

ocorrência de mutações em genes da via RAS-PI3K são possíveis eventos secundários nesta via poligênica da etiopatologia das leucemias de origem intrauterina. Embora mutações somáticas na via RAS-PI3K foram identificadas em LLA com hiperdiploidia, ETV6-RUNX1 e KMT2A-r, poucos estudos exploram alterações no contexto de avaliação de riscos e causalidade.

Objetivos: Avaliar a prevalência de mutações em genes das vias de sinalização RAS e PI3K nas leucemias agudas da primeira infância (LAPI); comparar as alterações da via do RAS e PI3K nas LAPI divididas em dois grupos (i) KMT2A-r e (ii) hiperdiploidia e ETV6-RUNX1. **Materiais e métodos:** Pacientes com LLAPB com idade ≤ 60 meses aos diagnósticos foram incluídas neste estudo. As alterações citogenéticas-moleculares como hiperdiploidia (>50 cromossomos), ETV6-RUNX1 e KMT2A-r foram detectadas através de citogenética/FISH/MLPA, RT-PCR e/ou multiplex RT-PCR. Mutações em PIK3CA (éxons 9/20) e PIK3R1 (8/13) foram detectadas por RT-PCR e por Sequenciamento direto. As análises estatísticas foram realizadas com testes do χ^2 ; razões de chances (OR) foram avaliados pelo teste de regressão logística. **Resultados:** Foram incluídos 864 casos de LLAPB e as faixas etárias estratificadas em grupo (i) lactentes (≤ 11 meses) e grupo (ii) crianças com idades entre 13-65 meses. Os lactentes foram predominantes de imunofenótipo Pro-B (68,1%; $p < 0,001$) e os demais com LLA-CD10+. As alterações de hiperdiploidia e ETV6-RUNX1 no grupo (ii) foram detectadas em 219 casos. KMT2A-r foi identificado em 179 casos e foi mais frequente no subtipo Pro-B CD10-. As mutações no gene N/RAS foram detectadas em 71 casos (8,2%) e foram mais presentes no grupo dos lactentes com KMT2A-r (68,6%), porém sem significância estatística ($p = 0,791$). Quatorze casos (38,9%) com hiperdiploidia e dois casos com ETV6-RUNX1 (5,6%) apresentaram N/KRAS mutado. Foi realizado o rastreamento para mutações pontuais em PIK3CA (H1047R, C420R) e PIK3R1 (D708Y, Y580N) em 31 casos e para a duplicação *in tandem* em PIK3R1 em 81 casos com KMT2A-r. Estas mutações não foram detectadas em nosso estudo, porém identificamos a alteração c.3075 C>T; p T1025T localizada no éxon 21 de PIK3CA. **Discussão:** De acordo com a literatura, mutações em genes ativadores da via RAS-PI3K apresentam uma alta frequência de mutações (47%) em casos de lactentes com KMT2A-r em comparação aos outros grupos citogenéticos-moleculares e são frequentemente associados a eventos subclonais. Neste estudo, nós detectamos maior frequência de N/KRAS mutado em lactentes com KMT2A-r, sugerindo uma cooperatividade biológica entre a via RAS e o KMT2A-r. No entanto, até o momento, alterações na via PI3K demonstraram ser escassos eventos clonais. **Conclusão:** Nossos resultados preliminares consolidam com resultados da literatura que demonstram que mutações adicionais em genes envolvidos na via RAS-PI3K são mais recorrentes em lactentes.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.305>

ESTUDO DA ATIVAÇÃO ONCOGÊNICA DE FLT3 EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

HFA Bouzada^a, AK Damasceno^a, CAP Poubel^a, TF Aguiar^b, M Schramm^c, FV Mello^d,

MM Lins^e, M Ikoma^f, BA Lopes^a, M Emerenciano^a

^a Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^b Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (Hemorio), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^c Prontobaby, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^d Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^e Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), Recife, PE, Brasil

