

Análisis de Criterios Inmunofenotípicos por Citometría de Flujo para Definir Enfermedades Linfoproliferativas Crónicas de Células B

doi: <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2023v69n1.2734>

Analysis of Immunophenotypic Criteria by Flow Cytometry to Define B-Cell Chronic Lymphoproliferative Diseases

Análise dos Critérios Inmunofenotípicos por Citometria de Fluxo para Definição das Doenças Linfoproliferativas Crônicas de Células B

Lacy Cardoso de Brito Junior¹; Maria Beatriz da Silva Fonseca²; Ana Paula Silveira Paixão³; Nilmara Suellen Lopes Castro Mendes⁴; Jessica Sabrina Cordeiro Parente⁵; Matheus Holanda Nascimento (in memoriam)⁶

RESUMEN

Introducción. La citometría de flujo es una metodología importante para el diagnóstico de enfermedades linfoproliferativas crónicas de células B (ELPCB), sin embargo, en ocasiones el citometrista no encuentra suficiente sustento para la definición exacta de la entidad patológica involucrada. **Objetivo:** Analizar los informes emitidos a pacientes con enfermedades linfoproliferativas crónicas (ELPC) tratados en un laboratorio privado en Belém-PA, de acuerdo con los criterios de clasificación establecidos por los estudios de Matutes et al. y Craig y Foon. **Método:** Retrospectivo con relatos de pacientes que se sometieron a inmunofenotipificación por citometría de flujo para el diagnóstico de ELPC de septiembre de 2015 a diciembre de 2019. **Resultados:** Tras aplicar los criterios de Matutes et al. y Craig y Foon a los informes analizados, se observó concordancia en: 45,24% de los casos de leucemia linfocítica crónica de células B/linfoma linfocítico de células B pequeñas; 14,29% casos de linfoma folicular; 4,76% casos de leucemia de células peludas; y 21,43% de los casos definidos como “otros ELPCB no clasificables por citometría de flujo”. Sin embargo, la prueba de hipótesis de Hotelling ($p=0,0409$) mostró diferencia estadística para la definición de ELPCB según los criterios aplicados. **Conclusión:** Nuestros resultados enfatizan que si bien la citometría de flujo es importante para la caracterización de ELPCB, en ocasiones el citometrista necesita incluir en el informe la categoría “otras enfermedades linfoproliferativas crónicas de células B no clasificadas por citometría de flujo” para inducir al prescriptor a solicitar más exámenes complementarios.

Palabras clave: trastornos linfoproliferativos/diagnóstico; inmunofenotipificación; citometría de flujo.

ABSTRACT

Introduction: Flow cytometry is an important methodology for the diagnosis of chronic B-cell lymphoproliferative diseases (CBCLPD), however, sometimes the cytometrist does not find sufficient elements for the exact definition of the pathological entity involved. **Objective:** To analyze the reports issued to patients with chronic lymphoproliferative diseases (CLPD) tested at a private laboratory in Belém-PA, according to the classification criteria established by the studies by Matutes et al. and Craig and Foon. **Method:** Retrospective study with reports of patients who underwent immunophenotyping by flow cytometry for the diagnosis of CBCLPD from September 2015 to December 2019. **Results:** After applying the criteria by Matutes et al. and Craig and Foon to the reports analyzed, agreement was reached for 45.24% of the cases of chronic B-cell lymphocytic leukemia/small B-cell lymphocytic lymphoma, 14.29% of the cases of follicular lymphoma, 4.76% of the cases of hairy cell leukemia and 21.43% of the cases defined as “other CBCLPDs not classifiable by flow cytometry”. However, Hotelling’s hypothesis test ($p=0.0409$) showed a statistical difference for the definition of CBCLPD according to the criteria adopted. **Conclusion:** The results emphasize that even though flow cytometry is important for the characterization of CBCLPD, sometimes the cytometrist needs to include the category “other chronic B-cell lymphoproliferative diseases not classified by flow cytometry” in the report to induce the prescriber to request additional complementary exams. **Key words:** lymphoproliferative disorders/diagnosis; immunophenotyping; flow cytometry.

