD19-negativo ao diagnóstico são extremamente raros, compondo um enorme desafio ao laboratório uma vez que, a própria classificação da OMS traz a presença de CD19 como pilar de caracterização desta população. Casos de recaída de LLA-B sem CD19 após o uso de terapia alvo como blinatumumab eventualmente são observados, mas o diagnóstico prévio de LLA-B traz mais segurança à análise. O uso de marcadores acessórios bem como a exclusão de outras linhagens e o estudo imuno-histoquímico podem ser fundamentais neste cenário. **Conclusão:** Casos de LLA-B CD19 negativo são raros, desafiadores e podem ser melhor caracterizados pela abordagem multidisciplinar.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.972>

#### NEOPLASIA PLASMOCITÁRIA BICLONAL – ASPECTOS CLÍNICOS E IMUNOFENOTÍPICOS

BF Bueno, AVS Sousa, MC Bruno, TTT Catelan,  
ACT Silva, RG Souza, YH Maekawa, MCA Silva,  
MV Goncalves, AF Sandes

Grupo Fleury, Brasil

**Objetivo:** Apresentar série de casos em que identificou-se biconalidade no mieloma múltiplo e analisar as características clínicas dos pacientes. **Materiais e Métodos:** Entre 2018 e 2022, identificamos seis casos de neoplasia plasmocitária biclonal. As amostras de medula óssea foram marcadas com os AcMo CD20, CD138, CD45, CD19, CD56, CD38, CD27, CD81, CD3, CD117, IgG, IgM, IgA, IgD, cadeia leve Kappa e cadeia leve Lambda por citometria de fluxo de 8 cores. Também analisamos os resultados de exames complementares como mielograma, cariótipo de medula óssea, hibridização *in situ* para mieloma múltiplo, eletroforese e imuno-eletroforese de proteínas séricas e pesquisa de cadeias leves livres no sangue. **Resultados:** A idade mediana dos pacientes foi de 62 anos (59-73 anos), sendo três homens e três mulheres. Cinco pacientes