^f Hospital Amaral Carvalho, Jaú, SP, Brasil

Introdução: A leucemia mieloide aguda (LMA) possui grande heterogeneidade genética e difícil tratamento, sendo um desafio em oncologia. Frequentemente são observadas mutações no gene FLT3 (fms-like tyrosine kinase 3), que codifica um receptor tirosina quinase muito importante nos processos iniciais da hematopoiese e cuja ativação regula vários processos celulares, como transcrição, proliferação e apoptose. Dois tipos de mutação são comuns nesse gene: a duplicação interna *in tandem* no domínio justamembrana (FLT3-ITD) e as mutações pontuais nos resíduos D835/I836 do domínio tirosina quinase (FLT3-TKD). Como consequência da ativação constitutiva do receptor FLT3, há maior estímulo à proliferação de clones leucêmicos. Além disso, estudos demonstram que a superexpressão de FLT3 está associada a um pior prognóstico em pacientes com LMA. Há evidências de que este desfecho possa ocorrer independentemente da presença de mutações ativadoras, entretanto, ainda há pouca elucidação sobre o assunto. Com isso, buscamos determinar o nível de expressão gênica associado ao estado de ativação oncogênica de FLT3 em pacientes com LMA. **Metodologia:** Para tal, amostras de pacientes diagnosticados com LMA estão sendo recebidas de diferentes centros: Prontobaby, IMIP, IPPMG-UFRJ, Hemorio e Hospital Amaral Carvalho. Além disso, as amostras estão sendo caracterizadas quanto à ocorrência das principais alterações de risco prognóstico definidas pela European LeukemiaNet (ELN): mutações em FLT3 (ITD e TKD), NPM1 e WT1. A busca por mutações em FLT3-ITD e NPM1 está sendo realizada por análise de fragmentos, enquanto a busca por mutações FLT3-TKD e no gene WT1 está sendo realizada por sequenciamento de Sanger. Por fim, para verificar a associação entre o nível de expressão de FLT3 com marcadores de ativação desta via, dados de expressão gênica (RNA-seq) e proteica (RPPA) foram obtidos do banco de dados CCLE. Posteriormente foi realizada uma análise de expressão diferencial entre dois grupos de linhagens celulares de LMA: com mutação em FLT3 vs. com baixa expressão de FLT3. **Resultados:** Até o momento, incluímos 63 amostras, sendo que a maior parte dos pacientes é do sexo masculino (51%) e com a mediana de idade de 12 anos (variação: 0-79 anos); o subtipo FAB M3 representa 13% dos casos. Do ponto de vista molecular, 14% dos pacientes possuem alteração no gene NPM1, 13% em FLT3-ITD, 1,26% em FLT3-TKD e nenhum paciente apresentou alteração no gene WT1. Seguindo a estratificação de risco prognóstico definida pela ELN, 8

pacientes foram classificados com prognóstico favorável, 6 com intermediário e 2 com prognóstico desfavorável. Nas abordagens *in silico*, destacam-se três genes diferencialmente expressos entre os dois grupos de linhagem celular: BCL2, STAT5 e NDRG1. Eles apresentaram expressão proporcional à observada em FLT3 ($R = 0,62$ $p = 0,00016$; $R = 0,62$ $p = 0,00016$; $R = 0,7$ $p = 7,7e-06$, respectivamente). Além disso, seus níveis transcricionais foram diretamente proporcionais aos seus níveis proteicos ($R = 0,19$ $p = 6,2e-12$; $R = 0,9$ $p = 1,5e-12$; $R = 0,61$ $p = 0,00018$, respectivamente). **Conclusões e perspectivas:** A partir disso, esperamos utilizar estes marcadores para entender melhor os mecanismos de ativação oncogênica de FLT3 na LMA, o que é essencial para melhorar a estratificação de risco prognóstico desses pacientes, além de auxiliar no desenvolvimento de novas terapias para a doença.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.306>

A RHO GTPASE RHOA (E NÃO RHOC) CONTROLA O CICLO CELULAR E SEU SILENCIAMENTO POTENCIALIZA A APOPTOSE INDUZIDA POR QUIMIOTERÁPICOS EM CÉLULAS LEUCÊMICAS IN VITRO