RESUMO

Introdução: A citometria de fluxo é uma metodologia importante para o diagnóstico das doenças linfoproliferativas crônicas de células B (DLPCB), contudo, por vezes, o citometrista não encontra subsídios suficientes para a definição exata da entidade patológica envolvida. **Objetivo:** Analisar os laudos emitidos a pacientes com doenças linfoproliferativas crônicas (DLPC) atendidos em um laboratório particular de Belém-PA, segundo os critérios de classificação estabelecidos pelos estudos de Matutes et al. e Craig e Foon. **Método:** Estudo retrospectivo com laudos de pacientes que realizaram imunofenotipagem por citometria de fluxo para diagnóstico de DLPCB no período entre setembro de 2015 a dezembro de 2019. **Resultados:** Depois de aplicados os critérios de Matutes et al. e Craig e Foon para os laudos analisados, observou-se concordância em: 45,24% casos de leucemia linfocítica crônica de células B/linfoma linfocítico de pequenas células B; 14,29% casos de linfoma folicular; 4,76% casos de leucemia de células pilosas; e 21,43% de casos definidos como “outras DLPCB não classificáveis por citometria de fluxo”. Entretanto, o teste de hipóteses de Hotelling ($p=0,0409$) mostrou haver diferença estatística para a definição das DLPCB segundo os critérios aplicados. **Conclusão:** Os resultados ressaltam que, mesmo sendo a citometria de fluxo importante para a caracterização das DLPCB, por vezes, o citometrista necessita incluir no laudo a categoria “outras doenças linfoproliferativas crônicas de células B não classificadas por citometria de fluxo” para induzir o prescritor a solicitar mais exames complementares. **Palavras-chave:** transtornos linfoproliferativos/diagnóstico; imunofenotipagem; citometria de fluxo.

¹Universidade Federal do Pará (UFPA), Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Patologia Geral – Imunopatologia e Citologia. Belém (PA), Brasil. E-mail: lcdbrito2@gmail.com. Orcid iD: <https://orcid.org/0000-0001-9102-5817>

²Pesquisador Autônomo. Belém (PA), Brasil. E-mail: mabifonseca8@gmail.com. Orcid iD: <https://orcid.org/0000-0001-7307-1721>

³Laboratório de Patologia Clínica Dr. Paulo C. Azevedo. Belém (PA), Brasil. E-mails: aps17@gmail.com; nilmaraslcpa@gmail.com. Orcid iD: <https://orcid.org/0000-0003-3827-507X>; Orcid iD: <https://orcid.org/0000-0001-6170-8289>

⁴Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará (Hemopa). Belém (PA), Brasil. E-mail: sabrinacparente@gmail.com. Orcid iD: <https://orcid.org/0000-0002-4706-4103>

⁵UFPA. Laboratório de Patologia Clínica Dr. Paulo C. Azevedo. Belém (PA), Brasil. E-mail: matheusshn97@gmail.com. Orcid iD: <https://orcid.org/0000-0001-9351-2918>

Dirección para correspondencia: Lacy Cardoso de Brito Júnior. UFPA, Instituto de Ciências Biológicas; Laboratório de Patologia Geral – Imunopatologia e Citologia. Av. Augusto Corrêa, 1 – Guamá. Belém (PA), Brasil. CEP 66075-900. E-mails: lcdbrito@ufpa.br; lcdbrito2@gmail.br



INTRODUCCIÓN

Las enfermedades linfoproliferativas crónicas (ELPC) conforman un grupo heterogéneo de neoplasias malignas linfocíticas de células B, T o NK con comportamientos clínicos, factores patológicos y características epidemiológicas^{1,2} muy diferentes entre sí. Entre ellas, las ELPC de células B (ELPCB) son las más frecuentes y tienen sus diagnósticos iniciales realizados por citometría de flujo, con muestras de sangre periférica, siendo principalmente: leucemia linfocítica crónica de células B/linfoma de pequeñas células B (LLC/LLPCB); leucemia de células peludas (LCP), también llamada de tricoleucemia; linfoma de células del manto (LCM); linfoma folicular (LF) y leucemia prolinfocítica (LPL)¹⁻⁴.

