resultado da biopsia mediastinal liberado em 14/02/2023 (CD20+CD30+ EBV+ PAX5- CD3- CKAE1/AE3- ALC-OCT3/4-): Linfoma da Zona Cinzenta (LZC) com características intermediárias entre linfoma de Hodgkin clássico esclerose nodular e linfoma difuso de grandes células B. Realizou novo PET CT após o segundo ciclo de R-ICE, cujo resultado foi satisfatório com poucas áreas de hipercaptação evidenciando resposta parcial. Paciente encontra-se clinicamente bem, aguardando a realização de novo PET-CT após o quarto ciclo de R-ICE. A continuidade do tratamento será com radioterapia e transplante de medula óssea alogênico. **Discussão:** LZC foi apresentado em 1998 e incorporado na classificação WHO2008 como linfoma B não classificado com características intermediarias entre LDGC e LHC. Tanto o diagnóstico quanto a terapêutica são desafiadores até os dias atuais. Afeta mais comumente adultos jovens, mas pode também ser diagnosticado em crianças. O mediastino anterior é o sítio mais comum e ocasionalmente pode ser sistêmica sem acometimento mediastinal. Pacientes com LZC tem alta taxa de recaída. O tratamento de primeira linha pode ser com R-CHOP ou EPOCH-R. Na doença refratária ou em recaída está indicado o transplante de medula óssea, radioterapia, brentuximabe, imunoterapias e terapias celulares. **Conclusão:** Este relato ilustra a dificuldade diagnóstica e da decisão terapêutica descrita na literatura e reafirma o quanto é necessária a integração entre a equipe clínica e laboratorial para o diagnóstico de certeza.

https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.1059

CONTRIBUTION OF NEXT-GENERATION SEQUENCING TO THE DIAGNOSIS OF JUVENILE MYELOMONOCYTIC LEUKEMIA: A CASE REPORT

FK Marques [a], BC Rezende [b], BLO Jardim [b], MCM Freire [c], MC Azevedo [c]

[a] *Pesquisa e Desenvolvimento, Instituto Hermes Pardini, Vespasiano, MG, Brazil*
[b] *Genética Molecular, Instituto Hermes Pardini, Vespasiano, MG, Brazil*
[c] *Medicina Personalizada, Grupo Fleury – Instituto Hermes Pardini, Vespasiano, MG, Brazil*

Juvenile Myelomonocytic Leukemia (JMML) is a rare myeloproliferative neoplasm of childhood characterized by infiltration of abnormal myelomonocytic cells in peripheral blood, bone marrow, and spleen. The majority of JMML patients have somatic and/or germline variants in RAS signaling pathway genes. Although the karyotype is predominantly normal, monosomy of chromosome 7 is observed in about 25% of cases. The diagnosis of JMML can be made by combining clinical, laboratory, and molecular data. In this study, we report the case of a six-year-old male patient with an initial presentation of rectal bleeding accompanied by severe thrombocytopenia. The bone marrow examination showed a mildly hypercellular bone marrow with moderate dysgranulopoiesis and blasts with myeloid characteristics, 1.6% basophils, 3.4% monocytes, and 3.4% promonocytes, suggesting Myelodysplastic Syndrome (MDS) or JMML. Immunophenotyping of peripheral blood revealed signs of granulocytic dysplasia, monocytosis (11.7%), 3.5% promonocytes, and 6.0% immature myeloid cells, which were also suggestive of MDS or JMML. Hemoglobin electrophoresis revealed 13.6% fetal hemoglobin. Bone marrow biopsy showed a cell-to-fat ratio of 98% due to the proliferation of blastoid immature cells. No fibrosis or deposits were observed in the bone marrow. Karyotyping of the bone marrow was normal, and BCR:ABL1 fusion was negative. Next-Generation Sequencing (NGS) panel testing was performed to detect variants in 40 genes (including CBL, KRAS, NRAS, PTPN11, and NF1) and gene fusions involving 29 driver genes. Variants were detected in the PTPN11 gene (c.215C>T, p.Ala72Val, VAF: 42.7%) and NRAS gene (c.35G>A, p.Gly12Asp, VAF: 28.9%), both of which are RAS pathway genes. No gene fusions were detected. Somatic variants in PTPN11 are the most common molecular alterations in JMML, detected in 35% to 40% of patients, and are associated with an aggressive clinical course and adverse prognosis. Approximately 25% to 30% of patients have somatic variants in NRAS or KRAS. The current diagnostic criteria for JMML include blast percentage in peripheral blood or bone marrow less than 20%, splenomegaly, monocyte count $\geq 1.0 \times 10^9$/L, absence of BCR:ABL1 fusion, and the presence of at least one variant in RAS pathway genes. In this context, the findings of the NGS panel were decisive for the diagnosis of JMML. Despite advances in understanding the molecular landscape of JMML, this disease remains challenging, with a wide range of phenotypes and outcomes, ranging from rare forms that resolve spontaneously to aggressive cases with adverse prognosis. Characterization of genomic alterations not only contributes to elucidating the oncogenic mechanisms involved in the pathogenesis of the disease but also provides relevant information for prognosis definition and clinical decision-making.

