

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Análise da presença de células neoplásicas no sangue periférico por citometria de  
fluxo em pacientes com linfoma não-Hodgkin

Uberaba

2021

Vanessa Afonso da Silva

Análise da presença de células neoplásicas no sangue periférico por citometria de fluxo em pacientes com linfoma não-Hodgkin

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Fernanda Bernadelli De Vito

Coorientador: Helio Moraes de Souza

Uberaba

2021

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do  
Triângulo Mineiro**

S584a Silva, Vanessa Afonso da  
Análise da presença de células neoplásicas no sangue periférico por citometria de fluxo em pacientes com linfoma não-Hodgkin / Vanessa Afonso da Silva. -- 2021.  
26 f. : il., fig., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2021  
Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Bernadelli De Vito  
Coorientador: Prof. Dr. Helio Moraes de Souza

1. Linfoma não Hodgkin. 2. Citometria de fluxo. 3. Técnicas e procedimentos diagnósticos. 4. Sangue. I. Vito, Fernanda Bernadelli De. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616-006.44

Amanda Franzão R. Silva  
CRB-6/3461

Vanessa Afonso da Silva

Análise da presença de células neoplásicas no sangue periférico por citometria de fluxo em pacientes com linfoma não-Hodgkin

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para obtenção do título de mestre.

09 de Setembro de 2021

Banca Examinadora:

---

Professora Dra. Fernanda Bernadelli De Vito  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Professor Dr. Paulo Juliano Martins  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Professor Dr. Alex Freire Sandes  
Universidade Federal de São Paulo

À minha mãe Rute (*in memoriam*), que estudou magistério e realizou seu sonho de ser professora aos 40 anos, comigo na barriga e já mãe de 3 filhos, pois foi apenas à esta altura que a vida lhe proporcionou esta oportunidade. Minha fé e seu exemplo mantêm-me de pé.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e amiga, Fernanda Bernadelli de Vito, que acreditou que este trabalho seria possível e me conduziu com maestria até aqui.

Ao meu coorientador, Hélio Moraes de Souza, pelas palavras de incentivo e pelo exemplo de dedicação à ciência.

Às colegas de laboratório, em especial à Sarah Cristina Sato Vaz Tanaka, que me acompanhou durante todo processo experimental, dedicando seu tempo e conhecimento. Sem ela, este trabalho não estaria pronto em tempo hábil.

Aos colegas de pós graduação, com os quais eu dividi dúvidas e angústias mas tive a grande oportunidade de fazer novos amigos.

Aos meus colegas de trabalho, médicos hematologistas e hemoterapêutas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, aos nossos residentes e alunos, com os quais eu aprendo dia-a-dia. Gratidão especial à Dra Sheila Soares, que em 2016 me convidou para assumir o trabalho clínico do Laboratório de Citometria, mesmo sabendo que, àquela altura, eu não tinha capacidade técnica para tal. Isso representou uma mudança de perspectiva na minha vida profissional e colaborou para que eu mantivesse o foco e seguisse adiante.

Ao meu pai José, minha madrasta Cibele, meus irmãos Érico, Raquel e Alisson (in memoriam) e toda minha família. Vocês sempre acreditaram nos meus sonhos, mesmo diante de contextos adversos, e nunca me impediram de tentar.

## RESUMO

O linfoma não-Hodgkin (LNH) é a neoplasia hematológica mais comum no mundo e rotineiramente, a biópsia de medula óssea é realizada para adequado estadiamento tumoral. Novas técnicas têm sido estudadas para permitir uma identificação mais rápida da doença, como a imunofenotipagem por citometria de fluxo (ICF). Em relação ao sangue periférico, até o presente momento não existe um consenso sobre a realização da ICF e não se sabe o seu real valor para o diagnóstico e estadiamento dos LNH. Diante disso, analisamos se é possível identificar a presença de células neoplásicas circulantes no sangue periférico de pacientes com LNH por meio da ICF, bem como comparamos os achados com o estadiamento inicial pela biópsia de medula óssea. Nove amostras foram analisadas utilizando-se um painel de anticorpos monoclonais direcionado ao estudo de doenças linfoproliferativas crônicas de células B. Gates sequenciais foram analisados e os resultados comparados com a avaliação histológica da medula óssea. Dos nove casos analisados, três foram discordantes com o resultado anatomopatológico de medula óssea no exame de estadiamento, sendo a biópsia negativa para infiltração para LNH enquanto a ICF foi positiva. Estes casos apresentavam baixa carga tumoral, que pode justificar a discordância. A imunofenotipagem por citometria de fluxo vem sendo estudada para o diagnóstico, estadiamento e seguimento de pacientes portadores de LNH. A utilização de sangue periférico como material para o estadiamento nos LNH é factível, apresenta uma boa sensibilidade, sobretudo para análise de pequenas populações neoplásicas, além de ser uma amostra de fácil obtenção.

**Palavras-chave:** Linfoma não-Hodgkin, citometria de fluxo, técnicas e procedimentos diagnósticos, sangue periférico.

## ABSTRACT

Non-Hodgkin lymphoma (NHL) is the most common hematological neoplasm in the world, and bone marrow biopsy is routinely performed for proper tumor staging. New techniques have been studied to allow faster identification of the disease, such as flow cytometry immunophenotyping (FCI). In relation to peripheral blood, to date there is no consensus on the performance of FCI. The real value of the FCI in peripheral blood for the diagnosis and staging of NHL is not known. Therefore, we analyzed whether it is possible to identify the presence of circulating neoplastic cells in peripheral blood of patients with NHL through the ICF, as well as we compared the findings with the initial staging by bone marrow biopsy. Nine samples were analyzed using a panel of monoclonal antibodies aimed at the study of chronic b-cell lymphoproliferative diseases. Sequential gates were analyzed and the results compared with the histological evaluation of the bone marrow. Of the nine cases analyzed, three were in disagreement with the pathological bone marrow result on the staging examination, and the biopsy was negative for infiltration into NHL while the ICF was positive. These cases presented low tumor load, which may justify disagreement. Flow cytometry immunophenotyping has been studied for the diagnosis, staging and follow-up of patients with NHL. The use of peripheral blood as a material for staging in NHL is feasible, presents a good sensitivity, especially for the analysis of small neoplastic populations, besides being an easy sample to obtain.

**Keywords:** Non-Hodgkin lymphoma, flow cytometry, diagnostic techniques and procedures, peripheral blood.



## LISTA DE SIGLAS

LNH: Linfoma não Hodgkin

INCA: Instituto Nacional do Câncer

ICF: Imunofenotipagem por citometria de fluxo

PET-CT: tomografia computadorizada por emissão de pósitron

NK: *Natural Killer*

DRM: Doença residual mensurável

RT-qPCR: Reação em cadeia de polimerase quantitativo em tempo real

LCM: Linfoma de células do manto

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	10
1.1 – Revisão de literatura	11
1.1.1 – Linfomas não Hodgkin (LNH)	11
1.1.2 – Diagnóstico de LNH	11
1.1.3 – Monitorização de tratamento do LNH	12
1.2 – Justificativa	13
<b>2 OBJETIVOS</b>	14
2.1 – Objetivo geral	14
2.2 – Objetivos específicos	14
<b>3 RESULTADOS</b>	15
<b>4 COMENTÁRIOS OU CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	27
<b>5 CONCLUSÃO</b>	28
<b>6 REFERÊNCIAS</b>	29
<b>7 ANEXO A – Parecer consubstanciado do CEP</b>	32

# 1. INTRODUÇÃO

2

3 As neoplasias hematológicas, são proliferações clonais anormais originadas das  
4 células do sangue periférico, da medula óssea ou do sistema linfático. Nos Estados Unidos,  
5 foi estimado para o ano de 2018, 174.250 pessoas diagnosticadas com neoplasias  
6 hematológicas, sendo aproximadamente 48% com linfoma, 35% com leucemia e 18% com  
7 mieloma múltiplo (LEUKEMIA AND LYMPHOMA SOCIETY, 2019).

