



Pesquisa de DRM por Citometria de Fluxo: quando é útil e o que estamos fazendo como grupo no Brasil?

Reunião GBCFLUX
Hemo 2016

DRM : significância clínica

- LLA: impacto mais importante para definição terapêutica. Utilizada como *end point* em novos *trials* clínicos
- LMA: embora de valor prognóstico, sem consenso quanto ao uso para definir conduta
- Mieloma Múltiplo: importância fundamental como *end-point* das novas terapêuticas
- LLC: monitoramento importante para pacientes elegíveis a tratamentos imunossupressores e novas drogas
- Linfomas e Tricoleucemia: propostas de painéis na literatura, sem consenso ainda sobre a utilidade terapêutica

Leucemia Linfoblástica Aguda

- Em LLA, é o mais importante fator prognóstico independente superior aos outros fatores clínicos e biológicos previamente usados para definição de risco de recidiva
- Utilizada ao final da indução para re-estratificação de terapêutica
- Na recidiva ou refratariedade terapêutica: definição sobre TCTH ou novas drogas anti-CD19
- Pré e pós TCTH: impacto na SLE pós transplante
perspectivas de terapêuticas pre-emptivas para evitar recidiva

GRUPO DE TRABALHO DE DRM EM LEUCEMIAS AGUDAS POR CFM



Início: 02/08/2012 (XVI Congresso SBTMO – Ribeirão Preto)

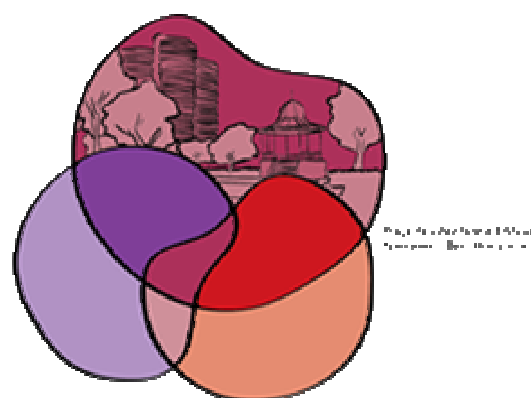
Objetivos

- Discutir o nível de segurança e de sensibilidade da CFM para DRM em Leucemias Agudas que podemos oferecer para avaliação de resposta terapêutica
- Estabelecer critérios para garantir essa sensibilidade diagnóstica em DRM por CFM
- Propor padronização multicêntrica e controles interlaboratoriais

Educacional

- Distribuição de literatura
- Disponibilização *on line* de arquivos de medula óssea normal de crianças e adultos (8 centros / 24 amostras)
- Discussões/ apresentações em reuniões

1º Consenso de Painéis de DRM em LLA



SBTMO 2014

XVIII Congresso da Sociedade Brasileira
de Transplante de Medula Óssea

XIV Encontro Anual de Histocompatibilidade e Imunogenética



REALIDADE BRASILEIRA



Cadastrados

- 60 Laboratórios / 97 CF
- 244 membros
- Citômetros por laboratório:

50% 3 and 4 color
50% > 4 color
≥ 8 color : 7 use for diagnosis

RECOMENDAÇÕES PAINEL DE LLA LINHAGEM B 4 CORES



MANDATÓRIO OU ESSENCIAL

FITC	PE	PerCP Cy5 ou Cy5.5	APC
CD20	CD10	CD19	CD34
cylgM	CD13	CD19	CD22
nTdT	CD33	CD19	CD38

ÂNCORAS

MATURAÇÃO

RECOMENDÁVEL , se cylgM for positivo:

SmKappa	SmLambda	CD19	SmIgM
---------	----------	------	-------

INFIDELIDADE
DE LINHAGEM

MARCADORES
DE DRM

OPCIONAL

CD 58	CD 66c	CD 45	CD 19
CD 15/CD 65	NG2 (7.1)	CD 45	CD 19

LESÕES
MOLECULARES

PROPOSTA DE PAINEL DE 4 CORES PARA DRM LLA LINHAGEM B

Mandatório: maturação celular

CD20 FITC/ CD 10PE/ CD19PerCP ou Cy5.5 / CD34APC
CD45 FITC/ CD34 PE/ CD19PerCP ou Cy5.5 / CD38 APC
nTdT FITC/ CD10 PE / CD19PerCP ou Cy5.5 / CD38 APC

Recomendável: marcadores anômalos

CD81 FITC/ CD 66PE/ CD19PerCP ou Cy5.5 / CD34APC
CD45 FITC/ CD123PE/ CD19PerCP ou Cy5.5 / CD34APC
CD15FITC+CD65FITC, NG2PE /CD45PerCP/ CD19APC

Opcionais: conforme expressão ao diagnóstico

CD9 FITC, CD58 FITC, CD13 e/ou CD33 PE, CD 117PE, CD25 PE,
CD22 PE

**backbone*

RECOMENDAÇÕES DE PAINEL DE LLA LINHAGEM T 4 CORES



MANDATÓRIO OU ESSENCIAL

FITC	PE	PerCP Cy5 ou y5.5	APC
NuTdT	CD 7	<u>cyCD 3</u>	CD 10
CD 8	CD 7	CD 4	<u>SmCD 3</u>
CD 7	CD 1a	CD 2	CD 5

ÂNCORAS

MATURAÇÃO
E
CLASSIFICAÇÃO

RECOMENDÁVEL , se SmCD 3 positivo:

TCR $\alpha\beta$	CD 7	SmCD 3	-
TCR $\gamma\delta$	CD 7	SmCD 3	-
ou TCR $\alpha\beta$	TCR $\gamma\delta$	SmCD 3	CD 7

Early T

OPCIONAL PARA DRM

CD 7	CD 13	SmCD 3	CD 117
CD 7	CD 33	SmCD 3	CD 123
CD 7	CD 99	SmCD 3	CD 56

MARCADORES ANÔMALOS
(LAIPs)

PROPOSTA DE PAINEL DE 4 CORES DRM LLA LINHAGEM T

Mandatório: maturação celular

cyCD3 FITC, sCD3 PE, CD45 PerCP CD7 APC
nTdT FITC / CD2 PE / CD5 PerCP / CD7 APC

Recomendável: se expressão ao diagnóstico

CD1a PE/ **CD99 PE**/ CD3 PerCP/ CD7 APC

Opcional: conforme expressão ao diagnóstico

CD13PE, CD33PE, CD34PE, CD10PE, CD117PE , CD44PE,
CD45RA.

**backbone*

RECOMENDAÇÕES PARA AVALIAÇÃO DE DRM EM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

- **Citômetro de Fluxo - no mínimo 4 cores para LLA**

Padronizações:

- 1) protocolos de preparo de amostras e de reagentes
- 2) controle da amostra: morfologia, hemodiluição, celularidade, volume, anticoagulante
- 3) parâmetros do CF sempre estáveis (calibração, ajustes fluorescências, compensação)
- 4) CQ internos (estabilidade CF, reagentes, AcMo) e externos (a implementar)
- 5) utilizar mesmos Ac monoclonais, clones e fluorescências do diagnóstico
- 6) uso obrigatório dos AcMo *backbones* (2 para CF 4 cores e 4 para 8 cores)
- 7) marcadores expressão fraca com fluorocromos brilhantes

RECOMENDAÇÕES PARA AVALIAÇÃO DE DRM EM LEUCEMIAS AGUDAS

- Painéis padronizados e amplos ao diagnóstico (GBCFLUX)¹
- Aquisição de no mínimo 1000000 de eventos totais, sem *gate*



AQUISIÇÃO DE 500000 DE EVENTOS/TUBO (protocolo de lise maciça = *bulklysis*)



AUMENTO DE SENSIBILIDADE



Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia
Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy

www.rbhh.org



Special article

Proposal for the standardization of flow cytometry protocols to detect minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia



Maura Rosane Valério Ikoma^{a,*}, Miriam Perlingeiro Beltrame^b,
Silvia Inês Alejandra Cordoba Pires Ferreira^c, Elizabeth Xisto Souto^d,
Mariester Malvezzi^b, Mihoko Yamamoto^e, on behalf of Minimal Residual Disease
Working Group of the Brazilian Society of Bone Marrow Transplantation (SBTMO)¹

^a Fundação Amaral Carvalho (FAC), Jaú, SP, Brazil

^b Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil

^c Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC), Florianópolis, SC, Brazil

^d Diagnósticos da América (DASA), São Paulo, SP, Brazil

^e Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP, Brazil

PERSPECTIVAS

- Painéis padronizados de 8 ou mais cores
- Padronizações plena dos processos pré e pós analíticos
- Avanços dos *software* para análise de dados

AUMENTO DE SENSIBILIDADE (10^{-5})

DIMINUIÇÃO DA “SUBJETIVIDADE”

INCORPORAÇÃO DE OUTROS MARCADORES ÚTEIS PARA ESTUDO DE DRM EM LLA

Relacionam-se a alterações moleculares

CD 44, BCL-2, HSPB1, **CD 73**, CD 24, **CD123**, CD 72
CD 86, CD 200, CD 79 b, CD 164, CD 304, CD 97,
CD 102, CD 99, CD 300 a, CD 130, PBX1, CTNNA1
TGB7, CD 69, CD 49f

Coustan-Smith et al. Blood 2011;117:6267-76

Tembhare et al. Cytometry 2016 DOI: 10.1002/cyto.b.21486

Marcadores com relevância diagnóstica, padronizados pelo Euroflow para LLA linhagem B

CD 73 e CD 304

Van der Velden et al ESCCA 2016 – enviado para publicação

GRUPO DE TRABALHO DE DRM EM LEUCEMIAS AGUDAS



Citometria de Fluxo

Ana Paula Alegretti (HC Porto Alegre)
Ana Paula Azambuja(UFPR/ Mantis Curitiba)
Elaine C Pereira (UFRJ)
Elizabeth X Souto (DASA -SP)
Irene Lorand-Metze (UNICAMP)
Maria Luiza M Cortez (N Hematologia BH)
Mariester Malvezi (UFPR)
Maura R Valério Ikoma (H Amaral Carvalho Jau)
Mirian P Beltrame (UFPR)
Myhoko Yamamoto (UNIFESP)
Norma Lucena C Silva (FIOCRUZ Recife)
Nydia S Bacal (H Albert Einstein –SP)
Sílvia Ines Pires Ferreira (HEMOSC/ Lab Sta Luzia)
Virginia Pires (INCA)

Colaboradores

Alex F Sandes (Lab Fleury)
Cintia G F Machado (HEMOPE)
Leandro S Thiago (INCA)
Maria Mirtes Sales (HCFMUSP)
Elizabeth Delbuono (GRAAC)

Grupo Clínico

Adriana Seber (Hospital Samaritano - SP)
Vergílio A Rensi Colturato (H A Carvalho Jau)

Contatos

maura.ikoma@amaralcarvalho.org.br

mbeltrame@ufpr.br

Grupo de trabalho DRM SBTMO

Conta Google Drive

grupodrmsbtmo@gmail.com

LLC - BRASIL

Recomendações:

Publicação de consenso:

- Arais et al. RBHH, 2016 - *in press*
Diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia:
recommendations from the Brazilian group of chronic lymphocytic leukemia
(LLC-Brasil)
- Painéis diagnósticos: GBCFUX
- Painéis de DRM em conjunto com LAG-CLL : 4, 6 e 8 cores ERIC^{1,2,3}

1. Rawstron et al. Leukemia 2007; 21: 956-964
2. Rawstron et al. Leukemia 2013; 27: 142-149
3. Rawstron et al. Leukemia 2016; 30: 929-936