Según lo que recomienda la Organización Mundial de la Salud (OMS)^{1,2}, el diagnóstico de ELPCB, con repercusión en la sangre periférica, se hace en pacientes que presentan linfocitosis persistente, más de 5×10^9 linfocitos/ μL de aspecto maduro en el hemograma, acompañada o no de infiltración de la medula ósea, adenomegalia y hepatoesplenomegalia. A partir de estos hallazgos, diversos métodos diagnósticos deben ser aplicados en esta investigación, como, por ejemplo, biopsia e inmunohistoquímica de la masa tumoral cuando esta exista; citogenética clásica o molecular; y, principalmente, la evaluación inmunofenotipo por citometría de flujo de los linfocitos de la sangre periférica o de la medula ósea del paciente. Sin embargo, aunque esta metodología sea simple, rápida, eficiente, menos invasiva por usar muestras de sangre periférica y permitir la clasificación primaria de la entidad patológica involucrada según la ontogenia celular, la fase de maduración y la expresión de antígenos aberrantes³⁻⁹, a veces, el citometrista no encuentra sustento suficiente para la definición exacta de la entidad patológica involucrada.

De esta manera, diversos estudios en la literatura^{5,7,9,10-12} han sugerido que los paneles para esta identificación de las células B clonales maduras deben contener una gran cantidad de combinaciones de anticuerpos monoclonales, como, por ejemplo, los anticuerpos CD19, CD20, CD22, CD79a, CD79b, CD43, Bcl2, Bcl6, CD10, CD5, CD38, CD25, CD23, IgM, CD200, CD103, CD11c, además de anticuerpos para las cadenas ligeras kappa y lambda de la inmunoglobulina; sin embargo, solo después de aplicados los criterios de clasificación inmunofenotipo para las ELPCB, como son los establecidos por los estudios de Matutes et al.¹³ y Craig y Foon¹⁴, es posible una definición más segura de la enfermedad en cuestión.

Los criterios de clasificación de las ELPCB establecidos por Matutes et al.¹³, por ejemplo, toman en cuenta que la LLC/LLPCB es la ELPCB de mayor frecuencia en

muestra de sangre periférica y, así, estos autores evalúan la expresión de cinco marcadores inmunofenotipo (CD5, CD23, FMC7, CD22 o CD79b) para el diagnóstico diferencial entre la LLC/LLPCB y las demás ELPCB. Para esto, los autores otorgan puntaje de 0 a 1 conforme con la intensidad y la expresión o no de estos antígenos en células B. Ellos también consideran que puede tratarse de: LLC/LLPCB típica cuando la calificación está entre 4 y 5 puntos; LLC/LLPCB atípica cuando la calificación está en 3 puntos; y que se trata de otro tipo de ELPCB cuando el puntaje está entre 0 y 2 puntos.

Según Craig y Foon¹⁴, los criterios que deben ser usados para clasificar inmunofenotípicamente las ELPCB toman en cuenta la variación en la expresión de los antígenos CD5 y CD10 en células B maduras, es decir, CD5+CD10-, CD5-CD10+, CD5+CD10+ o CD5-CD10-, en asociación con otros marcadores citogenéticos y moleculares.

De esta forma, el presente estudio tuvo como objetivo analizar los informes emitidos a pacientes con ELPCB atendidos en un laboratorio particular de Belém-PA, de acuerdo con los criterios de clasificación establecidos por Matutes et al.¹³ y Craig y Foon¹⁴.