8 O linfoma não-Hodgkin (LNH) é a malignidade hematológica mais comum no mundo,  
9 correspondendo a aproximadamente 5,1% de todos os cânceres (BOFFETTA, 2011). Para  
10 o Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer mostram a ocorrência de 10.180 novos  
11 casos no ano de 2018 (INCA, 2019).

12 O aumento da expectativa de vida da população traz consigo uma maior incidência  
13 de doenças neoplásicas pois muitas destas se correlacionam com alterações citogenéticas  
14 e moleculares adquiridas no processo de envelhecimento. Assim, métodos de diagnóstico,  
15 tratamento e monitorização de doenças oncológicas mais eficazes e pouco invasivos estão  
16 cada vez mais sendo alvos de pesquisas.

17 Atualmente, os LNH têm seu diagnóstico confirmado a partir do exame  
18 anatomopatológico convencional acrescido de estudo imunohistoquímico do tecido  
19 acometido. Recomenda-se para esse fim uma biópsia incisional ou excisional do  
20 linfonodo/tecido acometido ao invés de biópsia aspirativa por agulha fina (CHESON, 2014).  
21 Novas técnicas também têm sido estudadas para permitir uma identificação mais rápida da  
22 doença, como a imunofenotipagem por citometria de fluxo (ICF) desses tecidos.

23 Até o presente momento não existe um consenso sobre a realização da ICF em  
24 sangue periférico e não se sabe o seu real valor para o diagnóstico e estadiamento dos  
25 LNH. A biópsia de medula óssea ainda é utilizada como método de escolha para avaliação  
26 do comprometimento medular por linfomas. No entanto, este é um material nem sempre de  
27 fácil obtenção. De acordo com a Classificação de Lugano (CHESON, 2014), a realização  
28 da tomografia computadorizada por emissão de pósitron (PET-CT) pode substituir a  
29 realização da biópsia de medula óssea para estadiamento de linfoma de Hodgkin e de LNH  
30 difuso de grandes células B, porém nos demais subtipos de linfoma ainda há a  
31 recomendação de realização da biópsia de medula óssea com imunohistoquímica e/ou ICF.  
32 Há de se pontuar ainda que, no Brasil, o PET-CT não está facilmente disponível em todos  
33 os serviços.

34 Diante disso, o presente estudo busca identificar a presença de células de LNH  
35 (excluindo casos de leucemia linfóide crônica) circulantes em sangue periférico, no  
36 momento do diagnóstico, com o objetivo de estadiamento tumoral. Busca-se também a  
37 identificação de células neoplásicas circulantes durante e ao final do tratamento, com o  
38 objetivo de prever melhores taxas de cura e menores taxas de recaída.

39

## 40 **1.1. Revisão da Literatura**

41

### 42 *1.1.1. Linfomas não-Hodgkin (LNH)*

43

44 Os LNH são as neoplasias hematológicas mais comuns no mundo e podem ser  
45 derivados de células hematopoéticas de origem B, T ou Natural Killer (NK). Consistem em  
46 mais de 40 subtipos maiores com distintas características clínicas, genéticas e morfológicas  
47 (CHIHARA *et al.*, 2015).

48 As neoplasias de células B podem mimetizar vários estágios da diferenciação B  
49 normal e a semelhança aos estágios normais é a principal base para sua classificação e  
50 nomenclatura. Além disso, muitas neoplasias de células B maduras apresentam  
51 anormalidades genéticas que são importantes para determinar suas características  
52 biológicas assim como auxiliam na determinação de diagnósticos diferenciais.

53 Dentre as neoplasias linfóides, mais de 90% são constituídas por linfomas de células  
54 B (SWERDLOW *et al.*, 2017). De acordo com dados do Projeto de Classificação dos LNH,  
55 os subtipos de LNH de células B mais frequentes em adultos são Difuso de Grandes Células  
56 B (37%), Linfoma Folicular (29%), Linfoma Linfocítico/ Leucemia Linfóide Crônica (12%),  
57 Linfoma MALT (9%), Linfoma de Células do Manto (7%) (PERRY *et al.*, 2016).

58

### 59 *1.1.2. Diagnóstico de LNH*

60

61 Classicamente, os LNH têm seu diagnóstico confirmado a partir do exame  
62 anatomopatológico convencional acrescido de estudo imunohistoquímico do tecido  
63 acometido. Nenhum marcador antigênico é específico para qualquer neoplasia linfóide e  
64 uma combinação de características morfológicas com um painel de anticorpos é necessária  
65 para definir o diagnóstico correto (SWERDLOW *et al.*, 2017).

66 A citologia por agulha fina pode auxiliar no diagnóstico de LNH, mas características  
67 citológicas por si só não são suficientes para diagnosticar e classificar a doença, e técnicas

68 adicionais são necessárias. Além disso, há uma ampla variação de sensibilidade  
69 diagnóstica e especificidade (CAFFERTY *et al.*, 1990; DAS *et al.*, 1990; STASTNY *et al.*,  
70 1995; PUTTAGUNTA *et al.*, 1998). Técnicas como a citometria de fluxo permite a avaliação  
71 dos antígenos das células linfoides B, T e NK, a avaliação da clonalidade das cadeias leves  
72 de imunoglobulina no caso de células B, e das famílias TCR $\alpha\beta$  no caso de células T, bem  
73 como a avaliação simultânea de vários antígenos de superfície, fornecendo dados objetivos  
74 e semi-quantitativos, mesmo em amostras contendo poucas células (CRAIG e FOON,  
75 2008).

76 A ICF tem como vantagem a sua capacidade de conseguir trabalhar com amostras  
77 com baixa celularidade, de analisar múltiplos parâmetros em uma única célula e de avaliar  
78 intensidades de fluorescências, o que facilita na diferenciação entre populações  
79 neoplásicas e populações reativas (BARROCA e MARQUES, 2016).

80 A ICF a partir do sangue periférico já é amplamente utilizada para o diagnóstico de  
81 algumas entidades clínicas como, por exemplo: leucemia linfocítica crônica / linfocitoses  
82 monoclonais, síndrome linfoproliferativa autoimune, triagem de imunodeficiências  
83 primárias, leucemias agudas com leucocitose e hemoglobinúria paroxística noturna.  
84 Atualmente, a utilização desta técnica para o diagnóstico de linfomas não está bem definida.  
85 Entretanto, sabe-se que alguns subtipos de LNH como o folicular e o linfoma de células do  
86 manto, apresentam com frequência células circulantes e por isso tem sido alvo de estudos,  
87 especialmente quanto à monitorização da doença, podendo também ser útil para o  
88 diagnóstico inicial (GALIMBERTI *et al.*, 2015; COWAN *et al.*, 2016).

89

### 90 *1.1.3. Monitorização de tratamento dos LNH*

91

92 Os LNH apresentam comportamento clínico heterogêneo de acordo com seu subtipo  
93 e com opções terapêuticas também variáveis. Algumas vezes, o objetivo terapêutico é  
94 curativo, mas outras vezes o objetivo é alcançar remissões prolongadas com a menor  
95 toxicidade possível ao paciente. A identificação de doença refratária ou recaída, muitas  
96 vezes é o gatilho para que se intensifique ou reinicie uma terapia antineoplásica e a  
97 determinação atual de recaída ou refratariedade é baseada em avaliações por imagem e  
98 clínicas, nem sempre muito específicas (CHASE e ARMAND, 2018).