European Research Initiative on CLL (ERIC)

ISA (International Sandarized Approach) - MRD

- Painel 4 cores: resultados mais reprodutíveis e específicos**

FITC	PE	PERCP-Cy5.5	APC
CD 20	CD 3	CD 19	CD 5
CD 20	CD 38	CD 19	CD 5
CD 81	CD 22	CD 19	CD 5
CD 43	CD 79 b	CD 19	CD 5
CD 45	CD 22	CD 19	CD 5

X

(k/l/CD19/CD5+)*

*** > 82% CD 5+ B cells**

High κ/λ ratio

Wk Ig CD 5+ cells

- Painel 6 cores**

FITC	PE	PERCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
CD 3	CD 38	CD 5	CD 19	CD 79b	CD 20
CD 81	CD 22	CD 5	CD 19	CD 43	CD 20

CD27 CD200 CD160 ROR1

ERIC/ EUROFLOW 8 cores

- **Painel 8 cores (Euroflow)**

CD19/ CD5/ CD20/ CD3/ CD81/ CD79b/ CD22/ CD 43

- **Painel 8 cores – harmonização ERIC/Euroflow members (ESCCA 2016)**

CD19/ CD5/ CD43/ CD79b/ CD81/ CD200/ CD10/ ROR 1

Mieloma Múltiplo: Painei GBCLUX

Diagnóstico:

Tubo 1: CD38 /CD56 / CD19 / CD138

Tubo 2: cyLambda / cyKappa / CD19 /CD38

DRM:

Tubo 3: CD38 / CD117 / CD27/ CD138

Tubo 4: CD38 / CD81/ CD45 / CD138

“A combination of CD38/CD117/CD27/CD138 and CD38/CD81/CD45/CD138 was developed to assess prognosis in MM and detect myeloma-associated immunophenotype to guide MRD evaluation.”

Regional Spotlight

Diagnosis of Chronic Lymphoproliferative Disorders by Flow Cytometry Using Four-Color Combinations for Immunophenotyping: A Proposal of the Brazilian Group of Flow Cytometry (GBCFLUX)

M. M. Sales,¹ S. I. A. C. P. Ferreira,² M. R. V. Ikoma,³ A. F. Sandes,⁴ M. P. Beltrame,⁵ N. S. Bacal,⁶ M. C. A. Silva,¹ M. Malvezzi,^{7*} I. G. H. Lorand-Metze,⁸ A. Orfao,⁹ and M. Yamamoto¹⁰; on behalf of GBCFLUX

¹Hospital Das Clínicas Da Faculdade De Medicina Da Universidade De São Paulo, SP, Brazil

²Centro De Hematologia E Hemoterapia De Santa Catarina – HEMOSC, Brazil

³Hospital Amaral Carvalho – Jau, SP, Brazil

⁴Division of Hematology and Flow Cytometry, Fleury Group, São Paulo, SP, Brazil

⁵Unidade De Apoio Diagnóstico, Hospital De Clínicas - UFPR, Brazil

⁶Hospital Albert Einstein, São Paulo, SP, Brazil

⁷Disciplina De Hematologia Do Departamento De Clínica Médica Da Universidade Federal Do Paraná, PR, Brazil

⁸Universidade Estadual De Campinas, SP, Brazil

⁹Cancer Research Centre (IBMCC, CSIC-USAL), Institute of Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), Cytometry Service and Department of Medicine, University of Salamanca, Spain

¹⁰Escola Paulista De Medicina, Universidade Federal De São Paulo (EPM-UNIFESP), SP, Brazil

Propostas GBCFLUX

- Validação painéis publicados
- Avaliações dos processos pré e pós analíticos publicados
- Avaliação das dificuldades dos laboratórios brasileiros em implantar a metodologia
- Treinamento
- Avanço para CFM de 8 ou mais cores

Obrigada



www.gbcflux.com.br

contato@gbcflux.com.br