MÉTODO

Estudio retrospectivo y analítico con datos de informes de pacientes provenientes de demanda espontánea o luego de la atención en uno de los diversos hospitales oncológicos, públicos y privados, de las ciudades de Belém y Santarém, y que realizaron examen de inmunofenotipificación por citometría de flujo para diagnóstico inicial de ELPCB en un laboratorio particular que es referencia en el diagnóstico de leucemias agudas y ELPC en Belém-PA, en el periodo de setiembre de 2015 a diciembre de 2019.

Al tratarse de un estudio sin contacto directo de los investigadores con los sujetos de la investigación y sin el uso de datos personales más allá de sexo y edad, los investigadores se comprometieron con la custodia y el sigilo de los datos obtenidos por medio de la firma del Término de Responsabilidad de Uso, Sigilo y Custodia de Datos con la institución responsable por la concesión de los datos. Esta situación está prevista en la Resolución CNS n.º 466/2012¹⁵.

Han sido incluidos en este estudio informes de los pacientes para diagnóstico inicial de ELPCB. Asimismo, han sido excluidos los informes de pacientes con diagnóstico de ELPC de células T y/o sometidos a la investigación de enfermedad residual mínima para ELPCB.

Para la clasificación, definición y emisión de los informes de las ELPCB en el referido laboratorio, fueron

utilizados los anticuerpos CD19, CD10, CD20, CD5, CD23, CD79b, CD22, CD38, FMC7, CD103, CD25, CD200, CD43, IgM, antikappa y antilambda, y los criterios establecidos por Matutes et al.¹³. Posteriormente, estos informes fueron reclasificados según los criterios establecidos por Craig y Foon¹⁴.

Se realizó estadística descriptiva para la determinación de la frecuencia de casos y además la prueba de hipótesis de Hotelling para el análisis comparativo de los datos; habiendo sido adoptada la hipótesis nula (H0) cuando los criterios de definición fuesen capaces de clasificar las enfermedades de forma igual, y la hipótesis alternativa (H1) cuando los criterios de definición no fuesen capaces de clasificar las enfermedades de la misma manera. Fueron considerados significativos resultados de $p < 0,05$.

RESULTADOS

En el periodo establecido para este estudio, fueron encontrados 54 informes de ELPC diagnosticadas utilizando inmunofenotipificación por citometría de flujo de los linfocitos presentes en muestra de sangre periférica. De estos, 12 informes (22,2%) fueron excluidos por tratarse de muestras de pacientes en seguimiento clínico para ELPCB o en diagnóstico de ELPC de células T. Siendo incluidos entonces solo 42 informes (77,8%) de ELPCB diagnosticadas de acuerdo con los criterios de Matutes et al.¹³.

Del total de la muestra, 24 (57,14%) fueron clasificados como LLC/LLPCB, seis (14,29%) como LF y diez casos (23,81%) fueron clasificados como otras ELPCB excluyendo LLC/LLPCB, sin precisar cuál fue la ELPCB en cuestión (Tabla 1).

Frente a los resultados iniciales para los 42 casos de ELPCB definidas por los criterios de Matutes et al.¹³, se realizó entonces el análisis para la clasificación de las ELPCB según los criterios de Craig y Foon¹⁴ en el cual se observó concordancia en: 19 casos (45,24%) de LLC/

LLPCB; seis casos (14,29%) de LF; dos casos (4,76%) clasificados de LCP y nueve casos (21,43%) clasificados como “otras ELPCB no clasificables por citometría de flujo”.

Luego, usando los criterios de Craig y Foon¹⁴, fueron analizados los informes de ELPCB definidos por los criterios Matutes et al.¹³ (Tabla 2) según el total de 3 y 2 puntos (10 de 42) y que inicialmente fueron clasificadas como “otra ELPC de células B excluyendo LLC/LLPCB”, siendo uno reclasificado como linfoma difuso de grandes células B (LDGCB). Otros cinco casos inicialmente clasificados como LLC/LLPCB atípica por los criterios de Matutes et al.¹³, fueron reclasificados como LF luego de ser aplicados los criterios de Craig y Foon¹⁴.