99 A avaliação de doença residual mensurável (DRM) é uma maneira eficaz de  
100 monitorização de algumas doenças onco-hematológicas, sendo necessária para  
101 intensificação de tratamento em pacientes de alto risco ou intervenção precoce naqueles

102 com risco de recaída. Métodos de reação em cadeia de polimerase quantitativo em tempo  
103 real (RT-qPCR)  
104 e nova geração de sequenciamento (NGS) estão sendo estudadas em LNH com resultados  
105 promissores (HERRERA e ARMAND, 2017; CHASE e ARMAND, 2018). Em 2016, o Grupo  
106 Europeu em Linfoma de Células do Manto publicou um estudo comparando a RT-qPCR e  
107 a ICF em amostras de sangue periférico e/ou medula óssea de pacientes com diagnóstico  
108 de linfoma de células do manto (LCM). Os pesquisadores consideraram como corte de  
109 positividade para DRM por ICF valores maiores que 0,01% de células neoplásicas, com um  
110 único tubo de 8 cores utilizando 10 anticorpos monoclonais. Os resultados demonstraram  
111 que a RT-qPCR tem maior sensibilidade na detecção de DRM, mas a ICF tem maior  
112 relevância clínica no manejo individual dos pacientes, pois apresentou menor tempo de  
113 transição de DRM negativa para positiva, sendo este um dado relevante para tomada de  
114 decisão terapêutica, demonstrando assim a grande importância deste método de  
115 monitorização (CHEMINANT *et al.*, 2016).

116 Linfomas indolentes são alvos frequentes de estudo para avaliação de DRM devido  
117 à alta incidência de recaída. Há demonstração de que a monitorização da DRM pode ser  
118 útil para começar uma terapia preemptiva e atrasar a recaída clínica ou para evitar a terapia  
119 de manutenção em pacientes com muito baixo risco de recaída (GALIMBERTI *et al.*, 2015).  
120 Além disso, a monitorização de DRM auxilia na determinação de sobrevida global nos  
121 diferentes subgrupos de LNH.

122

## 123 **1.2. Justificativa**

124

125 A utilização de sangue periférico como material para análise, constitui-se em medida  
126 útil para o estadiamento dos LNH pois trata-se de amostra de fácil obtenção. Entretanto,  
127 até o presente momento não existe um consenso sobre a realização da ICF em sangue  
128 periférico e não se sabe o seu real valor seja para o diagnóstico ou para o estadiamento  
129 dos LNH.

130 Assim, a realização desta pesquisa irá auxiliar a determinar o alcance da detecção  
131 de células neoplásicas no sangue periférico de pacientes com LNH, comparando estes  
132 achados com a análise imunohistoquímica das células em tecidos biopsiados. Com isso,  
133 será possível definir um método rápido e pouco invasivo para o estadiamento.

134 **2. OBJETIVOS**

135

136 **2.1. Objetivo geral**

137 Determinar a presença de células neoplásicas circulantes no sangue periférico em  
138 pacientes com linfoma não-Hodgkin.

139

140 **2.2. Objetivos específicos**

141

142 1. Identificar e quantificar células neoplásicas no sangue periférico de pacientes com  
143 linfoma não-Hodgkin no momento do diagnóstico, durante e ao final do tratamento  
144 quimioterápico.

145 2. Correlacionar o número de células neoplásicas encontradas no sangue periférico durante  
146 e ao final do tratamento com a resposta terapêutica

147 **3. RESULTADOS**

148 **ARTIGO**

149 **Título: Identificação de células neoplásicas no sangue periférico por citometria de**  
 150 **fluxo em pacientes com linfoma não-Hodgkin de células B**

**Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia**  
**Identification of neoplastic cells in peripheral blood by flow cytometry in patients with B-**  
**cell non-Hodgkin's lymphoma**  
 --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	CLML-D-21-00715
<b>Article Type:</b>	Case Report
<b>Keywords:</b>	flow cytometry; non-Hodgkin's lymphoma; diagnostic techniques and procedures; peripheral blood.
<b>Corresponding Author:</b>	Fernanda Bernadelli De Vito Federal University of Triângulo Mineiro BRAZIL
<b>First Author:</b>	Vanessa Afonso da Silva
<b>Order of Authors:</b>	Vanessa Afonso da Silva Sarah Cristina Sato Vaz Tanaka Antônio Carlos Oliveira de Meneses Leonardo Rodrigues de Oliveira Helio Moraes-Souza Fernanda Bernadelli De Vito
<b>Abstract:</b>	<p>. Tumor staging in non-Hodgkin's lymphoma (NHL) is routinely performed using bone marrow biopsy. We analyzed whether it is possible to identify circulating tumor cells in peripheral blood by flow cytometric immunophenotyping (FCI) and compared the results to initial staging performed through bone marrow biopsy.</p> <p>. Peripheral blood samples from nine patients with NHL were evaluated using a panel of monoclonal antibodies to detect B-cell chronic lymphoproliferative disorders. In three cases, the FCI analysis showed positive NHL infiltrates for which biopsies were negative. These samples had low tumor burden.</p> <p>. The use of peripheral blood in the context of staging and monitoring of NHL remains poorly investigated, but the findings of this study allow us to define the importance of FCI in the early identification of neoplastic cells in patients with NHL.</p>
<b>Suggested Reviewers:</b>	<p>Vania Hungria hungria@dialdata.com.br</p> <p>Sheila Soares Silva sheila.silva@uftm.edu.br</p> <p>Alex Sandes alex.sandes@grupofleury.com.br</p>
<b>Opposed Reviewers:</b>	



## **Title page**

Case reports

**Title:** Identification of neoplastic cells in peripheral blood by flow cytometry in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma

**Running title:** Identification of NHL cells in blood by flow cytometry

**Authors:** Vanessa Afonso da Silva<sup>(1)</sup>, Sarah Cristina Sato Vaz Tanaka<sup>(2)</sup>, Antônio Carlos Oliveira de Meneses<sup>(3)</sup>, Leonardo Rodrigues Oliveira<sup>(1)</sup>, Helio Moraes-Souza<sup>(2)</sup>, Fernanda Bernadelli De Vito<sup>(2)</sup>

### **Affiliations:**

- (1) Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Department of Oncology, Hematology and Hemotherapy; Uberaba, MG, Brazil
- (2) Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Hematological Research Laboratory; Discipline of Hematology and Hemotherapy, Uberaba, MG, Brazil
- (3) Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Department of Patology, Uberaba, MG, Brazil

### **Corresponding author:**

Fernanda Bernadelli De Vito

Hematological Research Laboratory, Discipline of Hematology and Hemotherapy, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Getúlio Guaritá Ave, 250, 38025-440, Uberaba, MG, Brazil.

Telephone: 55 34 991965141

Fax: 55 34 3312-5570

Email: [fernanda.vito@uftm.edu.br](mailto:fernanda.vito@uftm.edu.br)

**Keywords:** flow cytometry, non-Hodgkin's lymphoma, diagnostic techniques and procedures, peripheral blood.

The authors declare that there is no conflict of interest.