JM Carrilho, SSC Sampaio, M Lazarini

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP, Brasil

Objetivo: RhoA e RhoC são Rho GTPases reguladoras da proliferação e morte celular. Estas pequenas proteínas parecem atuar na promoção do desenvolvimento tumoral, porém suas funções em células leucêmicas foram pouco exploradas. Neste estudo, avaliamos os efeitos do silenciamento de RhoA e RhoC nas funções de células mieloides e resposta terapêutica *in vitro*. **Material e Métodos:** A linhagem celular leucêmica mieloide U937 foi silenciada para RhoA (shRhoA) ou RhoC (shRhoC) com lentivírus. As células silenciadas foram tratadas ou não com quimioterápicos. A morfologia celular foi avaliada por microscopia de contraste de fase e microscopia confocal (marcação com faloidina e tubulina). A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio MTT. O ciclo celular, a apoptose (marcação com anexina-V e PI) e a ativação de vias de reparo ao DNA (marcação com p- γ H2AX) foram analisados por citometria de fluxo. A efetividade do silenciamento gênico e a expressão de proteínas de reparo do DNA foram avaliadas por Western Blotting. **Resultados:** O silenciamento gênico de RhoA ou RhoC induziu alterações morfológicas nas células U937. Nas células shRhoA, observamos contorno citoplasmático irregular e presença de longas projeções de actina, já nas células shRhoC observamos uma morfologia mais arredondada e presença de projeções de actina mais curtas e uniformes, enquanto as células controle (shCTRL) exibiram morfologia arredondada e uniforme, e ausência de projeções citoplasmáticas. O silenciamento de RhoA aumentou a apoptose em 17% e induziu acúmulo de células na fase G2/M do ciclo celular (14%), além de aumentar a expressão de p- γ H2AX. Estes resultados estão de acordo com a diminuição da expressão de p-CHK2 observada nas células shRhoA. Interessantemente, 13% das células shRhoA

apresentaram-se com dois ou mais núcleos, enquanto apenas 3% de células shRhoC e 1% das células shCTRL apresentaram mais de um núcleo. Ao contrário das células shRhoA, as células shRhoC não apresentaram alteração na apoptose, na expressão de p- γ H2AX ou no ciclo celular. As concentrações de 100nM de citarabina e 5nM de daunorrubicina (abaixo do IC50) foram escolhidas a partir dos testes de viabilidade com as células U937 parentais. A apoptose e a ativação das vias de reparo do DNA foram potencializadas nas células shRhoA, com aumento de 26% no tratamento com citarabina e 7% com daunorrubicina. Estes mesmos efeitos não foram observados nas células shRhoC. **Discussão:** RhoA e RhoC são genes homólogos envolvidos na progressão do câncer. Porém, parecem ter diferentes funções em células leucêmicas, pois as diferenças fenotípicas entre shRhoA e shRhoC sugerem que os agentes responsáveis pela regulação do citoesqueleto são diferentes. Adicionalmente, RhoA parece atuar na resistência à quimioterapia, pois seu silenciamento gênico foi capaz de intensificar a ação da citarabina, um fármaco altamente utilizado na prática clínica no tratamento de LMA. **Conclusão:** RhoA parece influenciar diretamente a progressão do ciclo celular e reparo a danos ao DNA e sua inibição potencializa os efeitos dos tratamentos com citarabina e daunorrubicina na indução da apoptose *in vitro*. RhoC deve participar da manutenção da morfologia de células leucêmicas e seu silenciamento parece não alterar a resposta a quimioterápicos *in vitro*. **Financiamento:** CAPES e FAPESP.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.307>

LEUCEMIA ERITROIDE PURA: UM RELATO DE CASO.

FA Silva^a, ACON Luz^a, LFB Catto^a, LS Oliveira^b, CGQ Ferreira^b, WGG Fischer^a, MB Catto^a, PR Fonseca^a, LB Lanza^a, SLAP Filho^a

^a Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

^b Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

Introdução: A leucemia eritroide aguda é uma rara apresentação da leucemia mieloide aguda (LMA) caracterizada por pronunciada proliferação eritroide. São reconhecidos 2 subtipos de acordo com a presença ou ausência de um componente mieloide significativo: a eritroleucemia e a leucemia eritroide pura (LEP). **Objetivo:** Relatar o caso de um idoso com diagnóstico recente de LEP. **Relato de caso:** Homem de 66 anos procurou a Unidade de Urgência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP) devido queixa de fraqueza, astenia, tosse seca e dispneia aos pequenos esforços há 2 semanas. Negava febre ou outros sintomas respiratórios. Quatro dias antes, procurou uma UBS onde foi identificada pancitopenia, que se confirmou na admissão (hemoglobina: 5,1 mg/dL, glóbulos brancos: 1.200 células/mm³, plaquetas: 25.000 células/mm³) e a análise do sangue periférico revelou a presença de 12% de blastos. Diante da suspeita de leucemia aguda, foi realizado o aspirado de medula óssea, que se