Tabla 2. Distribución de los casos de LLC/LLPC, LF y otras ELPC, según los criterios de Matutes et al.¹³, obtenidos de un laboratorio particular de Belém-PA, de setiembre de 2015 a diciembre de 2019

Clasificación/ Criterios	Matutes et al. 4 - 5	Matutes et al. 2 - 3
LLC/LLPCB	19	5
LF	3	3
LCP	0	2
Otra ELPCB	0	10

Leyendas: LLC/LLPCB = leucemia linfocítica crónica de células B/linfoma linfocítico de pequeñas células B; LF = linfoma folicular; LCP = leucemia de células peludas; Otras ELPCB = enfermedad linfoproliferativa crónica de células B.

Después, aún para los datos de la Tabla 1, fue realizada la prueba de hipótesis de Hotelling (T2) que mostró haber diferencia estadística ($p=0,0409$) para la definición de las ELPCB cuando son aplicados los criterios de Matutes et al.¹³ y Craig y Foon¹⁴, es decir, aisladamente estos criterios no son capaces de clasificar las diversas entidades que componen las ELPCB de forma igual.

Tabla 1. Distribución del total de casos de ELPCB diagnosticadas según los criterios de Matutes et al.¹³, de Craig y Foon¹⁴, o según la concordancia entre ambos, en un laboratorio particular de Belém-PA, de setiembre de 2015 a diciembre de 2019

Clasificación/ Criterios	Matutes et al. (A)	Craig y Foon (C)	Concordancia entre los criterios (B)	TOTAL (A + B)	TOTAL (C + B)
LLC/LLPCB	4	0	20	24	20
LF	0	5	6	6	11
LCP	0	0	2	2	2
LDGCB	0	1	0	0	1
Otras ELPCB	10	8	0	10	8
TOTAL (A + B)				42	42

Leyendas: LLC/LLPCB = leucemia linfocítica crónica de células B/linfoma linfocítico de pequeñas células B; LF = linfoma folicular; LCP = leucemia de células peludas; LDGCB = linfoma difuso de células B grandes; Otras ELPCB = enfermedad linfoproliferativa crónica de células B.

DISCUSIÓN

Según la OMS^{1,2}, el diagnóstico de ELPCB con repercusión en la sangre periférica debe ser establecido por la conjunción de datos clínicos, morfológicos, inmunofenotipos o inmunohistoquímicos, moleculares y citogenéticos del paciente. Sin embargo, a veces, frente a la sospecha inicial de ELPC, el primer examen a ser realizado para la confirmación del diagnóstico es la inmunofenotipificación por citometría de flujo de los linfocitos de la sangre periférica^{7,8,10-12}.

Para eso, muchos avances tecnológicos, como la construcción de nuevos citómetros de flujo y la inclusión de nuevos anticuerpos para componer los paneles de definición inmunofenotipo de las ELPCB, han sido implantados en los últimos años con el objetivo de aumentar la precisión del diagnóstico de estas enfermedades. Aun así, a veces, el citometrista no encuentra sustento suficiente en esta fase del diagnóstico para la definición exacta de todas las ELPCB.

Con la idea de intentar reducir estas incertidumbres, Matutes et al.¹³, en 1994, fueron los primeros en proponer un sistema de puntaje basado en la evaluación de cinco parámetros de inmunofenotipificación para el diagnóstico diferencial de la LLC/LLPCB de las demás ELPCB. Con este fin, los autores usaron como base la intensidad de expresión en linfocitos B para los antígenos: CD5, CD23, FMC7, CD22 o CD79b y la intensidad de marcación para cadenas ligeras de inmunoglobulina. De manera que, para estos autores, los puntajes de 4 a 5 caracterizaban la LLC/LLPCB típica, hasta 3 puntos definían las LLC/LLPCB atípicas, y entre 0 y 2 puntos excluiría el diagnóstico de LLC/LLPCB.