**Financial support:** Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Santa Casa de Misericórdia de Uberaba.

**Title:** Identification of neoplastic cells in peripheral blood by flow cytometry in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma

## INTRODUCTION

The diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma (NHL) is classically confirmed by conventional anatomopathological examination and immunohistochemical studies of the affected tissue. None antigenic marker is specific for any lymphoid neoplasm, and a combination of morphological features with an antibody panel is needed to define the correct diagnosis.<sup>1</sup>

Fine-needle cytology can help in the diagnosis of NHL, but cytological features alone are not sufficient to diagnose and classify the disease, and additional techniques are needed. Furthermore diagnostic sensitivities and specificities differ widely.<sup>2-5</sup> The combination of fine-needle cytology and immunophenotyping by flow cytometry (IFC) has played an important role in the identification of useful antigens for prognostic evaluation,<sup>6</sup> as well as those targeted for specific therapies. However, this methodology can be impaired as truly compromised samples are not always obtained.

The IFC has the advantage of its ability to work with small samples of low cellularity, analyze multiple parameters in a single cell, and assess fluorescence intensities, which facilitate the differentiation between the neoplastic and reactive populations.<sup>7</sup> Peripheral blood IFC is already widely used for the diagnosis of some clinical entities such as chronic lymphocytic leukemia/monoclonal B lymphocytosis and autoimmune lymphoproliferative syndrome. Additionally, it is also used as a screening tool for primary immunodeficiencies, acute leukemias with leukocytosis, and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.

Currently, the use of IFC for diagnosing lymphomas is not well defined. However, it is known that some NHL subtypes, such as follicular and mantle cell lymphoma, often present with circulating cancer cells and, therefore, have been the target of studies, especially regarding disease monitoring. As such, it may also be useful for initial diagnosis.<sup>8,9</sup> Considering this, the present study aimed to identify circulating neoplastic cells in the peripheral blood of patients with NHL by IFC and compare the results with those of initial staging performed through bone marrow biopsy, subsequently following up on these patients during and at the end of treatment.

We evaluated nine patients diagnosed with B-cell NHL, with a median age of 63 years (range: 27–85 years). Data related to staging, type of treatment, and clinical

outcomes are shown in Table 02. The methodology used is described in the supplementary material. All samples collected in the middle and at the end of treatment were negative for neoplasia identification (Table 03). Complete depletion of B lymphocytes was observed in all samples at these times.

The immunophenotypic analysis of peripheral blood in the pre-treatment of the evaluated cases showed the following findings.

Examining case 1, the sample comprised 2.82% B cells, with a Kappa/Lambda ratio of 3.86 (expected from 0.3 to 3, according to Mancuso et al., 2010). Of the B cells, approximately 35% showed lower expression of CD200 and LAIR1 and higher expression of D39 and CD95, which may represent circulating marginal zone B-cell lymphoma of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) cells (Figure 01).

Regarding case 2, 4.9% of the cells in the sample were B cells, with a kappa/lambda ratio of 2.2. No evidence of events that could represent circulating follicular lymphoma cells were detected. As for case 3, we found a proportion of 19.28% of B cells in the sample, with a kappa/lambda ratio of 1.24. Some B cells expressed more CD23 and LAIR1, but there is no clear separation between possibly neoplastic and normal populations. We consider the sample negative for neoplasia. In case 4, the sample constituted of 84% of B cells with a kappa/lambda ratio of 3.58. The cells had a weaker expression of CD19 than usual, expressing CD10 and CD43, compatible with infiltration by follicular lymphoma (Figure 02).

As for case 5, 3.16% of the cells in the sample were B cells with a kappa/lambda ratio of 2.42. Despite the adequate kappa/lambda ratio, a population of approximately 39% of B cells was observed with expression of CD95 and CD39, which may represent diffuse large B-cell (DLBC) CD10 negative cells (Figure 03).

Concerning case 6, the patient had 60.2% of B cells in the sample with a kappa/lambda ratio: of 0.0 (99.8% of the B cells are Lambda). Of these, 45% expressed CD11c, LAIR 1, and CD23. In this case, the CD103 marker was negative. The patient had massive splenomegaly and bone lesions. Pathological examination of the right acetabular lesion showed DLBC lymphoma, but the clonal lymphocyte population was divided into two groups based on the peripheral blood immunophenotype (Figure 04). A part of it has an immunophenotype compatible with splenic marginal zone lymphoma or hairy cell leukemia, leading us to question if it could be a compound lymphoma.

In case 7, we found 53% of B cells in the sample, with a kappa/lambda ratio of 10.95. Kappa cells overexpress CD38. We also observed positivity for CD10, sIgM, and CD81 (Figure 05), compatible with infiltration by Burkitt's lymphoma.

In the analysis of case 8, 3.54% of the sample were B cells, with a kappa/lambda ratio of 1.84. We considered this sample negative for neoplasia. As for case 9, we found a proportion of 14.93% of B cells in the sample, with a kappa/lambda ratio of 1.52/1. Despite the adequate kappa/lambda ratio, a population of approximately 14% of B cells had an expression of CD10, 24.5% expressed CD95, and 25% expressed CD27, which probably represents DLBC circulating cells.

In the present study, we observed disagreement between the results of bone marrow biopsy and IFC of peripheral blood in three of the nine samples studied. Discordant cases demonstrated positivity for neoplasia in peripheral blood immunophenotyping and negativity in the immunohistochemical study of the bone marrow (Table 04). In these three discordant cases, the neoplastic cells in the blood sample corresponded to less than 5% of the cellularity of the sample.

## **DISCUSSION**

Complete and accurate staging of NHL is important to determine the extent of the disease and, thereby, the decision of therapeutic choice and prognostic evaluation. Bone marrow involvement in lymphoma is assessed using bone marrow biopsy as a standard technique.<sup>10</sup> However, with advances in diagnostic techniques, several groups have studied the role of IFC in the diagnosis and staging of patients with NHL. Most of these studies evaluated bone marrow aspirate in the search for neoplastic cells; however, we still have limited data and standardization of protocols that support this process in clinical practice. Some studies have also investigated the role of peripheral blood analysis in the diagnosis and follow-up of NHL.<sup>11</sup>

The agreement rates between NHL staging by flow cytometry and histopathological examination vary between studies. Borahm Kim et al. (2015)<sup>10</sup> compared 248 samples of NHL of various subtypes and found an agreement rate of 91.5% between these techniques. IFC does not yet replace bone marrow biopsy in the staging process; however, multiparametric IFC may increase the sensitivity of this assessment, especially when the biopsy is inconclusive. Furthermore, IFC also has the advantage of being able to study small populations. Despite the role of minimal bone marrow involvement in the diagnosis of NHL, it is not well elucidated whether it is considered as a prognostic factor. In the three discordant cases between flow cytometry and histopathological results, there were less than 5% of neoplastic cells in the blood samples. We can infer a minimal infiltration in the bone marrow and, therefore, greater difficulty in identifying it by anatomopathological examination.

The immunophenotypic patterns obtained by multiparametric flow cytometry are also used for the correct diagnosis of specific lymphoma subtypes and help to discover peculiar clinical presentations, such as compound lymphomas.<sup>12</sup> Compound lymphomas are defined by the concomitant presence of two types of lymphoma in a single patient. This can be the presence of two distinct types of NHL or a Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma simultaneously, which is a very rare situation.<sup>13</sup> Coincidentally, we found a case classified as diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma (DLBCNHL) by the anatomopathological examination of an acetabular lesion with spinal cord involvement; however, in the immunophenotypic examination of peripheral blood, we found that a portion of neoplastic B cells (clonal for Lambda) expressed CD11c and LAIR1, with negative CD103. We believe that this is a splenic marginal zone lymphoma or hairy cell leukemia concomitant with DLBCNHL. Clinically, the patient presented with massive splenomegaly.

IFC can also be performed in tissues affected by neoplasms using the manual tissue disaggregation method. There is a good correlation between anatomopathological and immunophenotypic diagnoses in tissues.<sup>14</sup> In the context of oncological urgency, as in the case of tumors with a high proliferation index, for example, the results of immunophenotypic tissue analysis may direct early therapy until immunohistochemical examination defines the definitive diagnosis because it is faster.

