

em pacientes com LMC é uma condição raramente reconhecida e com poucos casos descritos na literatura. Sua origem é incerta, mas levanta hipóteses de transformação clonal induzida pela terapia com TKI, evolução de um clone instável ou a coexistência de dois clones independentes. Embora o uso de TKIs possa alterar o ambiente medular, não há evidências de relação causal. A hipótese de transformação clonal da LMC é improvável, dado a resposta molecular profunda e sustentada da doença. **Conclusão:** Este relato reforça a necessidade de monitorização clínica contínua e avaliação abrangente dos pacientes com neoplasias hematológicas, mesmo em remissão molecular, na presença de novos sinais clínico-laboratoriais. A descrição de casos como este contribui para o reconhecimento de associações raras e para o avanço do conhecimento sobre a biologia clonal nas doenças hematológicas.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2025.104338>

ID - 2796

RELATO DE CASO: DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA COM IMUNOFENÓTIPO RARO EM CITOMETRIA DE FLUXO

VMR de Souza ^a, ACCV Soares ^a, I Bendit ^a, PPdST Soares ^a, AdC Carvalho ^a, MLBF Dourado ^a, AdA Filho ^a, LP Cantarino ^b, WA Poles ^b, MVA Azevedo ^b, DDS Sá ^b, CL de Oliveira ^a, L Rodrigues ^a

^a Diagnósticos da América (DASA), São Paulo, SP, Brasil

^b Hospital Vitória Anália Franco, São Paulo, SP, Brasil

Introdução: Este trabalho tem como objetivo relatar um caso de Leucemia Promielocítica Aguda (LPA) com imunofenótipo raro em citometria de fluxo, divergente do padrão clássico. **Descrição do caso:** Paciente DBN, 45 anos, com histórico de câncer de mama tratado há 6 anos (cirurgia, quimio e radioterapia), em uso atual de Tamoxifeno, procurou o pronto-socorro após 1 mês de hematomas espontâneos em membros inferiores, astenia leve e, posteriormente, gengivorragia. O hemograma evidenciou pancitopenia e 55% de células imaturas, com morfologia sugestiva de promielócitos anômalos (núcleos bilobados, cromatina frouxa, citoplasma basofílico, granulação azurófila e bastonetes de Auer), levantando hipótese de LPA. Foi realizada imunofenotipagem por citometria de fluxo, revelando 61,6% de blastos com expressão de CD13+, CD33+, CD117, CD123+, MPO, CD34+ e HLA-DR+. Este perfil, com CD34+ e HLA-DR+ (geralmente ausentes em LPA), inicialmente apontou para uma Leucemia Mieloide Aguda (LMA). Contudo, a pesquisa do gene de fusão PML::RARA t(15;17) por RT-PCR foi positiva, confirmando o diagnóstico de LPA, posteriormente validado pelo cariótipo com translocação t(15;17). A paciente foi prontamente tratada com ATRA e quimioterapia, permanecendo em acompanhamento especializado. **Conclusão:** A LPA é uma emergência hematológica devido à sua associação com coagulopatias graves e risco elevado de sangramentos, sendo o diagnóstico precoce

essencial para o prognóstico. Clinicamente, pode se manifestar com sangramentos espontâneos e laboratoriais como citopenias ou leucocitose com promielócitos anômalos. A morfologia periférica é uma pista diagnóstica inicial, com presença de células grandes, núcleo bilobado ("em halteres") e grânulos azurófilos, além de bastonetes de Auer. O imunofenótipo típico da LPA mostra forte expressão de CD13 e CD33, mas geralmente é CD34- e HLA-DR-. Nas variantes hipogranulares, há perda de CD117 e CD34 pode ser fracamente positivo. No caso descrito, a forte expressão de HLA-DR e a presença de CD34 geraram dúvida diagnóstica inicial. Esse perfil imunofenotípico incomum reforça que, mesmo em casos atípicos, o diagnóstico definitivo de LPA deve se basear na detecção do gene de fusão PML::RARA por RT-PCR, considerado padrão-ouro, complementado pela análise citogenética. Este caso ilustra uma apresentação rara de LPA com imunofenótipo atípico, ressaltando a importância da integração entre achados clínicos, morfológicos, imunofenotípicos, citogenéticos e moleculares para um diagnóstico correto. A variabilidade fenotípica da LPA, ainda que incomum, pode impactar na suspeita inicial, tornando indispensável a realização de exames confirmatórios como o RT-PCR para PML::RARA, evitando atrasos no início do tratamento adequado.