Esta clasificación se muestra satisfactoria para la definición de las LLC/LLPCB con *score* de 4 y 5 puntos, sin embargo, los problemas de clasificación de este método surgen para los casos en que el puntaje es 3 para células B que no expresan los antígenos IgM, CD5 y CD23, o que presentan expresión fuerte y/o moderada para los antígenos CD20, CD22 y CD79b^{5-7,10,12}. Así, en 2008, Craig y Foon¹⁴ han propuesto un nuevo sistema de clasificación inmunofenotipo para las diversas ELPC de células B y T, en que, para las ELPCB, el criterio a ser adoptado se basaba en la variación de expresión de los antígenos CD5 y CD10 en células B maduras.

En el presente estudio, se observó que los criterios de Matutes et al.¹³ y Craig y Foon¹⁴ se mostraron muy eficientes para la definición de la LLC/LLPCB. Sin embargo, para las ELPCB con *score* de 3 puntos por los criterios de Matutes et al.¹³ y, en el 21,43% de los casos (9 de 42) de ELPCB reclasificados por los criterios de Craig y Foon¹⁴, estas clasificaciones se mostraron con fallas o con baja precisión. De esta forma, exigieron que el citometrista necesite de otros resultados complementarios,

como los exámenes de biología molecular y citogenética, que no siempre están disponibles en el momento de la elaboración del informe.

Böttcher et al.⁹ han sugerido en sus estudios que, frente a esta dificultad, es necesario que el citometrista incluya en sus informes, de ser necesario, la categoría ELPCB “no clasificada” que es de gran utilidad clínica, ya que informa al prescriptor acerca de la necesidad de pruebas auxiliares de histología, citogenética y/o biología molecular para el diagnóstico final de la ELPCB en cuestión.

Bezerra et al.¹⁶ y Boyd et al.⁴, a su vez, discuten que, en varias situaciones, es solamente por la asociación de los resultados de la citometría de flujo con los hallazgos histopatológicos, inmunohistoquímicos y moleculares que es posible diagnosticar y diferenciar procesos reaccionales de neoplasias y, aun, subclassificar las diversas ELPCB.

En este estudio, quedó claro que el uso del término “otras enfermedades linfoproliferativas crónicas excluyendo leucemia linfocítica crónica de células B/linfoma linfocítico de pequeñas células B” en los informes orientó al médico asistente del paciente a solicitar exámenes laboratoriales complementarios para la conclusión del diagnóstico. Y aunque puedan ser usados para el diagnóstico de la LLC/LLPCB los criterios de Matutes et al.¹³ para los *scores* 4 y 5 puntos, se recomienda, sin embargo, para los *scores* iguales o inferiores a 3 puntos, el uso de los criterios propuestos por Craig y Foon¹⁴, conforme con lo sugerido en la literatura actual^{3,8,9,17}.

CONCLUSIÓN

Los resultados resaltan que aun siendo la citometría de flujo una metodología importante para la caracterización inmunofenotípica de las ELPCB, todavía no es suficiente para definir con precisión todas las entidades patológicas que caracterizan estas enfermedades. Por lo tanto, se sugiere que el citometrista, siempre que sea necesario, incluya en su informe otra categoría diagnóstica descrita así: “otras enfermedades linfoproliferativas crónicas de células B no clasificadas por citometría de flujo”.