In addition to aiding diagnosis and staging, IFC plays an important role in monitoring NHL. Measurable residual disease (MRD) in NHL is a matter of interest and debate, as new treatments offer higher rates of complete responses than in the past, thus having a positive impact on long-term survival.<sup>15</sup> The definition of MRD includes all methods capable of measuring a disease more accurately than conventional tools. Technologies used to assess DRM can be divided into three main categories: (1) those derived from molecular biology, (2) flow cytometry, and (3) imaging.

In NHL, the role of IFC in MRD research is not well established. Some studies have reported that the correlation between flow cytometry and molecular results agrees in 80–85% of cases, with 10% of samples defined as MRD positive by polymerase chain reaction (PCR), but negative by flow cytometry. With respect to conventional microscopy, an agreement was found in half of the cases (negative in the microscope, but positive in the IFC). If we consider the differences in sensitivity of the methods:  $1 \times 10^{-5}$  for PCR,  $1 \times 10^{-4} / 10^{-5}$  for IFC, and  $1 \times 10^{-2}$  for microscopy, this may explain the disagreements observed between the different methods.<sup>16-18</sup> Despite having lower sensitivity compared to molecular techniques, flow cytometry can be performed in a shorter timeframe and at

relatively low costs.<sup>19</sup> However, even reputable guidelines such as those edited by the European Society of Medical Oncology, despite recognizing the role of MRD in NHL, have not yet included it as a necessary and routine test on patient management, supporting the need for definitive standardization of tools used.<sup>20</sup>

Regarding the immunophenotypic study of peripheral blood in the context of NHL staging and MRD, there are few published studies. The work of Mancuso et al. (2010)<sup>21</sup> centered around the question: “if the NHL is in the bone marrow, will it also be in the peripheral blood?” They compared bone marrow and peripheral blood samples from 591 patients with NHL, including cases of follicular lymphoma, DLBCNHL, mantle cell lymphoma, marginal zone/MALT lymphoma, lymphocytic lymphoma, CLL, and Waldenstrom's macroglobulinemia. In their study, there was an agreement of 95.1% between peripheral blood and bone marrow immunophenotyping, with bone marrow examination being slightly more sensitive. Among the discordant cases, the most frequent diagnosis involved was Waldenstrom's macroglobulinemia. Sixty-two percent of the discordant samples were collected after chemotherapy. The most frequent therapy associated with the disagreement was the use of rituximab as monotherapy or in combination with chemotherapy. In addition, they reported that the agreement between bone marrow immunophenotyping and bone marrow biopsy was 83% at diagnosis and 85% after treatment. Finally, they concluded that, excluding Waldenstrom's macroglobulinemia, there is an overlap between peripheral blood and bone marrow IFC in NHL, suggesting the potentially important role of peripheral blood, even as an alternative to bone marrow biopsy, in the assessment of patients with NHL.

## **CONCLUSIONS**

Peripheral blood immunophenotyping in patients with NHL provides relevant information, especially at the time of diagnosis. In our study, although only a few cases were involved, there was disagreement with the anatomopathological staging in 33% of the cases. Furthermore, the disagreeing cases presented with low tumor burden, which can be explained by the greater sensitivity of the IFC of peripheral blood. In this study, peripheral blood IFC during and at the end of treatment was negative for the disease. Further investigation is needed to follow-up with these patients for a longer period, predict relapses, and analyze prognostic impact of the examination. The use of peripheral blood samples for the staging and follow-up of patients with NHL will prove to be of enormous importance because of its benefits, namely the following: it is an easily obtainable sample with low collection cost and with little probability of adverse effects,

and it is a relatively quick and sensitive laboratory technique. Clinical consensus must be created so that the technique is widely used in a validated and safe manner in the context of NHL.

## REFERENCES

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J (Eds.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Revised 4th ed.; IARC: Lyon, France, 2017.
2. Cafferty LL, Katz RL, Ordonez NG, Carrasco CH, Cabanillas FR. Fine needle aspiration diagnosis of intraabdominal and retroperitoneal lymphomas by a morphologic and immunocytochemical approach. *Cancer*. 1990 Jan 1;65(1):72-7.
3. Das DK, Gupta SK, Datta BN, Sharma SC. Fine needle aspiration cytodiagnosis of Hodgkin's disease and its subtypes. I. Scope and limitations. *Acta Cytol*. 1990 May-Jun;34(3):329-36.
4. Stastny JF, Almeida MM, Wakely PE Jr, Kornstein MJ, Frable WJ. Fine-needle aspiration biopsy and imprint cytology of small non-cleaved cell (Burkitt's) lymphoma. *Diagn Cytopathol*. 1995 May;12(3):201-7.
5. Puttagunta L, Harris NL, Pitman MB. The diagnosis of marginal zone lymphoma by fine needle aspiration biopsy: a comparative analysis. *Mod Pathol*. 1998;11:42A.
6. Dey P, Amir T, Al Jassar A, Al Shemmari S, Jogai S, Bhat M G, Al Quallaf A, Al Shammari Z. Combined applications of fine needle aspiration cytology and flow cytometric immunphenotyping for diagnosis and classification of non Hodgkin lymphoma. *Cytojournal*. 2006 Oct 27;3:24.
7. Barroca H, Marques C. A Basic Approach to Lymph Node and Flow Cytometry Fine-Needle Cytology. *Acta Cytol*. 2016;60(4):284-301.
8. Galimberti S, Luminari S, Ciabatti E, Grassi S, Guerrini F, Dondi A, Marcheselli L, Ladetto M, Piccaluga PP, Gazzola A, Mannu C, Monitillo L, Mantoan B, Del Giudice I, Della Starza I, Cavalli M, Arcaini L, Tucci A, Palumbo GA, Rigacci L, Pulsoni A, Vitolo U, Boccomini C, Vallisa D, Bertoldero G, Gaidano G, Musto P, Petrini M, Federico M. Minimal residual disease after conventional treatment significantly impacts on progression-free survival of patients with follicular lymphoma: the FIL FOLL05 trial. *Clin Cancer Res*. 2014 Dec 15;20(24):6398-405.
9. Cowan AJ, Stevenson PA, Cassaday RD, Graf SA, Fromm JR, Wu D, Holmberg LA, Till BG, Chauncey TR, Smith SD, Philip M, Orozco JJ, Shustov AR, Green DJ, Libby EN 3rd, Bensinger WI, Shadman M, Maloney DG, Press OW, Gopal AK. Pretransplantation Minimal Residual Disease Predicts Survival in Patients with Mantle Cell Lymphoma Undergoing Autologous Stem Cell Transplantation in Complete Remission. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Feb;22(2):380-385.
10. Kim B, Lee ST, Kim HJ, Kim SH. Bone marrow flow cytometry in staging of patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Ann Lab Med*. 2015 Mar;35(2):187-93.

