

foi descrita em aproximadamente 1% dos casos com LPA que mostra quase invariavelmente resistência ao ATRA. **Conclusão:** A grande maioria dos casos de LPA contém t(15;17) (q24.1;q21.1), no entanto, variantes envolvendo RARA foram identificadas, incluindo t(11;17) e t(5;17). A distinção entre essas translocações é importante pois impacta na decisão terapêutica e prognóstico desses pacientes.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.238>

#### TARGETING PAN-PIM KINASES IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA: A POTENTIAL THERAPEUTIC STRATEGY

MLP Bueno, STO Saad, FM Roversi

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

**Aims:** PIM is a family of protein kinases activated by JAK/STAT through interleukins stimulus that results in proproliferative and prosurvival actions through p21/p27 deregulation and proapoptotic protein inactivation. PIM kinases represent a potential target in various neoplasm types due to its critical role in tumorigenesis. Thus, the goal of the present research was to investigate the PIM gene and protein expressions in AML patients as well as the effects of PIM protein inhibition in leukemia cells. **Methods:** Analysis of PIM genes expression was performed in a cohort of 163 AML patients (median age 57.5 years [range: 18-88])(TCGA AML study). Acute leukemia cell lines, both myeloid (OCI-AML3, U937) and lymphoid (RS4;11, Jurkat) were treated with increasing concentrations of the PIM inhibitor compound PIM447 (Novartis) for 48h for analysis of the 50% inhibiting concentration (IC50). Apoptosis (annexin-V stain), reactive oxygen species (ROS) production (DFCHA dye), nitric oxide (NO) (DAF dye), and mitochondrial membrane potential (DiIC1 probe) were assessed by flow cytometry, after 48h of treatment. Statistical analyzes were performed using Kruskal Wallis, ANOVA or Mann-Whitney tests. p-value <.05 was considered significant. **Results:** Increased PIM genes expression in patients with erythroid and megakaryoblastic AML (p < 0.001) was observed. Our results demonstrated a dose-dependent sensitivity after treatment with PIM447, with IC50 values of 12.2μM in OCI-AML3; 22.3μM in U937; 16.1μM in MOLM13; 20.9μM in RS4;11 and 15.1μM in Jurkat. Treatment with PIM447 (2-20μM) in OCI-AML3, U937, MOLM13, RS4;11 and Jurkat cells significantly reduced cell viability and increased apoptosis (fold-increase (FI): 1.0-5.0, 1.0-8.1, 1.7-9.7, 1.0-5.1, and 1.5-9.4, respectively) in a concentration-dependent manner. PIM447 was able to reduce ROS (fold-decrease (FD): 1.6; 1.1; 1.3; 1.8; 2.8) and NO (FD: 1.2; 0.8; 2.2; 1.1; 1.4) production and mitochondrial membrane potential (FD: 4.0; 8.0; 5.1; 2.5; 9.8), respectively, for OCI-AML3, U937, MOLM13, RS4;11 and Jurkat (p < .05). **Discussion and conclusion:** The PIM genes expression was associated with a poor prognosis of AML patients. The TCGA data bank analysis showed higher PIM genes expression in patients with rare forms of leukemia. Our in vitro studies demonstrated that the PIM inhibitor diminished

viability and increased cell death of leukemia cells, possibly by action on the intrinsic pathway of apoptosis due to deregulation of ROS and NO production and unbalanced mitochondrial membrane potential. In this scenario, our findings provide important insights for further investigations into a protein that is part of a complex network that regulates tumor survival, representing a potential therapeutic strategy. **Funding:** São Paulo Research Foundation (FAPESP) grants #2017/21801-2, #2019/25247-5, #2021/05320-0.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.239>

#### LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA COM MUTAÇÃO GERMINATIVA RUNX1

MM Almeida, LR Soares, LPDS Rocha,  
PMC Silva, PEM Flores, RS Martins,  
SMCBP Jesus, WA Poles, F Kerbauy, AF Sandes

