

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 linfóides 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 à 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

#2022/12856-6 and the Brazilian Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2025.104341>

ID - 2968

SUBPOPULAÇÕES MONOCITÁRIAS NA IMUNOFENOTIPAGEM: COORTE DE TRÊS ANOS DIFERENCIANDO LEUCEMIA MIELOMONOCÍTICA CRÔNICA DE OUTRAS CAUSAS DE MONOCITOSE

ACP Silva, P Vicari, VDC Queiroz, ADC Vaz, KMDS Lacerda, JTMD Oliveira, D Ramadan, S Tufik

AFIP, São Paulo, SP, Brasil

Introdução: A leucemia mielomonocítica crônica (LMMC) é uma neoplasia mieloproliferativa crônica não clássica, rara, cujos critérios diagnósticos foram atualizados, em 2022, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), incluindo as subpopulações monocitárias por citometria de fluxo, de sangue periférico, como critério diagnóstico auxiliar. O aumento de monócitos clássicos (MO1, CD14⁺⁺/CD16⁻) $\geq 94\%$ facilitou o diagnóstico diferencial entre as causas de monocitose, especialmente em cenários sem acesso fácil à biologia molecular. **Objetivos:** Descrever a experiência de um serviço brasileiro laboratorial na aplicação do critério de subpopulações monocitárias, por citometria de fluxo, em pacientes com monocitose. **Material e métodos:** Estudo retrospectivo de 25 pacientes, com hipótese diagnóstica de LMMC, avaliados entre janeiro de 2022 e março de 2025. Foram analisados hemograma, cariótipo e BCR-ABL (quando disponíveis) e citometria de fluxo (IMUNF) de sangue periférico (n = 14) ou de medula óssea (n = 11). Painel de IMUNF utilizado: CD 3, CD4, CD8, CD11b, CD13, CD14, CD16, CD19, CD 33, CD 34, CD 36, CD45, CD 56, CD64, IREM, HLA-DR. As subpopulações monocitárias foram definidas como MO1 CD14⁺⁺/CD16⁻, MO2 CD14^{+/CD16+} e MO3 CD14^{low}-/CD16⁺. Classificou-se como "LMMC suspeita" pacientes com MO1 $\geq 94\%$ e monocitose absoluta $\geq 1000/uL$ e $\geq 10\%$ em sangue periférico. **Resultados:** Dos 25 pacientes, idade 15-87 anos, 4 (16%) apresentaram perfil imunofenotípico de sangue periférico sugestivo de LMMC, com MO1 $\geq 94\%$ e em hemograma monócitos $\geq 1000/uL$ e $\geq 10\%$; em 1 deles, BCR-ABL negativo; e em outro cariótipo 46XY; nos outros 2 não havia dados moleculares. 4 (16%) tiveram padrão compatível com monocitose reacional, com aumento proporcional de MO2/MO3. Os 17 restantes (68%) permaneceram como "indeterminados" pelo critério de subpopulação monocitária imunofenotípico isolado. **Discussão e conclusão:** O método de 'monocyte subset repartitioning' descreve que uma proporção de monócitos clássicos $\geq 94\%$ no sangue periférico é altamente sugestivo de LMMC e distingue com elevada acurácia a doença clonal de monocitoses reacionais. Em coortes publicadas, esse valor obteve alta sensibilidade e especificidade e foi replicado em diversos outros estudos, consolidando seu emprego como ferramenta diagnóstica acessível. Em nosso trabalho, a identificação de 16% de

pacientes com "LMMC sugestiva" e de 16% com provável monocitose reacional, sustenta a aplicabilidade do método em um cenário real brasileiro. Contudo, há importante ressalva, 44% das amostras eram de medula óssea o que pode ter prejudicado a interpretação diagnóstica desses casos já que a subpopulação monocitária de medula óssea (MO) pode diferir da periferia e não é inclusa nos critérios diagnósticos; nenhum dos casos sugestivos de LMMC eram de MO. Além disso, a ausência de dados moleculares/citogenéticos em nossa coorte limita a capacidade de confirmação definitiva do diagnóstico conforme a OMS/2022. Estudos prévios que associaram padrões imunofenotípicos a mutações específicas indicam que a combinação de IMUNF + sequenciamento de nova geração (NGS) aumenta a precisão diagnóstica e classificatória. Portanto, o uso da subpopulação monocitária por citometria de fluxo demonstrou potencial para auxiliar no diagnóstico diferencial entre as diferentes causas de monocitose, principalmente LMMC e monocitose reacional. Mesmo na ausência de testes moleculares, o critério $\geq 94\%$ de monócitos clássicos por IMUNF mostrou-se capaz de direcionar a propedêutica para LMMC, confirmando o encontrado na literatura científica atual.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2025.104342>

ID - 2216

USO DA CITOMETRIA DE FLUXO NO DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIAS

TBM Silva

Pulsa Goiás, Goiânia, GO, Brasil

Introdução: A citometria de fluxo (CMF) é uma técnica multiparamétrica que utiliza laser óptico para analisar características de células em suspensão, como morfologia, tamanho, complexidade e expressão de antígenos de superfície. Na hematologia, a CMF é fundamental para o diagnóstico, classificação, prognóstico e monitoramento de leucemias, permitindo a identificação de subtipos específicos, como leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfóide aguda (LLA) e leucemia linfóide crônica (LLC). A imunofenotipagem por CMF detecta marcadores celulares, orientando a terapêutica e a detecção de recidivas, contribuindo para melhores desfechos clínicos. **Objetivos:** Revisar a literatura para avaliar o papel da citometria de fluxo no diagnóstico, classificação e monitoramento de leucemias, destacando sua relevância na prática clínica hematológica. **Material e métodos:** Foi realizada uma revisão bibliográfica de artigos publicados entre 1997 e 2023, em português, inglês e espanhol, nas bases Scientific Electronic Library Online (SciELO) e Google Acadêmico. Os descritores utilizados foram "leucemias", "citometria de fluxo" e "imunofenotipagem". Foram selecionados artigos que abordavam o uso da CMF no diagnóstico, classificação e monitoramento de leucemias. A análise foi qualitativa e quantitativa, organizando as informações para identificar o papel da técnica no manejo clínico. **Resultados:** A CMF analisa até 10^6 células por minuto, medindo dispersão de luz e fluorescência de anticorpos