11. Morice WG, Kurtin PJ, Hodnefield JM, Shanafelt TD, Hoyer JD, Remstein ED, Hanson CA. Predictive value of blood and bone marrow flow cytometry in B-cell lymphoma classification: comparative analysis of flow cytometry and tissue biopsy in 252 patients. *Mayo Clin Proc.* 2008 Jul;83(7):776-85.
12. Carulli G, Marini A. Diagnosis and classification of B-cell non-Hodgkin lymphomas. The role of multiparameter flow cytometry. *Clin Ter.* 2012;163(1):47-57.
13. Khan U, Hadid T, Ibrar W, Sano D, Al-Katib A. Composite Lymphoma: Opposite Ends of Spectrum Meet. *J Clin Med Res.* 2017 Mar;9(3):213-215.
14. Vallangeon BD, Tyler C, Williams B, Lagoo AS. Improved detection of diffuse large B-cell lymphoma by flow cytometric immunophenotyping-Effect of tissue disaggregation method. *Cytometry B Clin Cytom.* 2016 Sep;90(5):455-61.
15. Galimberti S, Genuardi E, Mazziotta F, Iovino L, Morabito F, Grassi S, Ciabatti E, Guerrini F, Petrini M. The Minimal Residual Disease in Non-Hodgkin's Lymphomas: From the Laboratory to the Clinical Practice. *Front Oncol.* 2019 Jun 26;9:528.
16. Sah SP, Matutes E, Wotherspoon AC, Morilla R, Catovsky D. A comparison of flow cytometry, bone marrow biopsy, and bone marrow aspirates in the detection of lymphoid infiltration in B cell disorders. *J Clin Pathol.* 2003 Feb;56(2):129-32.
17. Mazur G, Hałoń A, Wróbel T, Jeleń M, Kuliczowski K. Contribution of flow cytometric immunophenotyping and bone marrow trephine biopsy in the detection of lymphoid bone marrow infiltration in non-Hodgkin's lymphomas. *Neoplasma.* 2004;51(3):159-63.
18. Carulli G, Orciuolo E, Cannizzo E, Bianchi G, Giuntini S, Ottaviano V, Galimberti S, Marini A, Buda G, Ghimenti M, Petrini M. Combination of morphology, flow cytometry and PCR assay to detect bone marrow infiltration in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Clin Ter.* 2010;161(3):253-8.
19. Böttcher S. Flow Cytometric MRD Detection in Selected Mature B-Cell Malignancies. *Methods Mol Biol.* 2019;1956:157-197.
20. Dreyling M, Campo E, Hermine O, Jerkeman M, Le Gouill S, Rule S, Shpilberg O, Walewski J, Ladetto M; ESMO Guidelines Committee. Newly diagnosed and relapsed mantle cell lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2017 Jul 1;28(suppl\_4):iv62-iv71.
21. Mancuso P, Calleri A, Antoniotti P, Quarna J, Pruneri G, Bertolini F. If it is in the marrow, is it also in the blood? An analysis of 1,000 paired samples from patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma. *BMC Cancer.* 2010 Nov 24;10:644.

160

161

162

163

164

165



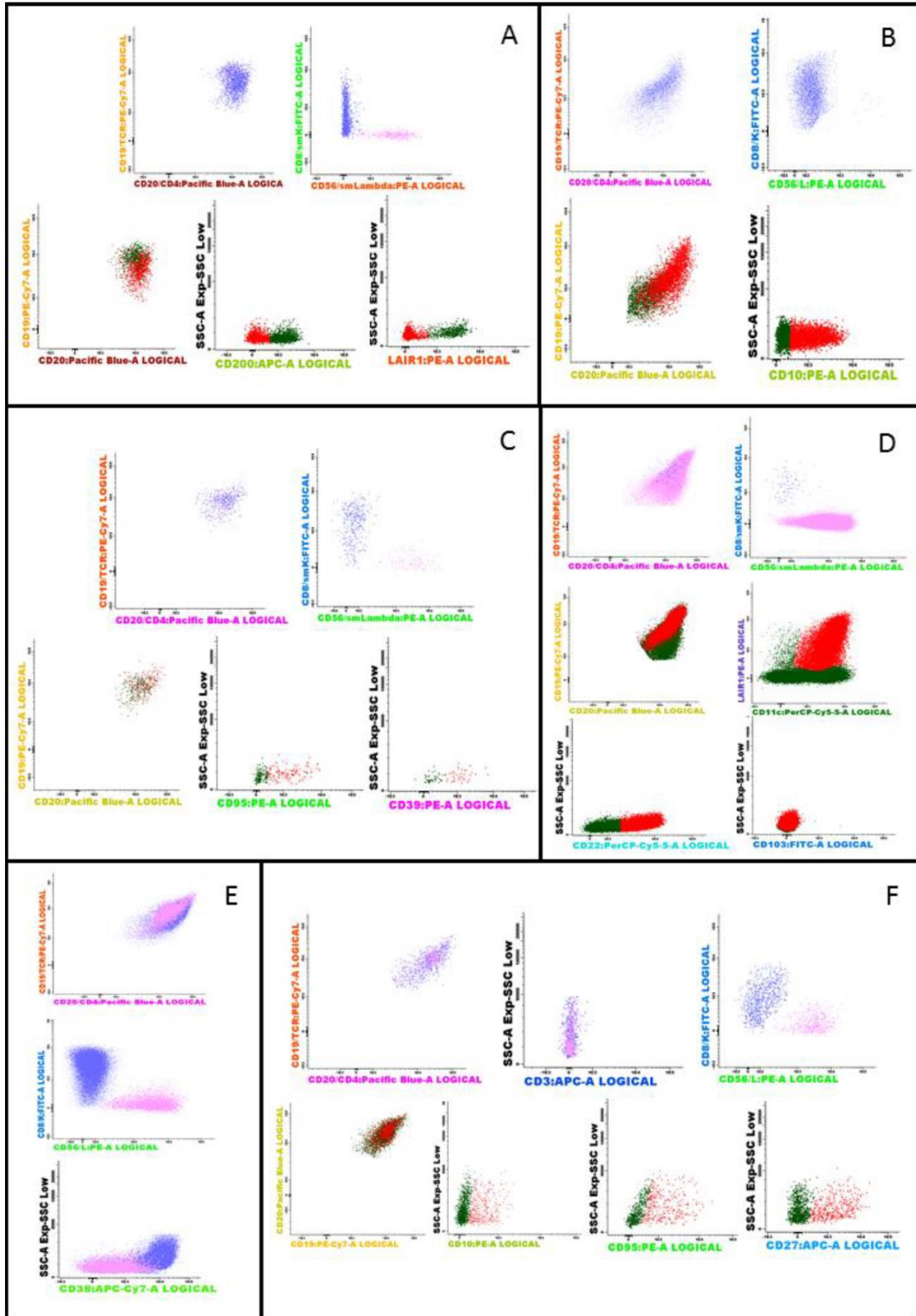


Figure 01. The immunophenotypic analysis of peripheral blood of cases with circulating mature B lymphoid neoplastic cells in the pre-treatment. Identification of B-cells: CD19+ and CD20+, excluding T cells (CD5+ and CD3+). (A) Case 1: B-cell with a little more kappa than expected for normality. Part of B-cells is negative for CD200 and LAIR1. (B) Case 4: the majority of B-cells are kappa light chain restricted. B-cells demonstrated by CD19 and CD20 positivity whose part of the population is

positive for CD10. (C) Case 5: Kappa and lambda with a normal ratio. Part of B-cells is positive for CD95 and CD39. (D) Case 6: the majority of B-cells are lambda light chain restricted. Part of B-cells is positive for LAIR 1 and CD11c, had CD22 overexpression, but is negative for CD103. (E) Case 07: kappa/lambda ratio:10,95. The kappa cells overexpressed CD38 and have more elevated side scatter (SSC), compatible with Burkitt's cells. (F) Case 9: Kappa and lambda with a normal ratio. Part of B-cells is positive for CD10, CD95 and CD27.

167

Table 01. The panel of monoclonal antibodies used in the study.

