

blinatumomab. A paciente foi então tratada com mini-HyperCVD + Ino, mas após dois ciclos permaneceu com 28% de blastos que perderam CD22, mas voltaram a expressar o CD19. Voltou a receber blinatumomab e, apesar de intensamente aplásica, apresentou síndrome de liberação de citocinas com anasarca e febre. No D11 de blinatumomab mielograma e liquor estavam em remissão. Seguiu com blinatumomab até D15, dia em que iniciou o condicionamento mieloablativo com TBI 1.200 cGy e fludarabina. Recebeu medula óssea de seu irmão haploidentico e profilaxia para doença do enxerto contra o hospedeiro com ciclosporina e micofenolato mofetila. Recebeu como profilaxia ursacol, acetilcisteína e heparina e não teve síndrome de oclusão sinusoidal. Teve enxertia neutrofílica no D+28. Devido a agressividade da doença vem recebendo manutenção com blinatumomab e infusão profilática de linfócitos do doador (DLI) sem DECH, nem atividade da doença, em excelente condição de saúde já há 5 meses após o TCTH. **Conclusão:** Blina e Ino podem ser utilizados de maneira sequencial proporcionando resposta de doença refratária e TCTH em remissão.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.10.251>

A INATIVAÇÃO FARMACOLÓGICA DE PROTEÍNAS RAC INIBE A VIA PI3K/ATK/MTOR E POTENCIALIZA OS EFEITOS DA DAUNORRUBICINA EM CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

DFV Ramos^a, RI Mancuso^b, B Contieri^a, STO Saad^b, M Lazarini^a

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

^b Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

Introdução: As proteínas Rac1, Rac2 e Rac3 pertencem à família de proteínas Rho GTPases, que é tradicionalmente conhecida pelas suas funções na regulação do citoesqueleto. Estas proteínas estão envolvidas na regulação de diferentes funções de células hematopoiéticas, como entrada e saída de células-tronco hematopoiéticas na medula óssea e maturação das células sanguíneas. Apesar destas propriedades celulares estarem desreguladas em leucemia mieloide aguda, as funções das proteínas Rac1, Rac2 e Rac3 ainda não foram exploradas nesta doença. **Objetivos:** Neste estudo avaliamos os efeitos do tratamento com EHT-1864, um inibidor farmacológico de Rac1, Rac2 e Rac3, na via PI3K/AKT/mTOR em linhagem leucêmica OCI-AML3. Os efeitos da combinação de EHT-1864 e daunorrubicina, um dos fármacos já utilizados no tratamento da LMA, também foram avaliados na sobrevivência destas mesmas células. **Métodos:** A expressão de proteínas da via PI3K/AKT/mTOR foi avaliada por western blot em células OCI-AML3 tratadas com EHT-1864 (0,5-30 μM) por 48 e 72 horas. A expressão de GAPDH foi utilizada como normalizadora. Os efeitos do tratamento combinado de EHT-1864 (5 μM e 10 μM) com daunorrubicina (1-200M) por 48 e 72 horas foram avaliados na viabilidade e apoptose de células OCI-AML3. Para isso, as células foram tratadas com os fármacos

sozinhos ou em combinação e avaliadas por ensaio de MTT e marcação de anexina V e iodeto propídeo seguida de análise por citometria de fluxo. **Resultados:** O tratamento com EHT-1864 inibiu a via PI3K/AKT/mTOR, evidenciado pela redução da fosforilação de AKT (Ser 473), mTOR (Ser 2448), EBP1 (Thr 70), PDK1, p70s6k (Ser 424 Thr 421). Também observamos aumento da ativação de PTEN (redução de p-PTEN Ser 380). Interessantemente, o tratamento combinado de EHT-1864 e daunorrubicina foi significativamente mais efetivo que os tratamentos dos fármacos sozinhos na redução da apoptose e redução da viabilidade celular. **Discussão:** Resultados anteriores de nosso grupo mostraram que o tratamento com EHT-1864 induz os processos de apoptose e autofagia, bem como parada no ciclo celular de células leucêmicas. Os achados deste estudo indicam que estes efeitos podem ser pelo menos parcialmente explicados pela inibição da via PI3K/AKT/mTOR. A potencialização dos efeitos do tratamento com daunorrubicina em células leucêmicas sugere que o tratamento combinado é uma opção terapêutica interessante para ser melhor explorada em estudos futuros. **Conclusão:** A inibição farmacológica de proteínas Rac através de EHT-1864 inibiu a via PI3K/AKT/mTOR em células leucêmicas. O tratamento in vitro combinado de EHT-1864 e baixas doses de daunorrubicina potencializou a apoptose de células OCI-AML3. Financiamento: FAPESP.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.10.252>

A INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DAS PIP4K2 APRESENTA EFEITOS ANTINEOPLÁSICOS EM LEUCEMIAS AGUDAS

K Lima^a, DA Pereira-Martins^{a,b}, LBL Miranda^c, JL Coelho-Silva^b, RC Cavaglieri^a, JA Machado-Neto^c, EM Rego^a

^a Laboratório de Investigação Médica em Patogênese e Terapia Dirigida em Onco-Imuno-Hematologia (LIM-31), Departamento de Hematologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (HCFMUSP), São Paulo, SP, Brasil

^b Departamento de Imagens Médicas, Hematologia e Oncologia Clínica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

^c Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil

Objetivo: As PIP4K2s (PIP4K2A, PIP4K2B e PIP4K2C) compõem uma família de lipídio quinases responsáveis pela produção de fosfoinositídeos (PtdIns4,5P₂) com funções estruturais e de transdução de sinal. A expressão combinada de PIP4K2A e PIP4K2C foi identificada como um fator prognóstico independente em pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA). Além disso, polimorfismos relacionados com ancestralidade no gene PIP4K2A estão associados com o risco para desenvolvimento de leucemia linfoblástica aguda (LLA). Recentemente um inibidor farmacológico seletivo das PIP4K2s foi desenvolvido (THZ-P1-2) e será utilizado no presente estudo para

avaliar o potencial antineoplásico do THZ-P1-2 em modelos celulares de LMA e LLA. **Métodos:** Um painel contendo 12 linhagens celulares de LMA e 8 de LLA foi utilizado. A viabilidade celular foi avaliada por ensaio de MTT, apoptose por anexina V/PI e citometria de fluxo (CF), a formação de organelas vesiculares ácidas (OVAs) por marcação com laranja de acridina e CF, o ciclo celular por marcação de iodeto de propídeo por CF e a sinalização celular por PCR quantitativo (PCRq) e Western blot. Para as comparações, foi utilizado o teste ANOVA e o pós-teste de Bonferroni. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. **Resultados:** Em modelos de LMA e LLA, o tratamento com THZ-P1-2 foi capaz de reduzir a viabilidade celular de forma dependente de concentração, sendo as células Jurkat as mais sensíveis (IC_{50} 2,9 μ M) e as células SET2 as mais resistentes (IC_{50} >100 μ M). Duas linhagens de LMA (OCI-AML3 e MV4-11) e duas de LLA (Jurkat e NALM6) foram selecionadas para caracterização dos efeitos celulares e moleculares mais detalhados. O tratamento com THZ-P1-2 induziu apoptose e a formação de OVAs de forma dependente de concentração (todos $p < 0,05$). A análise do ciclo celular indicou o aumento de células em subG1 e redução de células em G2/M (todos $p < 0,05$). A análise molecular indicou que THZ-P1-2 apresenta um papel paradoxal na autofagia, em um primeiro momento o composto induziu as etapas iniciadoras da autofagia (aumento de LC3II) e depois inibiu as etapas finais do fluxo autofágico (redução do consumo de p62/SQSTM1), o que pode aprisionar a célula em um estado de inércia. Além disso, marcadores de dano em DNA (γ H2AX) e apoptose (clivagem de PARP1) foram induzidos pelo THZ-P1-2. A análise do perfil de expressão gênica indicou que processos como a morte celular por via mitocondrial, autofagia, sinalização de via intrínseca de apoptose induzida por dano em DNA e a resposta celular à privação de nutrientes estão envolvidas no mecanismo de ação do composto. **Discussão e conclusão:** A contribuição dos genes que compõe a família PIP4K2 para as leucemias agudas tem sido revelada nos últimos anos, sendo desde marcadores de prognóstico até a associação com a suscetibilidade genética. A identificação de inibidores farmacológicos das PIP4K2 pode representar novas oportunidades para intervenções terapêuticas nessas doenças. Nesse sentido, o THZ-P1-2 parece apresentar uma propriedade farmacológica singular, atuando paradoxalmente como indutor e inibidor da autofagia, o que está de acordo com estudos genéticos relacionados às funções das PIP4K2. Diante das evidências crescentes da importância da autofagia na biologia das neoplasias hematológicas, o THZ-P1-2 pode emergir como uma classe de fármacos inovadora nesse cenário. **Financiamento:** FAPESP, CAPES e CNPq.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.10.253>