APORTES

Lacy Cardoso de Brito Junior contribuyó sustancialmente en la concepción y en la planificación del estudio; en la obtención, análisis e interpretación de los datos; en la redacción y revisión crítica. Maria Beatriz da Silva Fonseca, Ana Paula Silveira Paixão, Nilmara Suellen Lopes Castro Mendes, Jessica Sabrina Cordeiro Parente y Matheus Holanda Nascimento (*in memoriam*) contribuyeron sustancialmente en la concepción y en la planificación del estudio; en la obtención, análisis e interpretación de los datos. Todos los autores aprobaron la versión final a ser publicada.

AGRADECIMIENTOS

A los Directores del Laboratório de Patología Clínica del Dr. Paulo C. Azevedo por haber autorizado la utilización de los datos para la elaboración de este estudio.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

Nada que declarar.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Universidad Federal do Pará.

REFERENCIAS

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al., editors. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Vol. 2. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer (IARC); 2008.
2. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-90. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-643569>
3. Gaidano V, Tenace V, Santoro N, et al. A clinically applicable approach to the classification of B-Cell non-Hodgkin lymphomas with flow cytometry and machine learning. *Cancers (Basel)*. 2020;12(6):1684. doi: <https://doi.org/10.3390/cancers12061684>
4. Boyd SD, Natkunam Y, Allen JR, et al. Selective immunophenotyping for diagnosis of B-cell neoplasms: immunohistochemistry and flow cytometry strategies and results. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2013;21(2):116-31. doi: <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e31825d550a>
5. Davis BH, Holden JT, Bene MC, et al. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the flow cytometric immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia: medical indications. *Cytometry B Clin Cytom*. 2007;72B(S1):S5-13. doi: <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20365>
6. Tute RM. Flow cytometry and its use in the diagnosis and management of mature lymphoid malignancies. *Histopathology*. 2011;58(1):90-105. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2010.03703.x>
7. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26(9):1908-75. doi: <https://doi.org/10.1038/leu.2012.120>
8. Glynn E, Soma L, Wu D, et al. Flow cytometry for non-Hodgkin and Hodgkin lymphomas. *Methods Mol Biol*. 2019;1956:35-60. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9151-8_2
9. Böttcher S, Engelmann R, Grigore G, et al. Expert-independent classification of mature B-cell neoplasms using standardized flow cytometry: a multicentric study. *Blood Adv*. 2022;6(3):976-92. doi: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021005725>
10. Rawstron AC, Kreuzer KA, Soosapilla A, et al. Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: an European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) harmonisation project. *Cytometry B Clin Cytom*. 2018;94(1):121-8. doi: <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21595>
11. Zhao M, Mallesh N, Höllein A, et al. Hematologist-level classification of mature B-cell Neoplasm using deep learning on multiparameter flow cytometry data. *Cytometry A*. 2020;97(10):1073-80. doi: <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24159>
12. Brito Junior LC, Feio DCA, Barbosa SR, et al. Diagnóstico de imunofenótipos de síndromes linfoproliferativas crônicas por citometria de fluxo na Fundação HEMOPA. *J Bras Patol Med Lab*. 2011;47(6):607-10. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442011000600006>
13. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*. 1994;8(10):1640-5. Cited in: PubMed; PMID 7523797.
14. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 2008;111(8):3941-67. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2007-11-120535>
15. Conselho Nacional de Saúde (BR). Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. *Diário Oficial da União, Brasília, DF*. 2013 jun 13; Seção 1:59.
16. Bezerra AMPS, Pasqualin C, Guerra JCC, et al. Correlation between flow cytometry and histologic findings: ten year experience in the investigation of lymphoproliferative diseases. *Einstein (São Paulo)*. 2011;9(2):151-9. doi: <https://doi.org/10.1590/S1679-45082011AO2027>
17. Hoffmann J, Rother M, Kaiser U, et al. Determination of CD43 and CD200 surface expression improves accuracy of B-cell lymphoma immunophenotyping. *Cytometry B Clin Cytom*. 2020;98(6):476-82. doi: <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21936>

Recebido em 7/6/2022
Aprovado em 17/10/2022