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

**Objetivo:** Relatar caso de Leucemia Mieloide Aguda (LMA) com mutação germinativa RUNX1 em paciente com plaquetopenia grave e história familiar de plaquetopenia paterna. **Relato de caso:** Paciente feminina, 19 anos, com história inicial de plaquetopenia grave e sangramentos cutâneos desde 2019, sem outras citopenias. Apresentava também história familiar de plaquetopenia paterna moderada. Tratada inicialmente com esplenectomia em janeiro/2020 em outro serviço, após diagnóstico de plaquetopenia imune (PTI), porém sem histórico de refratariedade medicamentosa pré-realização do procedimento. Iniciou acompanhamento e investigação com hematologia pediátrica, tendo realizado mielograma em fevereiro/2021, com descrição de medula hiperclular, hipoplasia megacariocítica, normoplasia eritroblástica e sinais de diseri-tropoiese. Reinterna em outubro/2021 com quadro de sangramentos cutâneos e piora de plaquetometria (7000/uL). Iniciado tratamento de PTI com corticoterapia, imunoglobulina e rituximabe, porém com pouca resposta em plaquetometria, chegando ao máximo de 23000/uL. Recebeu alta hospitalar após controle de sangramento para seguimento ambulatorial. No entanto, perde seguimento e reinterna em março/2022 com úlcera necrótica em coxa direita e febre. Hemograma demonstrava Hb 5,4, 883 eritroblastos, Leucócitos 3470 (1600 Neutrófilos e 7% células anormais), Plaquetas 20000, além de DHL 1711. Esfregaço de sangue periférico com 2% de blastos. Realizado novo estudo medular com imunofenotipagem (IF), demonstrando presença de 5,8% de células de linhagem mieloide imaturas, algumas com bastonetes de Auer, hiperplasia de série eritrocítica e displasia acentuada das três séries. Cariótipo: 46,XX,-7,+22[16]/47,XX,+21[4]. Diante do contexto, fechado diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica (SMD) com excesso de blastos tipo II, sendo encaminhada para avaliação com equipe do transplante de medula óssea (TMO), porém evoluiu no intervalo de um mês com aumento de contagem de blastos em sangue periférico (SP) e progressão para LMA em análise por IF (20% de mieloblastos em SP). Por história familiar e pessoal de plaquetopenia, enviada amostra para pesquisa de mutações

germinativas e detectada variante provavelmente patogênica em heterozigose do gene *RUNX1*. **Discussão:** Plaquetopenias familiares com mutação germinativa *RUNX1* são síndromes autossômicas dominantes com apresentação clínica diversa mesmo dentro da mesma família, caracterizadas por níveis variáveis de plaquetopenia e de tendência a sangramentos, além de risco aumentado de evolução para SMD e LMA em idade jovem (idade média 33 anos). A evolução para SMD/LMA ocorre em 35 a 40% dos casos e, geralmente, está associada ao ganho de alterações clonais adicionais à alteração germinativa original. O prognóstico desses pacientes não é bem definido na literatura tendo em vista a raridade da doença e poucos casos relatados. **Conclusão:** Este trabalho teve como objetivo descrever uma doença rara com poucos relatos na literatura. SMD/LMA com mutações germinativas são tipos incomuns de neoplasia mieloides associadas a distúrbios plaquetários familiares. Dentre essas mutações, a mais comum é do *RUNX1*. A paciente apresentou quadro característico, com plaquetopenia e evolução para LMA após ganho de nova alteração clonal (monossomia do cromossomo 7). Atualmente com doença residual mínima positiva (25,9% de células mieloides imaturas) após segunda indução sendo iniciada terceira indução para posterior realização de TMO alogênico haploidêntico.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.240>

#### AD80 INHIBITS FLT3-MEDIATED SIGNALING AND HAS ANTINEOPLASTIC EFFECTS ON ACUTE MYELOID LEUKEMIA CELLS

LBL Miranda <sup>a</sup>, K Lima <sup>a</sup>, NP Fonseca <sup>b</sup>, F Traina <sup>b</sup>, JA Machado-Neto <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Imagem Médica, Hematologia e Oncologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