Referências:

1. Devi K, Ali N. The curious case of HLA-DR-positive APL. Clin Case Rep. 2020;9:825-9. doi:10.1002/ccr3.3657.
2. Mendoza AS, Qing X, Dungo M, Lasky J, Panosyan E, Cai J. HLA-DR antigen-positive acute promyelocytic leukemia. Exp Mol Pathol. 2016;101:197-200. doi:10.1016/j.yexmp.2016.08.002.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2025.104339>

ID - 2533

RELATO DE CASO: PAPEL DO DIAGNÓSTICO INTEGRADO NA DIFERENCIAÇÃO ENTRE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA B MADURA E LINFOMA DE BURKITT EM PACIENTE PEDIÁTRICO

ML Dumas ^a, D Schimidell ^a, DL Fagundes ^a, ES Junior ^a, RS Barroso ^a, AF Silva ^b, AC Conti ^b

^a Flowmentor, São Paulo, SP, Brasil

^b Biomega Medicina Diagnóstica, São Paulo, SP, Brasil

Introdução: A Leucemia linfoblástica aguda B (LLA-B) é uma doença oncohematológica comum em pacientes pediátricos e caracterizada pela proliferação de linfoblastos B neoplásicos na medula óssea, sangue periférico e, ocasionalmente, em órgãos linfoides. O linfoma de Burkitt é uma neoplasia B madura agressiva que acomete frequentemente pacientes jovens e está associada ao rearranjo do gene MYC envolvendo o cromossomo 8. Para classificação adequada das neoplasias B, a OMS preconiza a avaliação integrativa de dados morfológicos, imunofenotípicos e citogenéticos, sendo este último fundamental para definição diagnóstica. **Descrição do caso:** Objetivo deste trabalho é relatar caso clínico raro de um

paciente pediátrico com diagnóstico final de LLA-B madura com rearranjo de KMT2A (OMS 2022), porém com perfil imunofenotípico sugestivo de Linfoma de Burkitt. Paciente do sexo feminino, 1 ano de idade, com suspeita diagnóstica de leucose aguda. Anamnese clínica evidenciou febre, plaquetopenia, anemia, hiperleucocitose, hepatoesplenomegalia e linfonodomegalias difusas. Foram enviadas amostras de medula óssea e líquido cefalorraquidiano para avaliação imunofenotípica por Citometria de Fluxo. Paralelamente foi realizado o mielograma, estudo anatomopatológico/imunohistoquímico e citogenético de material medular. **Conclusão:** A análise imunofenotípica por citometria de fluxo detectou infiltração medular (90,8%) e de Sistema Nervoso Central (5,3%) por células da linhagem B com fenótipo maduro (CD19++, CD22+, cyCD79a+, CD81++, CD45++, CD20+, CD38++, sIgM+) e restrição clonal para cadeia leve lambda da imunoglobulina de superfície. As células B também não apresentaram expressão de marcadores de imaturidade como CD34, CD10 e TdT. A análise morfológica do esfregaço medular demonstrou células linfoides de médio tamanho, cromatina relativamente frouxa, citoplasma basofílico, escasso e com presença de leve vacuolização. Com base nas características imunofenotípicas e morfológicas, a conclusão do laudo de imunofenotipagem sugeriu o diagnóstico provável de Linfoma de Burkitt, porém destacando a necessidade de correlação com estudo citogenético-molecular. O estudo anatomopatológico e imunohistoquímico da medula óssea detectou infiltração difusa por células B positivas para CD19, PAX-5, CD20, SOX-11 e negativas para CD10, CD34 e TdT. Posteriormente, o estudo do FISH detectou ausência de rearranjo em cMYC e presença de rearranjo do gene KMT2A. O conjunto dos achados permitiu definir o diagnóstico final de LLA-B madura com rearranjo de KMT2A, entidade rara descrita pela OMS, 5ª edição. A imunofenotipagem por Citometria de Fluxo possui um papel essencial no diagnóstico precoce, ágil e preciso de leucemias agudas e outras neoplasias oncohematológicas. Entretanto, este trabalho demonstra que o diagnóstico integrado é capaz de solucionar casos desafiadores e direcionar a melhor estratégia de tratamento. Com as recentes atualizações da OMS e surgimento de novas subclassificações das neoplasias, torna-se imprescindível o acesso a estudos citogenéticos e moleculares confiáveis e céleres.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2025.104340>