ABSENT CD33 IN AML PATIENT MIMICS MRD POSITIVE: A SINGLE CASE REPORT

LO Marani^a, AFO Costa^a, FB Silva^a,
MIA Madeira^a, PS Scheucher^a, JL Schiavinato^a,
ASG Lima^a, KBB Pagnano^b, BK Duarte^b,
S Freeman^c, F Traina^a, EM Rego^d,
LL Figueiredo-Pontes^a



^a Hematology Division, Department of Medical Images, Hematology, and Clinical Oncology, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Centro de Hematologia e Hemoterapia (Hemocentro), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

^c Institute of Immunology and Immunotherapy, University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom

^d Internal Medicine, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo, SP, Brazil

Background: Diagnosis and treatment of acute myeloid leukemia (AML) remains difficult to this day, cure rates remain low and measurable residual disease (MRD) assessment is still challenging. Early detection of residual leukemic cells is essential to predict therapeutic success and Multiparametric Flow Cytometry (MFC) has been an effective tool for it. Here, we focus on the importance in caution when interpreting MDR in AML. **Methods:** Bone marrow (BM) sample was assessed for FLT3 and NPM1 mutation, RUNX1/RUNX1T1 and CBFB-MYH11 rearrangements, karyotype (KT) and immunophenotyping. Using an 8-colour antibody panel (CD45, CD34, CD117, CD 33, HLA-DR, CD38, CD123, CD13, CD19, CD7, CD11b, CD4, CD56, CD64, CD11c, CD15, CD133, CD41a and NG2), we applied a gating strategy with fixed gates comparing normal to AML BM, settled to catch LAIPs (Leukemia Associated-Immunophenotypes), abnormal cell maturation pattern and Leukemic Stem Cell, that were detected on diagnosis and evaluated for MRD. Assays were performed at the Hematology Laboratory of the Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, in accordance to Local Ethical Boards. **Results:** A 21-year-old male patient with AML without maturation, diagnosed after 60 days of symptoms, presented anemia (7.9 g/dL), thrombocytopenia (26 000/ μ L) and white blood cell count of 5710/ μ L with 73% blasts in peripheral blood and 84% in BM. MFC revealed CD45dim and low side scatter; positive staining for CD117, CD34, HLA-DR, CD38, CD123, CD11c, CD64, CD15 and CD133; negative staining for CD33, CD14, CD7, CD11b, CD4, CD56, CD19, CD41a and NG2. We found no metaphases (KT), no molecular abnormality and he failed risk stratification. Treatment consisted of 2 induction cycles (cycle 1: 3 days of Daunorubicin 60 mg/m² and 7 days of cytarabine 200 mg/m²; cycle 2: 6 days of cytarabine 1 g/m² twice a day) and 1 or 2 consolidation cycles (6 days of cytarabine 1 g/m² twice a day). BM was obtained at diagnosis, 30 and 33 days after 1st and 2nd induction, and 3, 9, 12 and 15 months after consolidation of chemotherapy. The positivity of a specific phenotype (CD117+/CD34+/CD33wk/CD13+ $\geq$ 0.1%) was preserved at diagnosis and follow-ups: 0,506%, 0,681%, 0,402%, 0,101%, 0,158% and 0,122%. Complete remission was achieved by day 30 after 1st induction and no change in the outcome was reported. Absent CD33 was observed in diagnosis and follow-ups, during and after treatment. **Discussion:** Post-analytical phase of MFC is the most vulnerable to wrong interpretations. CD33 is a common myeloid antigen expressed on malignant blasts in AML and had been reported