

regimen, as well as higher probability of relapse, progression or death. Therefore, the absolute quantification of these LS in PB may be considered potential biomarkers capable of predicting response and prognosis in DLBCL. Also, we believe it may mirror the cellular composition of the immune TME.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2024.09.317>

ANALYTICAL VALIDATION OF A 10-COLOR FLOW CYTOMETRY PANEL FOR ASSESSMENT OF MEASURABLE RESIDUAL DISEASE OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA

AR Severino, CM Bertolucci, JFDS Tosi, MRV Ikoma-Colturato

Hospital Amaral Carvalho (HAC), Jaú, Brazil

The assessment of measurable residual disease (MRD) in acute myeloid leukemia (AML) by flow cytometry (FC) is challenging and requires full standardization to provide reliable results for patient management. Here is shown the analytical validation of a 10-color panel for AML MRD detection. **Material and methods:** 6 normal, 50 regenerative and 68MRD positive bone marrow (BM) samples were prepared using bulk lysis for acquisition of at least 1 million cells per tube. The panel composition was addressed to detect leukemia-associated immunophenotypes (LAIPs) and different-than-normal (DfN) immunophenotypes (clonal evolution), as well as leukemia stem cell (LSC) identification, using 5 tubes with 6 backbone markers (CD33APC/CD34PECy5.5/CD38APC-H7, CD45V500/CD117PE-Cy7,HLA-DRV450), combined with CD15/CD13/CD11b/CD7, CD2/CD56/CD123, CD97/CD99/CD54/CD244/CD18, CLL1+TIM3 /CD123/CD96/CD19, CD36/CD300e/CD45RA/CD14/CD64 in FITC/PE/AF700/BV421/BV605, respectively. Fluorescent markers were selected according to minimum spillovers between fluorescence channels and their stability after treatment. This panel was validated by comparing with our established 8-color panel. Samples were acquired in BD FACSCanto II and BD FACSLytic 10, adjusted according to EuroFlow's standard operating procedures. An unstained blank tube was run prior to sample acquisition to assess compensation and carry-over contamination was avoided by cleaning with distilled water between tubes. Infinicyt (CytognosTM) software was used for data analysis. Statistical analysis: R software (v 4.1.2) and Excel were used for statistical analysis, considering a p value ≤ 0.05 as significant. Bland-Altman plots and Pearson's correlation coefficient were used to assess agreement values between 10- and 8-color panels. Levey-Jennings plots, Ranksum tests, and chi-square tests were used to assess variances on the median fluorescence intensity (MFI) of the markers in CD34+ progenitor cells in normal and regenerated BM and in blast cells. The chi-square test was also used to compare the expressions of the monoclonal markers at diagnosis and during treatment. The linearity of the tests to determine the lower limit of quantification (LLOQ) was assessed using Pearson's correlation

coefficient. **Results:** There was high accuracy and reproducibility comparing the performance of both panels and both flow cytometers ($R^2 > 0.96$). The analytical sensitivity was determined by the limit of blanc (LOB) calculated using normal BM samples not stained with CD34 and CD117, limit of detection (LOD) with $LOB+1.645SD$; and lower limit of quantification LLOQ, using sequential dilutions of AML samples. Linearity was assessed using the results of blast cell percentages obtained from three samples diluted in duplicate, with high correlation between the measurements ($R^2 = 0.99$; p-value < 0.001). The expression patterns of markers were evaluated according to their MFI in CD34+ progenitor cells from 6 normal and 50 regenerative BM samples compared with the MFI in blast cells from 68 MRD+ samples and there was significance difference of most values (p < 0.05). The hemodilution control was done by the percentages of mast cells (CD117+ bright/HLA-DR-) $< 0.002\%$ and of mature granulocytes (CD13 and CD11b bright) $> 90\%$. **Conclusion:** The results showed a successful process of laboratory validation for AML MRD assessment, as recommended by the international consensus (ICCS and ELN) and to authorize its use for clinical decision making.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2024.09.318>

