

SÍNDROME DE SWEET EM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA COM MORFOLOGIA “CUP-LIKE” E MUTAÇÃO FLT3



G Cuquetto, B Chedier, MLM Nucci, RD Portugal

Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Introdução: A síndrome de Sweet é uma desordem incomum caracterizada por lesões cutâneas eritematosas, que pode subitamente acometer braços, pernas, tronco, pescoço e face. As lesões podem ser dolorosas e ter a forma de pápulas, nódulos ou formar placas irregulares (coalescência). Além das lesões cutâneas completam a síndrome: febre, leucocitose com predomínio de neutrófilos e biópsia de da lesão com infiltrado dérmico de neutrófilos maduros. Estima-se que em cerca de 20-30% dos casos uma neoplasia esteja subjacente à síndrome, sendo a leucemia mieloide aguda (LMA) a mais prevalente.¹ **Objetivo:** apresentar um caso de LMA com mutação FLT3 manifestando-se inicialmente como síndrome de Sweet. **Relato do caso:** Uma jovem de 32 anos, sem comorbidades prévias, apresentava quadro clínico marcado por sintomas constitucionais como anorexia, prostração e leve perda ponderal, evoluindo após 15 dias com febre e lesões cutâneas eritemato-violáceas, com exulceração central e bordas bem definidas, predominantes em membros. A avaliação laboratorial, na internação no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – UFRJ, mostrava anemia normocítica (Hb = 6,5 g/dL; Hto = 19,8%; VCM = 92 fL; CHCM = 32 g/dL), leucocitose (Leucócitos = 21.540/mm³ com 7.539 neutrófilos e 18% de blastos) e trombocitopenia (Plaquetas = 10.000/mm³). No sangue periférico notava-se: anisocitose, presença de células blásticas de características mieloides, várias figuras blásticas em morfologia “cup-like” e algumas com núcleos em forma de halteres (ou borboleta - “butterfly-shaped”). Coloração Suddan Black foi positiva nos blastos. Imunofenotipagem do sangue periférico: blastos com CD34 negativo, CD33+ e HLA-DR+ de fraca expressão. Expressão anômala de CD4 e de CD7. A expressão forte e homogênea de CD33, junto à perda de CD34 são características que se pode observar na LMA tipo promielocítica. Pela suspeita de LMA promielocítica variante, foram iniciadas medidas gerais de suporte e terapia específica com ATRA, dexametasona e daunorrubicina. Houve resposta dramática das lesões cutâneas e resolução da febre. Em seguida, com informações moleculares evidenciando ausência do PML-RARA e presença da mutação FLT3-ITD, foi complementada terapia de indução com citarabina em infusão contínua com o objetivo de entregar protocolo “7+3” pleno. Infelizmente o resultado foi desfavorável com deterioração clínica por de neutropenia e sepse. **Discussão:** Relatamos um caso de leucemia mieloide aguda com mutação FLT3 e morfologia “cup-like” que inicialmente apresenta-se como síndrome de Sweet. Estima-se que síndrome cutânea possa ocorrer em cerca de 1% das LMAs. A mutação FLT3 pode estar presente em quase 40% dos casos de LMA com síndrome de Sweet² e se considerarmos que a morfologia “cup-like” também é frequente com esta mutação, a combinação seria altamente sugestiva da presença da mutação FLT3. **Conclusão:** A síndrome de Sweet deve ser reconhecida como um potencial marcador de neoplasia hematológica, em especial a LMA. A

associação da síndrome dermatológica com a LMA morfologia “cup-like” é altamente sugestiva da mutação FLT3.

