

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 haploidentico.

<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 ^a, K Lima ^a, NP Fonseca ^b, F Traina ^b, JA Machado-Neto ^a

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

^b 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 γ 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 μ 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 ^a, MLP Bueno ^a, A Bastos ^a, ADS Santos ^a, JAF Silva ^b, STO Saad ^a

^a Centro de Hematologia e Medicina Transfusional - Hemocentro, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

^b 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

proteica foi analisada em 25 aspirados de medula óssea (MO) de doadores saudáveis e pacientes não tratados com mielodisplasia (SMD), LMA secundária a SMD, LMA de novo e leucemia linfoblástica aguda (LLA) por citometria de fluxo e imunofluorescência. Viabilidade celular e apoptose foram realizados em 9 linhagens leucêmicas: OCI-AML3, MOLM13, U937, KG1a, RS4;11, Jurkat, K562 e Hel. A ação do inibidor de HCK foi testada 12 amostras de células hematopoéticas (CD34+) da MO isoladas de doadores e pacientes para avaliação da formação de colônias, proliferação em cocultura 3D (células mesenquimais) e atividade citotóxica em cocultura 2D (monócitos). Camundongos NOD/SCID foram enxertados com células leucêmicas para formar tumor. Análises estatísticas: Kruskal-Wallis, ANOVA ou Mann-Whitney ($p < 0,05$). **Resultados:** A expressão do gene HCK foi aumentada em células de pacientes com LMA M4 e M5 ($p < 0,0001$). Os níveis de proteína HCK foram maiores em células de pacientes com SMD, LMA e LLA. O inibidor de HCK exibe uma potente inibição do crescimento celular com concentrações entre 0,3 e 9,8 μM em células de leucemia (KG1a: 2,0 μM , HL60: 0,5 μM , U937: 0,3 μM , OCI-AML3: 4,2 μM , MOLM13: 8,5 μM , Jurkat: 3,9 μM ; RS4;11: 2,1 μM ; K562: 9,8 μM ; Hel: 5,0 μM), sendo que o tratamento por 48h foi suficiente para inibição do crescimento e morte celular ($p < 0,0001$). A capacidade dos progenitores hematopoéticos da MO (CD34+) de proliferar e diferenciar-se em colônias foi suprimida pelo inibidor de HCK em SMD, LMA secundária a SMD e LMA de novo ($p < 0,001$), mas não em doadores. O inibidor de HCK aumentou a apoptose de células leucêmicas e células de pacientes (LMA) em um sistema 3D, sem efeito nas células de doadores. Em cocultura, monócitos programados levaram à apoptose de células leucêmicas ($p < 0,001$). Resultados in vivo mostraram redução do crescimento tumoral (U937: 62%; OCI-AML3: 66%) e volume (U937: 68%; OCI-AML3: 71%) em camundongos tratados em comparação com os não tratados. Além disso, as análises de proteínas in vitro e in vivo mostraram uma regulação negativa nos níveis de fosforilação de AKT e ERK após o tratamento com inibidor de HCK. **Discussão e conclusões:** O inibidor de HCK tem atividade antineoplásica sobre células leucêmicas sem alterar a sobrevivência das células normais, demonstrando ação de morte celular maligna no alvo, provavelmente através da redução da ativação das vias oncogênicas PI3K e MAPK. Atualmente, a ineficácia da quimioterapia padrão está principalmente relacionada à não especificidade entre células leucêmicas e hematopoéticas normais. Nesse cenário, nossos resultados mostraram a eficácia na inibição de HCK e identificaram este composto como uma oportunidade terapêutica promissora que poderia levar à reversão da resistência à quimioterapia. **Financiamento:** FAPESP 2017/21801-2, 2019/25247-5, 2021/05320-0.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.242>

INIBIDORES DE PROTEÍNAS DA FAMÍLIA BCL-2 CONTRA NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS E SEUS EFEITOS NA COMBINAÇÃO COM CITARABINA, VENETOCLAX E DOXORRUBICINA