Fluorochrome	Pacific Blue	Pacific Orange	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
<b>Tube 01</b>	CD20/CD4	CD45	CD8/kappa	CD56/lambda	CD5	CD19/TCRγδ	CD3	CD38
<b>Tube 02</b>	CD20	CD45	CD23	CD10	CD79b	CD19	CD200	CD43
<b>Tube 03</b>	CD20	CD45	CD31	LAIR1	CD11c	CD19	IgM	CD81
<b>Tube 04</b>	CD20	CD45	CD103	CD95	CD22	CD19	--	--
<b>Tube 05</b>	CD20	CD45	CD62L	CD39	HLA-DR	CD19	CD27	--

FITC: fluorescein isothiocyanate; PE: phycoerythrin; PerCP-Cy5.5: peridinin-cyanine chlorophyll protein 5.5; PE-Cy7: phycoerythrin-cyanin 7; APC: allophycocyanin; APC-H7: allophycocyanin-H7.

168

169

Table 02. Clinical and diagnostic characteristics of the patients.

Identification	Age (years)	Pathological diagnosis (Ann Arbor staging)	Bone marrow trephine biopsy at the moment of the diagnosis	Treatment	Post-treatment status
Case 1	63	Orbital MALT Lymphoma (IIIA)	Negative lymphoma	for R-CHOP 21 (8 cycles) + Intrathecal prophylaxis	Complete remission CNS
Case 2	74	Follicular lymphoma for right breast (IAE)	Negative lymphoma	for R-miniCHOP 21 (6 cycles) + local RT	Complete remission
Case 3	75	Gastric DLBC lymphoma (IBE)	Not performed	R-miniCHOP 21 (6 cycles)	Complete remission
Case 4	63	Follicular lymphoma grade 3 (IVA)	Positive for lymphoma	R-CHOP 21 (7 cycles)	Complete remission
Case 5	85	DLBC lymphoma (IIBX)	Negative lymphoma	for R-miniCHOP 21 (8 cycles)	Partial remission
Case 6	64	DLBC lymphoma (IVA)	Positive for lymphoma	R-CHOP 21 (8 cycles) + Intrathecal prophylaxis	Complete remission CNS
Case 7	27	Burkitt lymphoma HIV-associated (IVB)	Positive for lymphoma	CODOX-M/ IVAC (4 cycles) + Intrathecal CNS prophylaxis	Complete remission
Case 8	42	DLBC lymphoma (IVBE)	Negative lymphoma	for CHOP 21 (3 cycles)	Death before completing therapy
Case 9	29	PMLBCL (IVA)	Negative lymphoma	for DA-EPOCH R (1 cycle)	Change of follow-up location

MALT: Mucosa-associated lymphoma tissue; DLBC: diffuse large B cell; HIV: human immunodeficiency virus; PMLBCL: Primary mediastinal large B-cell lymphoma; CNS: central nervous system; RT: radiotherapy. R-CHOP: rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone. R-miniCHOP: reduced-dose regimen of rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone. CODOX-M/ IVAC: cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and methotrexate (CODOX-M) alternating with ifosfamide, etoposide, and cytarabine (IVAC). DA-EPOCH R: dose adjusted of rituximab, etoposide, prednisolone, vincristine, cyclophosphamide and doxorubicin.

170

Table 03. Results of the search for circulating mature B lymphoid neoplastic cells by IFC in the cases described.

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5	Case 6	Case 7	Case 8	Case 9
<b>Pre treatment</b>	Positive	Negative	Negative	Positive	Positive	Positive	Positive	Negative	Positive
<b>During treatment</b>	Negative	Negative	Negative	Negative	NP	Negative	Negative	NP	NP
<b>End of treatment</b>	Negative	Negative	Negative	NP	Negative	Negative	Negative	NP	NP

NP: Not performed. Case 4: It was not yet possible to collect the third sample. Case 5: It was not possible to collect the second sample. Case 8: death, it was not possible to collect the second and third samples. Case 9: patient discontinued treatment in this institution, it was not possible to collect second and third samples.

Table 04. Agreement between immunophenotypic examination of peripheral blood and bone marrow biopsy at the time of diagnosis concerning neoplastic involvement.

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5	Case 6	Case 7	Case 8	Case 9
<b>IFC of peripheral blood</b>	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos
<b>Bone marrow biopsy</b>	Neg	Neg	NP	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg

Pos: positive. Neg: negative. NP: not performed.

171

172

## CLINICAL PRACTICE POINTS

. Tumor staging in non-Hodgkin's lymphoma (NHL) is routinely performed using bone marrow biopsy. We analyzed whether it is possible to identify circulating tumor cells in peripheral blood by flow cytometric immunophenotyping (FCI) and compared the results to initial staging performed through bone marrow biopsy.

. Peripheral blood samples from nine patients with NHL were evaluated using a panel of monoclonal antibodies to detect B-cell chronic lymphoproliferative disorders. In three cases, the FCI analysis showed positive NHL infiltrates for which biopsies were negative. These samples had low tumor burden.

. The use of peripheral blood in the context of staging and monitoring of NHL remains poorly investigated, but the findings of this study allow us to define the importance of FCI in the early identification of neoplastic cells in patients with NHL.

173

174

#### 175 **4. COMENTÁRIOS OU CONSIDERAÇÕES FINAIS**

176

177           Havia uma expectativa de que alcançaríamos um número de amostras mais  
178 proeminente para o desenvolvimento deste trabalho, ao menos o dobro do que  
179 relatamos aqui. Além do número menor que o esperado, nos deparamos com a trágica  
180 pandemia trazida pelo SARS-Cov-2, que modificou nossa rotina de trabalho, inclusive  
181 o trabalho presencial no laboratório de pesquisa por um período de tempo. Isso nos  
182 impediu de trabalhar com amostras “à fresco”, o que pode levar a uma perda de  
183 viabilidade celular na análise das amostras por ICF. Apesar disso, acreditamos que  
184 os resultados aqui obtidos têm a sua importância. Existem ainda poucos estudos  
185 publicados que analisam o sangue periférico como material utilizado para diagnóstico,  
186 estadiamento e seguimento de pacientes portadores de LNH e os trabalhos que  
187 existem não são definitivos, mas trazem resultados promissores.

188

## 189 **5. CONCLUSÃO**

190

191 A análise de sangue periférico por ICF para o estadiamento de LNH mostra-se  
192 um método confiável e promissor por tratar-se de amostra de fácil obtenção e com  
193 resultados rápidos. Neste trabalho houve discordância em 3 dos 9 casos analisados  
194 quando comparamos com biópsia de medula óssea. Estes casos discordante  
195 mostraram-se positivos para neoplasia na ICF e negativos na biópsia de medula  
196 óssea, sendo ainda observado nestes 3 casos infiltração por pequena população  
197 tumoral, sugerindo que a ICF é uma técnica mais sensível. Estes resultados vem em  
198 concordância com dados publicados na literatura médica.

199 Nos momentos de meio e final de tratamento, observamos uma depleção de  
200 células B nas amostras do sangue periférico, sugerindo quimiossensibilidade das  
201 mesmas e corroborando com o status de remissão tumoral observada nos casos que  
202 foram analisados nestes momentos. Além disso, o seguimento destes pacientes a  
203 longo prazo pode trazer informações relevantes no que diz respeito à pesquisa de  
204 DRM. Necessário se faz que estudos mais robustos sigam nessa direção, a fim de  
205 que em um futuro próximo, essa estratégia possa ser utilizada na prática clínica.

206

207 **6. REFERÊNCIAS**

208

209 BARROCA, H.; MARQUES, C. A Basic Approach to Lymph Node and Flow Cytometry  
210 Fine-Needle Cytology. *Acta Cytologica*. v.60, p.284–301, 2016.