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO LÁTEX DE EUPHORBIA UMBELLATA

GBC Moreto, RB Marques, ACDM Carneiro, FB Vito

Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba, MG, Brasil

Objetivos: Determinar a concentração inibitória mínima (IC_{50}) de linhagens tumorais hematológicas e de linfócitos humanos saudáveis (PBMCs) a partir do látex liofilizado da *Euphorbia umbellata*, bem como seu índice de seletividade (SI), a fim de avaliar se a planta em questão possui atividade antitumoral. **Material e métodos:** Células Jurkat, Raji e K-562 foram plaqueadas (1×10^5 células/poço) em triplicatas biológicas e tratadas com o látex liofilizado da *E. umbellata* (800 $\mu g/mL$; 400 $\mu g/mL$; 200 $\mu g/mL$ e 100 $\mu g/mL$) por 24h. Após esse período, elas foram marcadas com 7-AAD. O mesmo protocolo foi realizado com PBMCs, a partir da coleta do sangue periférico de 6 pacientes saudáveis em tubo de heparina. As amostras foram processadas com Ficoll-Paque[®] (1,078 g/mL) na razão 1:2, com separação por gradiente de densidade para obtenção de PBMCs. A quantificação de morte celular em ambos os experimentos foi realizada em citômetro de fluxo BD FACS Canto IITM, com aquisição e análise de 10.000 eventos por meio do software Diva 6.0 (BD Biosciences). As curvas do IC_{50} para todas as linhagens celulares testadas foram realizadas por regressão não-linear, utilizando o software Graphpad Prism[®] 9 (versão 8.0.2). Por fim, o SI foi obtido a partir da razão entre o IC_{50} de PBMCs e o IC_{50} das células neoplásicas. Adicionalmente, foi realizado o screening fitoquímico do látex da planta, efetuando-se os

testes de: cumarinas, alcaloides e taninos. **Resultados:** Foram obtidos os valores de IC₅₀ para células Jurkat, Raji, K-562 e PBMCs, respectivamente: 41,76 µg/mL; 58,19 µg/mL; 184,4 µg/mL; e 59,27 µg/mL. Ainda, os valores do SI obtidos foram: 1,41 (Jurkat); 1,01 (Raji) e 0,32 (K-562). Quanto às análises fitoquímicas, pela metodologia utilizada, observou-se a presença de alcaloides no látex, e não foram identificados fenóis, taninos e cumarinas. **Discussão:** Ao comparar os valores de IC₅₀ das linhagens tumorais e de PBMCs, constatou-se que as células Jurkat apresentam sensibilidade relevante ao látex de *E. Umbellata*, uma vez que a dose da droga que mata 50% dessas células permite a viabilidade de mais de 50% dos linfócitos humanos. Por outro lado, células K-562 demonstraram uma maior resistência à morte induzida pelo tratamento, sendo a linhagem menos sensível e promissora, visto que seu valor de IC₅₀ seria tóxico para os linfócitos humanos saudáveis. Células Raji, por sua vez, obtiveram um valor de IC₅₀ inferior ao obtido para PBMCs, entretanto, são valores próximos, o que não permitiria uma janela terapêutica segura. Além disso, foi possível constatar que o tratamento com o látex da *E. Umbellata* é dose-dependente, uma vez que doses maiores levaram a uma maior morte celular. Assim, a dose do medicamento está diretamente relacionada a atividade por ele desempenhada. Ainda, os valores de SI confirmam que a Jurkat é a linhagem mais sensível e promissora ao tratamento, ao passo que que valores maiores que 1 denotam que uma droga é mais ativa contra a linhagem neoplásica do que contra células saudáveis. **Conclusão:** Foi possível observar que a linhagem Jurkat demonstra-se sensível e promissora em relação ao tratamento, obtendo-se um intervalo terapêutico seguro. Por outro lado, células K-562 demonstraram maior resistência à morte celular. Assim, foi possível constatar que o látex em questão é linhagem-seletivo, apresentando citotoxicidade diferente em relação às linhagens celulares em questão.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2024.09.319>

RELATO DE CASO: LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA COM TRANSLOCAÇÃO T(11;17): ZBTB16/RARA E SUA APRESENTAÇÃO LABORATORIAL.