REFERÊNCIAS

1. Buck T, González LM, Lambert WC, Schwartz RA. Sweet's syndrome with hematologic disorders: a review and reappraisal. *Int J Dermatol*. 2008;47:775–82.
2. Kazmi SM, Pemmaraju N, Patel KP, Cohen PR, Daver N, Tran KM, et al. Characteristics of Sweet Syndrome in patients with acute myeloid leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2015;15:358–63. <https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.10.304>

STATHMIN 1 É ALTAMENTE EXPRESSA E CONTRIBUI PARA A CLONOGENICIDADE EM MODELOS CELULARES DE LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA



HP Vicari^a, JL Coelho-Silva^b, DA Pereira-Martins^{b,c}, K Lima^a, JCL Silva^a, LV Costa-Lotufo^a, EM Rego^c, F Traina^b, JA Machado-Neto^a

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

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

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

Objetivos: Stathmin 1 (STMN1) é uma proteína desestabilizadora de microtúbulos altamente expressa em neoplasias hematológicas. A proteína de fusão PML-RAR α regula positivamente a expressão e atividade de STMN1. Utilizando a coorte do IC-APL, nosso grupo de pesquisa evidenciou que STMN1 é altamente expressa em amostras de medula óssea de pacientes com leucemia promielocítica aguda (LPA). No presente estudo, a associação da expressão de STMN1 com dados genômicos de pacientes com LPA, assim como os efeitos da inibição de STMN1 ou de um agente farmacológico estabilizador de microtúbulos (paclitaxel), foram investigados em células de LPA. **Materiais e métodos:** Os dados de expressão de RNAm de STMN1 em doadores saudáveis e pacientes com LPA foram obtidos do AmaZonia! e do estudo GSE172057. Os dados de expressão de STMN1 nas diferentes populações de células hematopoiéticas foram obtidos do estudo GSE24759. As análises de genômica funcional foram realizadas por análise de enriquecimento de conjuntos gênicos (GSEA) e Gene Ontology. Para os estudos funcionais, linhagens celulares de LPA sensíveis (NB4) e resistentes ao ATRA (NB4-R2) foram expostas ao ATRA e/ou paclitaxel. A diferenciação granulocítica foi avaliada por marcação com CD11b e morfologia. O ciclo celular foi sincronizado por bloqueio duplo de timidina. Para o silenciamento de STMN1, as

células foram transduzidas com shRNA mediado por lenti-vírus. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT, clonogenicidade pelo ensaio de formação de colônias autônomas e apoptose por marcação com anexina V/PI e citometria de fluxo. Expressões de genes e proteínas foram avaliadas por qPCR e Western blot. **Resultados:** A expressão de STMN1 está aumentada em amostras de pacientes com LPA ($p < 0,05$). A expressão diferencial de STMN1 está associada a processos de ligação a macromoléculas, sinalização mediada por receptores celulares e transdução de sinal. A GSEA identificou 23 assinaturas associadas à expressão diferencial de STMN1, entre elas, alvos de E2F, alvos de MYC, ponto de verificação G2/M, reparo de DNA, glicólise e sinalização PI3K/AKT/mTOR. STMN1 é altamente expressa em progenitores hematopoiéticos iniciais e reduz durante a diferenciação celular, incluindo subpopulações granulomonocíticas. A fosforilação de STMN1 é predominante no pool de células enriquecidas com mitose. Em células NB4 e NB4-R2, o silenciamento de STMN1 diminui o crescimento clonal autônomo ($p < 0,05$), mas não afeta a apoptose e a diferenciação induzidas por ATRA. As células NB4 e NB4-R2 apresentam alta sensibilidade ao paclitaxel (IC_{50} de 3,6 nM e 1,8 nM, respectivamente). O crescimento clonal autônomo é significativamente reduzido pelo paclitaxel ($p < 0,05$), o qual aumenta os níveis de marcadores de estabilidade dos microtúbulos (acetil- α -tubulina) e de dano em DNA (γ -H2AX e CDKN1A). **Discussão:** A alta expressão de STMN1 em pacientes com LPA foi confirmada em uma coorte independente. Os dados da análise genômica indicam que a expressão de STMN1 está associada a assinaturas gênicas relacionadas à proliferação e ao metabolismo em LPA. Nossos resultados destacam a contribuição de STMN1 para clonogenicidade de células leucêmicas. **Conclusão:** Em resumo, nosso estudo adiciona novos insights sobre as funções da STMN1 e dinâmica de microtúbulos em LPA. **Financiamento:** CNPq, CAPES e FAPESP.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.10.305>