211

212 BOFFETTA, P. I. Epidemiology of adult non-Hodgkin lymphoma. *Ann Oncol*. v.22,  
213 n.suppl 4, p.iv27–31, 2011.

214

215 CAFFERTY, L.L; KATZ, R.L.; ORDONEZ, N.G. et al. Fine-needle aspiration diagnosis  
216 of intraabdominal and retroperitoneal lymphomas by a morphologic and  
217 immunocytochemical approach. *Cancer*. v.65, p.72–77, 1990.

218

219 CHASE, M.L.; ARMAND, P. Minimal residual disease in non-Hodgkin lymphoma –  
220 current applications and future directions. *British Journal of Haematology*. v.180,  
221 p.177–188, 2018.

222

223 CHEMINANT, M.; DERRIEUX, C.; TOUZART, A. et al. Minimal residual disease  
224 monitoring by 8-color flow cytometry in mantle cell lymphoma: an EU-MCL and LYSA  
225 study. *Haematologica*. v.101(3), p.336-345, 2016.

226

227 CHESON, B.D; FISHER, R.I; BARRINGTON, S.F et al. Recommendations for Initial  
228 Evaluation, Staging, and Response Assessment of Hodgkin and Non-Hodgkin  
229 Lymphoma: The Lugano Classification. *Journal of Clinical Oncology*. v.32, p.3059-  
230 3068, 2014.

231

232 CHIHARA, D; NASTOUPIL, L.J, WILLIAMS J.N; et al. New insights into the  
233 epidemiology of non-Hodgkin lymphoma and implications for therapy. *Expert Review*  
234 *of Anticancer Therapy*. 2015 May;15 (5):531-544.

235

236 COWAN, A.J.; STVENSON, P.A.; CASSADAY, R.D. et al. Pretransplant minimal  
237 residual disease predicts survival in mantle cell lymphoma patients undergoing  
238 autologous stem cell transplantation in complete remission. *Biol Blood Marrow*  
239 *Transplant*. v.22(2), p.380–385, 2016.

240

241 CRAIG, F.E.; FOON, K.A. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic  
242 neoplasms. *Blood*. v.111, p.3941–3967, 2008.

243

244 DAS, D.K.; GUPTA, S.K.; DATTA, B.N. et al. Fine needle aspiration cytodiagnosis of  
245 Hodgkins disease and its subtypes. I. Scope and limitation. *Acta Cytol.* v.34, p.329–  
246 336, 1990.

247

248 GALIMBERTI, S.; LUMINARI, S.; CIABATTI, E. et al. Minimal Residual Disease after  
249 Conventional Treatment Significantly Impacts on Progression-Free Survival of Patients  
250 with Follicular Lymphoma: The FIL FOLL05 Trial. *Clin Cancer Res.* v.20(24), p.6398-  
251 6405, 2015.

252

253 HERRERA, A.F.; ARMAND, P. Minimal Residual Disease Assessment in Lymphoma:  
254 Methods and Applications. *Journal of Clinical Oncology.* v.35, p.3877-3887, 2017.

255

256 INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Disponível em: [https://www.inca.gov.br/tipos-](https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/linfoma-nao-hodgkin)  
257 [de-cancer/linfoma-nao-hodgkin](https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/linfoma-nao-hodgkin). Acesso em 25/05/2019

258

259 LEUKEMIA & LYMPHOMA SOCIETY. Disponível em:  
260 [www.lls.org/http%3A//lls.org.prod.acquia-sites.com/facts-and-statistics/facts-and-](http://www.lls.org/http%3A//lls.org.prod.acquia-sites.com/facts-and-statistics/facts-and-statistics-overview/facts-and-statistics)  
261 [statistics-overview/facts-and-statistics](http://www.lls.org/http%3A//lls.org.prod.acquia-sites.com/facts-and-statistics/facts-and-statistics-overview/facts-and-statistics). Acesso em: 26/05/19.

262

263 PERRY, A.M.; DIEBOLD, J.; NATHWANI, B.N. et al. Non-Hodgkin lymphoma in the  
264 developing world: review of 4539 cases from the International Non-Hodgkin  
265 Lymphoma Classification Project. *Haematologica.* v.101(10), p.1244-1250, 2016.

266

267 PUTTAGUNTA, L.; HARRIS, N.L.; PITMAN, M.B. The diagnosis of marginal zone  
268 lymphoma by fine needle aspiration biopsy: a comparative analysis. *Mod Pathol.* v.11,  
269 p.42A, 1998.

270

271 STASTNY, J.F.; ALMEIDA, M.M.; WAKELY, P.E. et al. Fine-needle aspiration biopsy  
272 and imprint cytology of small non cleaved cell (Burkitt's lymphoma) *Diagn Cytopathol.*  
273 v.12, p.201–207, 1995.

274

275 SWERDLOW, S.E. CAMPO, HN et al. WHO classification of tumours of  
276 haematopoietic and lymphoid tissues. International Agency of Research on Cancer,  
277 Lyon, France, 4th edition, 2017.

278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308



UFTM - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO TRIÂNGULO



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Análise da presença de células neoplásicas no sangue periférico e em tecido biopsiado por citometria de fluxo em pacientes com neoplasias hematológicas

**Pesquisador:** Fernanda Bernadelli De Vito

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 15134819.6.0000.8667

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.442.015

#### Apresentação do Projeto:

Segundo a pesquisadora: "As neoplasias hematológicas, são proliferações clonais anormais originadas das células do sangue periférico, da medula óssea ou do sistema linfático. Nos Estados Unidos, foi estimado para o ano de 2018, 174.250 pessoas diagnosticadas com neoplasias hematológicas, sendo aproximadamente 35% com leucemia, 48% com linfoma e 18% com mieloma múltiplo (LEUKEMIA AND LYMPHOMA SOCIETY, 2019).

O linfoma não-Hodgkin (LNH) é a malignidade hematológica mais comum no mundo, correspondendo a aproximadamente 5,1% de todos os cânceres (BOFFETTA, 2011). Para o Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer mostram a ocorrência de 10.180 novos casos no ano de 2018 (INCA, 2019).

O aumento da expectativa de vida da população traz consigo uma maior incidência de doenças neoplásicas pois muitas destas se correlacionam com alterações citogenéticas adquiridas no processo de envelhecimento. Assim, métodos de diagnóstico, tratamento e monitorização de doenças oncológicas mais eficazes e pouco invasivos estão cada vez mais sendo alvos de pesquisas.

Atualmente, os linfomas têm seu diagnóstico confirmado a partir do exame anatomopatológico convencional acrescido de estudo imunohistoquímico do tecido acometido. Entretanto, novas técnicas têm sido estudadas para permitir uma identificação mais rápida da doença, como a imunofenotipagem por citometria de fluxo (ICF) desses tecidos. Esta avaliação

**Endereço:** R. Benjamin Constant, 16

**Bairro:** Nossa Srª da Abadia

**CEP:** 38.025-470

**UF:** MG

**Município:** UBERABA

**Telefone:** (34)3318-5319

**E-mail:** cep.hctm@ebserh.gov.br

UFTM - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO TRIÂNGULO



Continuação do Parecer: 3.442.015

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Vanessa.pdf	31/05/2019 08:55:16	Fernanda Bernadelli De Vito	Aceito
---	------------------	------------------------	--------------------------------	--------

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

UBERABA, 05 de Julho de 2019

---

**Assinado por:**  
**GILBERTO DE ARAUJO PEREIRA**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** R. Benjamin Constant, 16

**Bairro:** Nossa Srª da Abadia

**CEP:** 38.025-470

**UF:** MG

**Município:** UBERABA

**Telefone:** (34)3318-5319

**E-mail:** cep.hctm@ebserh.gov.br