**Objectives:** Acute myeloid leukemia (AML) is one of the most common types of hematological malignancy in adults. Activating mutations in different tyrosine kinases have been identified as important factors in the development and progression of hematological neoplasms. For AML, FLT3-ITD has been described as a key mutation, activating signaling pathways such as PI3K, RAS, and STAT5. AD80 is a multikinase inhibitor able to inhibit the activity of kinases RET, RAF, S6K, and ERK. It is a new compound and, therefore, few studies have been carried out to date verifying its effects on tumor cells. In the present study, the cellular and molecular effects of AD80 in AML cell lines were analyzed. **Materials and methods:** For the study, 6 human (FLT3-ITD: MV4-11 and MOLM13, BCR: ABL1: K562 and KU812, JAK2V617F: SET2 and HEL) and 5 murine (Ba/F3 with activating mutations: BCR::ABL1, BCR: ABL1T315I, JAK2V617F, MPLW515L, CSF3RT618I) cell lines representing different hematological neoplasms were utilized. Cell viability was assessed using MTT assay. Apoptosis,

autophagy, and mitochondrial membrane potential were determined by flow cytometry. Colony formation assays were performed to analyze clonogenic ability. Protein expression/activation was assessed by western blot. **Results:** In all cellular models, AD80 reduced cell viability in a time- and dose-dependent manner (all  $p < 0.05$ ). MOLM13 and MV4-11 cells were the most sensitive, with IC50 ranging from 0.4 to 1.1 nM. In FLT3-ITD cell lines, AD80 induced apoptosis and autophagy, disrupted mitochondrial membrane potential, as well as decreased clonogenic ability in a dose-dependent manner (all  $p < 0.05$ ). AD80 markedly decreased the activation of AKT, STAT5, S6RP, and induced PARP1 cleavage and  $\gamma$ H2AX. **Discussion:** AD80 was more potent in reducing the viability of FLT3-ITD AML cell lines. Indeed, it has been shown that AD80 strongly inhibits wild-type and mutated FLT3 in an *in vitro* assay (>90% of inhibition; Dar et al. Nature, 486:80–84, 2012). Similarly, AD80 also inhibits, in less extension, wild-type and mutated ABL1 and JAK2, which corroborate our cell viability findings. Previous studies from our group showed that AD80 has effects on AML cell lines without the tyrosine kinase-related mutations, with IC50 values ranging from 1.6 to 27.2  $\mu$ M. In contrast, AD80 concentrations at 0.64 nM were able to induce apoptosis and disrupt mitochondrial membrane potential at 72 h, and induced autophagy at 24 h of treatment in FLT3-ITD AML cell lines. In the molecular scenario, this compound decreases the expression/activating of proteins related to cell growth and proliferation and increases molecular markers of autophagy and apoptosis. **Conclusions:** AD80 exhibits antineoplastic effects against FLT3-ITD mutated cell lines at nanomolar concentrations, highlighting a noticeably on-targeted effect, and opening up research possibilities that could potentially evolve to further investigations. **Funding:** FAPESP, CNPq, and CAPES.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.241>

#### INIBIÇÃO DA PROTEÍNA HCK: UMA PROMISSORA ESTRATÉGIA PARA O TRATAMENTO DE LEUCEMIAS AGUDAS

FM Roversi <sup>a</sup>, MLP Bueno <sup>a</sup>, A Bastos <sup>a</sup>, ADS Santos <sup>a</sup>, JAF Silva <sup>b</sup>, STO Saad <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Centro de Hematologia e Medicina Transfusional - Hemocentro, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

<sup>b</sup> Department of Surgery, Emory University, Atlanta, United States

**Objetivos:** A proteína HCK é um importante membro da família Src tirosina quinase e está relacionada com o desenvolvimento e prognóstico das leucemias, apresentando um importante papel como modulador do recrutamento de células imunes no microambiente tumoral. O presente estudo objetiva avaliar a expressão do gene e da proteína HCK em pacientes com leucemia e investigar os efeitos pré-clínicos de um novo composto inibidor de HCK doado pelo Dr. Maurizio Botta (Universidade de Siena). **Métodos:** A análise da expressão gênica do HCK foi realizada em células mononucleares isoladas de 163 pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA) (estudo TCGA). Expressão