ID - 1999

SPHEROMAP: A 3D SPATIAL CYTOMETRY PLATFORM FOR FUNCTIONAL SCREENING OF NEXT-GENERATION CAR-T THERAPIES IN HYPOXIC TUMOR MICROENVIRONMENTS OF LYMPHOMA

GBC Moreto, ML Arrojo, JPZ Murarolli, SEC Silva, SR Caruso, MD Orellana, CCOM Bonaldo, PVB Palma, RA Panepucci

Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, Brazil

Introduction: Overcoming the immunosuppressive tumor microenvironment (TME) remains a critical bottleneck for the success of cellular immunotherapies, including chimeric antigen receptor (CAR) cells. Hypoxia-driven adenosinergic signaling is a major immune evasion mechanism, restricting immune cell infiltration, activation, and persistence. Within the TME, stromal cells expressing CD39 and CD73 convert extracellular ATP into immunosuppressive adenosine, while the CD26/ADA complex counteracts this by converting adenosine into inosine. Hypoxia further upregulates CD39/CD73, increasing adenosine accumulation and reinforcing immune suppression. Targeting this pathway, either pharmacologically or through CAR engineering to bypass or modulate these mechanisms, is an emerging frontier for next-generation cellular therapies. **Objectives:** Conventional in vitro assays lack the spatial resolution needed to capture hypoxia-driven phenotypic changes within the TME. To overcome these limitations, we developed SpheroMap Cytometry, a spatially resolved 3D flow cytometry platform that reproduces the structural, metabolic, and stromal complexity of the TME. The system enables compartment-specific immunophenotyping of tumor, stromal, and immune cells within the hypoxic (core) and normoxic (peripheral) regions of heterotypic tumor–stroma spheroids. **Material and methods:** Spheroids were generated by co-culturing CellTrace Violet (CTV)-labeled Raji lymphoma cells with human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells at a 1:4 ratio in ultra-low-attachment 96-well plates, and aggregating them by centrifugation. At 20 h, hypoxic regions were labeled with Image-iT Green Hypoxia reagent (HypoxG). At 36 h, spheroids were enzymatically and mechanically dissociated into single-cell suspensions, stained with viability dye and antibodies against CD39, CD73, and CD26, acquired on a BD FACSymphony A1, and analyzed using FlowJo. After doublet exclusion (FSC-A vs FSC-H), dead cell removal and separation of Raji (CTV⁺) from MSC (CTV⁻) populations, each population was subdivided into HypoxG^{High} and HypoxG^{Low} fractions to assess compartment-specific expression profiles. **Results:** Fluorescence microscopy confirmed the formation of compact spheroids by 12 hours and the presence of a hypoxic core by 24 hours. Flow cytometry showed that in the hypoxic compartment, 90% of MSCs and 11% of Raji cells displayed a CD73^{high}CD26^{high} phenotype, versus 6% and 0% in normoxia. CD39 mean fluorescence intensity in hypoxic Raji cells was 25% higher than in normoxic counterparts. These results highlight the platform's ability to resolve microenvironment-driven phenotypic heterogeneity that bulk assays cannot detect. **Discussion and conclusion:** SpheroMap Cytometry recapitulates key immunosuppressive mechanisms of the lymphoma TME, offering a robust, scalable, and quantitative platform for preclinical functional screening of CAR designs. The platform can be readily adapted to evaluate diverse engineering strategies, with applicability across hematologic and solid tumor models. By combining spatial resolution with multiparametric flow cytometry, SpheroMap provides a powerful tool to accelerate the rational design and optimization of CAR-based therapies capable of maintaining activity and infiltration under hypoxic stress. **Funding:** This study was financed by the São Paulo Research Foundation (FAPESP), Brazil. Process Number