https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.1060

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE BETA TALASSEMIA INTERMÉDIA: RELATO DE HETEROZIGOTO COMPOSTO PARA MUTAÇÃO HBB:C.118C>T (CD39) E HBB:C.-138C>T (-88C>T)

VS Ramos [a], ACM Berti [a,b], GA Bernardino [a], LA Souza-Junior [a], IS Dias [a], RD Costa [c], MF Galera [c], L Gazarini [a], E Belini-Júnior [a]

[a] *Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campus de Três Lagoas (UFMS/CPTL), Três Lagoas, MS, Brasil*
[b] *Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), São Paulo, SP, Brasil*
[c] *Universidade Federal de Mato Grosso, Hospital Universitário Júlio Müller (HUJM-UFMT), Cuiabá, MT, Brasil*

Objetivo: Demonstrar a relevância do diagnóstico molecular na identificação de heterozigoto composto para beta talassemias HBB:c.118C>T (CD39) e HBB:c.-138C>T (-88C>T) em recém-nascido da triagem neonatal. **Materiais e métodos:** Amostra de sangue de um paciente do sexo masculino, três meses de idade, procedente do Hospital Universitário Júlio Müller (HUJM-UFMT), foi encaminhada para Laboratório de Genética e Biologia Molecular (UFMS/CPTL) para análise laboratorial de perfil hemoglobínico inconclusivo, juntamente com exames hematológicos complementares. Para determinar as frações hemoglobínicas do paciente, a amostra foi submetida à Cromatografia Líquida de Alta Performace (HPLC-Ultra2, *Trinity Biotech, Kit Resolution*) e para o estudo molecular foi realizado o sequenciamento do gene beta globina (HBB) (sequenciador *3770xl DNA analyser*). **Resultados:** Após análises por HPLC e sequenciamento, o perfil de hemoglobina da criança foi Hb F (90,2%), Hb A (3%) e Hb A2 (0,9%) com a presença das mutações HBB:c.-138C>T (Beta++ talassemia, -88C>T) e HBB:c.118C>T (Beta^0 talassemia, CD39), ambas em heterozigose. Em relação aos dados hematológicos os seguintes parâmetros foram observados: RBC de 3,77 milhões/mm^3, Hb de 9,9 g/dL, Hct de 29,3%, VCM de 77,7 fl, HCM de 26,4 pg, CHCM de 34,0 g/dL, RDW de 23,5%, contagem de reticulócitos 4,62%, ferritina 384,3 ng/mL, Lactato Desidrogenase (LDH) 418 U/L, bilirrubina total 1,2 mg/dL, bilirrubina direta 0,4 mg/dL e bilirrubina indireta 0,8 mg/dL. **Discussão:** Na mutação CD39 um códon de parada é gerado impedindo a tradução eficaz do RNAm do gene HBB, o que leva ao fenótipo β^0. Por outro lado, a mutação -88C>T, presente na região promotora, causa uma leve redução na expressão da β-globina. A interação dessas mutações resulta no fenótipo de beta talassemia intermédia, a qual é caracterizada por uma heterogeneidade clínica que se situa entre os sintomas leves do traço talassêmico e as manifestações graves da beta talassemia maior. Neste relato, o probando apresentou anemia discreta, acentuada anisocitose, aumento de reticulócitos, de LDH e de bilirrubina indireta, caracterizando uma anemia hemolítica. O aumento da ferritina pode ser resultado de um processo inflamatório. No entanto, o perfil clínico poderá ser melhor avaliado após os seis meses de vida, uma vez que nesse período ocorre a estabilização nas concentrações das Hbs. É importante salientar que outros fatores genéticos, como a presença de alfa talassemia e mutações que influenciam em maior expressão de Hb F, podem estar associados, contribuindo assim para uma forma mais leve da doença. **Conclusão:** Considerando a diversidade de manifestações fenotípicas, a heterogeneidade genotípica e a gravidade dos sintomas clínicos, a detecção e o tratamento adequados dos pacientes com talassemia intermédia permanecem um desafio significativo. Análises moleculares são imprescindíveis para um diagnóstico confirmatório da doença, permitindo assim a implementação de estratégias que visam otimizar a qualidade de vida dos pacientes e minimizar possíveis complicações.