RFC Rodrigues, MRMB Silva, JA Souza, P Belline, SFD Santos, FGP Cunha, RA Souza, NG Júnior, JECC Herculan, RMS Araujo

Sollutio Diagnósticos, Indaiatuba, SP, Brasil

A Leucemia Promielocítica Aguda (LPA) é caracterizada pela proliferação anormal dos promielócitos e bloqueio de maturação; está normalmente associada ao oncogene PML/RARA ocasionado pela translocação t(15;17) (q22;q21), ou, menos frequentemente, as suas variantes, tais como a t(11;17) (q23;q21). A LPA possui bom prognóstico quando diagnosticada e tratada adequadamente. Para um diagnóstico preciso se faz

necessário identificar as características fenotípicas, citogenéticas e moleculares das células acometidas. **Relato de Caso:** Paciente masculino, 44 anos, encaminhado sangue periférico para realização de imunofenotipagem por alteração em resultado de hemograma, apresentava anemia (Hb 7,9 g/dL), leucocitose com monocitose (11.580 mm³ leucócitos; 2.000 mm³ monócitos), 42% de células atípicas e plaquetopenia (114.000 mm³ plaquetas). Este estudo imunofenotípico identificou desvio à esquerda na série granulocítica e parada de maturação com: 61,8% de promielócitos, 1,3% de mielócitos, 1,6% de metamielócitos, 8,3% de neutrófilos, 7,1% de monócitos, 3,5% de promonócitos, 1,3% de monoblastos, sugeriu-se a avaliação medular. O estudo medular encontrou 88,8% de células progenitoras mieloides com alta granularidade com expressão de CD45 ++, CD34-, CD13++, CD33+++, CD64++, CD117++, HLA-DR-, MPO+ e expressão parcial de CD66, sendo sugerido LPA. NA avaliação molecular PML/RARA não foi detectado, BCR/ABL não detectado e estudo citogenético identificou translocação t(11;17) (q23;q21), que se associa a variante ZBTB16/RARA. Foi realizado início de tratamento quimioterápico, apresentando boas respostas, com posteriores estudos de Doença Residual Mensurável não identificando células anômalas até o limite de detecção do método. A translocação inicialmente detectada t(11;17) (q23;q21), não foi mais encontrada nos cariótipos subsequentes, indicando recuperação medular e remissão citogenética. **Discussão:** O oncogene ZBTB16/RARA é ocasionado pela translocação t(11;17) (q23;q21), considerada uma translocação RARA variante, onde o gene ZBTB16 (11q23.2) se funde ao gene RARA (17q21.2). Possui apresentação clínica semelhante PML/RARA, porém estudos mostram morfologia diferente, associação com pior prognóstico e resistência ao tratamento de primeira linha com Ácido all-trans-retinoico (ATRA). Apesar de rara, é a variante de LPA mais comum entre as demais. **Conclusão:** Casos com variantes raras, como o de LPA ZBTB16/RARA demonstram a importância do valor preditivo positivo da imunofenotipagem, biologia molecular e citogenética para um diagnóstico preciso das variantes da LPA, garantindo um atendimento diagnóstico completo e personalizado à saúde do paciente oncológico.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2024.09.320>

PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS PLASMOCITOIDES MADURAS EM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA: ESTAMOS PREPARADOS PARA FAZER ESSE DIAGNÓSTICO?

LM Silvano^a, MS Vieira^{a,b}, NA Marcondes^b, FB Fernandes^b, LN Rotta^a

^a Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brasil

^b Laboratório Zanol, Porto Alegre, RS, Brasil

Introdução: A proliferação de células dendríticas plasmocitoides (pDC) maduras associada à neoplasia mieloide é