MLP Bueno^a, LL Artico^b, ADS Santos^a,
A Bastos^a, JA Yunes^b, STO Saad^a, FM Roversi^a

^a Centro de Hematologia e Medicina Transfusional -
Hemocentro, Universidade Estadual de Campinas
(UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

^b Centro Infantil Boldrini, Campinas, SP, Brasil

Objetivos: A proteína antiapoptótica MCL1, membro da família BCL-2, está ativada em pacientes com leucemias agudas e associada a mau prognóstico, recidiva e resistência aos quimioterápicos atuais. Este estudo objetiva investigar os efeitos in vitro, ex vivo e in vivo do composto AZD5991 (AstraZeneca), um novo inibidor de MCL1, associado ou não com o composto AZD4320 (AstraZeneca, inibidor de BCL-2/BCL-XL), venetoclax, citarabina ou doxorubicina. **Métodos:** A expressão de MCL1 foi realizada em células mononucleares isoladas de 163 pacientes com Leucemia Mieloide Aguda (LMA) (idade média de 57,5 anos) (TGCA). Aspirados de medula óssea (25) de doadores saudáveis, pacientes com mielodisplasia (SMD), LMA e leucemia linfoblástica aguda (LLA) ao diagnóstico foram submetidos à análise dos níveis de proteína MCL1. As linhagens celulares OCI-AML3, MOLM13, U937, HL60, KG1a, K562, RS4;11 e Jurkat foram tratadas com concentrações crescentes do composto AZD5991 por 48h e avaliadas para a determinação da atividade do composto/viabilidade celular (IC50) e apoptose. Células mononucleares e hematopoéticas (CD34+) de doadores também foram submetidas a ensaios citotóxicos. Células leucêmicas foram testadas com AZD5991 quanto à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO), potencial de membrana mitocondrial e expressão de proteínas (entre 0 e 48h), associado ou não. Além disso, testamos a ação do AZD5991 em sistemas de cocultura 3D (células mesenquimais) e cocultura 2D (monócitos). Camundongos NOD/SCID foram enxertados usando a linhagem celular leucemia U937. Análises estatísticas: Kruskal Wallis, ANOVA ou Mann-Whitney ($p < 0,05$). **Resultados:** Uma alta expressão do gene MCL1 foi observada em pacientes com LMA ($p < 0,0001$). Os níveis das proteínas MCL1, BCL-2 e BCL-xL foram maiores nas células de pacientes com SMD, LMA e LLA em comparação com as células de doadores. Todas as linhagens celulares leucêmicas mostraram sensibilidade ao AZD5991 de maneira concentração-dependente, sendo IC50 0,4 μM /OCI-AML3, 4,3 μM /U937, 3,5 μM /RS4;11 0,3 μM /Jurkat. O AZD5991 também modulou a apoptose celular, principalmente na linhagem OCI-AML3. O AZD5991 foi capaz de reduzir o potencial de membrana mitocondrial e a produção mitocondrial de ROS e NO ($p < 0,01$). Diminuiu também os níveis proteicos de MCL1, Bax e Bak e aumentou de Bim. As coculturas 2D, com monócitos programados e 3D, com células mesenquimais mostraram que o tratamento com AZD5991 foi capaz de intensificar a morte das células leucêmicas. Além disso, um efeito aditivo entre AZD5991 com AZD4320, venetoclax, citarabina ou doxorubicina foi observado. Em nsaios com camundongos xenotransplantados tratados com AZD5991, associado ou não com AZD4320, houve redução do peso do tumor (diminuição de 3,8 e 2,8 vezes) e volume do tumor (diminuição de 6,5; 2,8 vezes) em comparação com o grupo tratado com veículo, respectivamente. **Conclusões:** As análises mostraram um potente efeito citotóxico do composto AZD5991 in vitro e in vivo, com efeito aditivo na associação com AZD4320, citarabina, venetoclax e doxorubicina. O tratamento de leucemias agudas com o inibidor de MCL1 AZD5991