https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.1061

ANÁLISE DA DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA POR SEQUENCIAMENTO GÊNICO EM LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA PEDIÁTRICA TRATADA CONFORME PROTOCOLO AIEOP-BFM ALL 2009 COM CRITÉRIOS DE RISCO MODIFICADOS

AC Azevedo, C Omae, J Yajima, L Prandi, MC Della-Piazza, NA Migita, C Lopes, PY Jotta, JA Yunes, SR Brandalise

Centro Infantil Boldrini, Campinas, SP, Brasil

Objetivo: Avaliar impacto da análise prospectiva da Doença Residual Mínima (DRM) por sequenciamento gênico (*Next Generation Sequencing*, NGS), no Dia 33 (D33) e Semana 12 (S12) do tratamento, na Sobrevida Livre de Eventos (SLE) da Leucemia Linfoide Aguda (LLA) pediátrica. **Material e métodos:** De outubro de 2021 a abril de 2023, 146 pacientes consecutivos com LLA de novo, negativa para t(9;22)BCR-ABL1, e idade de 1 a 18 anos, foram tratados de acordo com o protocolo AIEOP BFM ALL 2009 com critérios de risco modificados descritos a seguir. Definição do grupo de Alto Risco (AR): ausência de remissão completa no dia 33 ou KMT2A-AFF1+ ou TCF3-HLF+ ou hipodiploidia ou DRM por Citometria de Fluxo em medula óssea do dia 15 ≥ 10% e não ETV6-RUNX1 ou IKZF1plus e DRM (NGS) em D33 positivo (ou inconclusivo) desde que não seja ETV6-RUNX1+, TCF3-PBX1+ ou KMT2A rearranjado ou DRM em D33 $\geq 5 \times 10^{-4}$ e S12 positivo, porém $< 5 \times 10^{-4}$ ou DRM em S12 $\geq 5 \times 10^{-4}$. Grupo de Baixo Risco (BR) definido como: sem critérios de alto risco e DRM em D33 negativo para todos os marcadores investigados (ao menos um marcador com sensibilidade $\leq 10^{-4}$) ou DRM (NGS) em D33 inconclusivo desde que DRM negativa em S12 e D15 (por citometria de fluxo) < 0,1%. Risco Médio (MR): ausência de critérios de AR e sem critérios de BR. Para análise da DRM foram utilizados primers Biomed2 para amplificação dos rearranjos IGH, IGK, IGL, TCRG e TCRD, acrescidos de adaptadores para sequenciamento na plataforma Illumina. Foram utilizados 600 ng de DNA genômico, acrescido de diferentes quantidades de DNA de plasmídeos contendo rearranjos Ig/TCR, para normalização dos resultados. Foram lidos no mínimo 500.000 'reads' por rearranjo, sendo dois os rearranjos analisados por paciente, se disponíveis. Os dados foram analisados na plataforma VidJil. **Resultados:** Remissão citológica foi atingida em 96% (142/146) dos pacientes. Morte durante o período de indução ocorreu em 2 pacientes (1,3%). Análise da DRM por NGS no D33 foi realizada em 137 pacientes (93%), sendo negativo em 80 pacientes (54%) e positivo em 57 (39%) pacientes. A Sobrevida Global e SLE em 1,3 anos dos 146 pacientes foi de 94,2± 2,5% e 92,2 ± 2,0%, respectivamente. Pacientes com DRM $\geq 5 \times 10^{-4}$ no D33 apresentaram SLE significativamente inferior a pacientes com DRM negativa ou abaixo dessa linha de corte (84,8 ± 5,9% *vs*. 98,2 ± 1.8%, p < 0,001). Na S12 a diferença entre os grupos foi ainda mais acentuada (SLE: 49,2 ± 1,7% *vs*. 97,7± 1,7%, p < 0,001). **Discussão:** A avaliação da DRM por NGS permite rastrear vários subclones Ig/TCR no mesmo ensaio, prescinde do desenho e seleção de primers paciente-específicos. O custo dos reagentes e plásticos para o NGS é comparável ao qPCR, porém o NGS é mais rápido e demanda menos mão de