THE MCL-1 INHIBITOR AZD5991 DISPLAYS A PROMISING TARGETED THERAPY FOR ACUTE MYELOID LEUKEMIA

MLP Bueno, STO Saad, FM Roversi

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

Aims: MCL-1 protein is an anti-apoptotic member of BCL-2 protein family. In hematological neoplasms, increased MCL-1 gene expression or protein activity is related to disease relapse, poor prognosis and resistance to chemotherapy, especially to Venetoclax, an BCL-2 inhibitor. The present study aimed at evaluating the MCL-1 gene expression in AML patients as well as investigating the effects of MCL-1 protein inhibition in myeloid cells. **Methods:** Analysis of MCL-1 gene expression was performed in a cohort of

286 AML patients (OHSU/Nature 2018 study at cbiportal.org). Leukemia myeloid cell lines (U937, KG1a, OCI-AML3) were treated with increasing concentrations of the MCL-1 inhibitor compound AZD5991 (AstraZeneca) for 48, 72 and 96h for determination of the 50% inhibiting concentration (IC_{50}). Apoptosis (annexin-V stain), reactive oxygen species (ROS) production (DFCHA dye) and autophagy (acridine orange dye) were assessed by flow cytometry, after 48h of treatment. Coculture assays were performed by adding leukemia cells onto a monolayer of HS5 mesenchymal stromal cells, followed by treatment with AZD5991 for 48h. Statistical analyzes were performed using ANOVA, Mann-Whitney or Kruskal Wallis tests. p -value $< .05$ was considered significant. **Results:** Increased MCL-1 gene expression in AML patients with adverse cytogenetic risk was observed when compared to patients with favorable or intermediate cytogenetic risk ($p < .001$). All leukemia cell lines showed dose and time-dependent sensitivity with AZD5991. IC_{50} values of 4.3, 3.4 and 9.2 μ M in U937; 20.0, 15.2 and 14.9 μ M in KG1a; and 550, 380 and 420 nM in OCI-AML3, for 48, 72 and 96h, respectively. Treatment with AZD5991 (0.5-20 μ M) in OCI-AML3, U937 and KG1a cells significantly reduced cell viability (69.2%, 50.3%, 40.6%) and increased apoptosis (68.2%, 90.1%, 92.2%) rate in a time and dose-dependent manner, with greater intensity in OCI-AML3 cells. AZD5991 was able to reduce ROS production at 15.1% and 17.2% in U937, 10.3% and 5.6% in KG1a, 59.4% and 45.8% in OCI-AML3, in monoculture and coculture, respectively ($p < .05$). Similarly, there was a reduction in the formation of acidic vesicles (autophagic process) at 43.0% and 19.0% in U937, 40.5% and 19.0% in KG1a, 62.6% and 18.8% in OCI-AML3, in monoculture and coculture, respectively ($p < .05$). Increased cell percentage in G0/G1 phases of cell cycle was also observed. Western blot analyses showed decreased MCL-1, Bax and Bak and increased Bim. **Discussion and conclusion:** MCL-1 overexpression is related with AML progression, and associated with poor prognosis (Li et al. Onco Targets Ther. 2019;12:3295-3304). Our analysis from OHSU data bank showed that patients with adverse cytogenetic risk presented higher MCL-1 gene expression that could induce resistance to pharmacological therapies. Our *in vitro* studies demonstrated that the MCL1 inhibitor AZD5991 induced apoptosis and reduced viability of leukemia cells, possibly by MCL-1-Bak complex disruption and subsequent Bak-dependent mitochondrial apoptotic pathway activation. The diminished MCL-1 availability in mitochondria, probably caused lower ROS production and impaired autophagy (Mukhopadhyay et al. Apoptosis. 2014;19:555-66). Therefore, these findings provide important tools for further investigations and highlight that MCL-1 inhibitor could be a promising compound for AML treatment due to its potent antitumor activity and may represent a potential therapeutic strategy. **Funding:** FAPESP e CNPq.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.10.306>

