

the cocultures were treated for 72h with a BCL2 inhibitor, Venetoclax, or an MCL1 inhibitor, AZD5991, as single agents or in combination. Both agents were used at their 10% maximal response concentration (IC10 - 20 nM). Following the treatment, the 3D systems were dissociated using collagenase (for Gelfoam) or trypsin (for spheroids), and cell populations were analyzed by flow cytometry. **Results:** In comparison to monocultures, T-ALL cell viability was enhanced in cocultures with MSCs in Gelfoam 3D system, with 80% of viable ALL cells in all cell ratios tested. Conversely, proliferation of MSCs was diminished compared to monocultures. Although spheroid formation was obtained using hanging drop technique, increasing Matrigel concentrations impaired spheroid formation, except at the highest cell seeding ratio (2:5), which still resulted in highly irregular spheroids with a near-equal distribution of ALL cells and MSCs (1:1). Thus, considering the bone marrow microenvironment, Gelfoam (1:5 cell ratio) was the 3D system that most closely resembled the cellular composition observed in ALL. Cocultures in Gelfoam were treated with Venetoclax and/or AZD5991. The combination therapy effectively inhibited the proliferation of ALL cells in monoculture. However, the combined treatment was not enough to overcome the protective niche action. Importantly, the treatments did not affect MSCs proliferation. **Conclusions:** Our findings demonstrate an innovative 3D coculture system that successfully replicates the BM stromal niche. This novel platform holds promise for the development of new therapeutic strategies for ALL. **Apoio:** FAPESP 2017/21801-2, 2019/25247-5, 2021/05320-0; 2023/13850-4; CNPq 303405/2018-0.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2024.09.586>

HIGH LEUKEMIC STEM CELL FREQUENCY IN FLT3- MUTATED ACUTE MYELOID LEUKEMIA PATIENTS WITH NORMAL KARYOTYPE: IMPLICATIONS FOR PROGNOSIS

CAB Garcia^a, LO Marani^a, M Medeiros^a, MIA Madeira^a, K Pagnano^b, E Nunes^c, ABF Glória^d, EM Rego^e, AG Carvalho^a, F Traina^a, LL Figueiredo-Pontes^a

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

^b Centro de Hematologia e Medicina Transfusional (Hemocentro), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil

^c Hematology Division, Complexo Hospital de Clínicas (CHC), Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Brazil

^d Hematology Division, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG), Belo Horizonte, Brazil

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

Normal karyotype in Acute Myeloid Leukemia (NK-AML) occurs in 40-50% of patients. Leukemic Stem Cells (LSC) persistence is known to trigger relapse, but the prognostic impact of their identification is understudied. We correlated LSC frequency at diagnosis with mutational profile and clinical outcomes in a Brazilian NK-AML cohort. Bone marrow samples (n=93) were submitted to LSC quantification by multiparametric flow cytometry (MPFC). Patients were categorized based on LSC percentage as lower (LSClow) or higher (LSChigh) than 0.1%. Regarding risk stratification, the LSClow group was composed by 19 favorable, 13 intermediate and no adverse-risk. In the LSChigh group, the patients were classified as 25 favorable, 28 intermediate, and 6 adverse, thus suggesting that lower LSC frequency is associated with favorable risk, although statistical significance was not reached. In the LSClow group, 12.5% had the FLT3 mutation whereas in 33.3% of the LSChigh samples FLT3 mutation was detected. Of note, LSChigh samples presented lower FLT3allelic ratio as compared to LSClow (0.47 ± 0.28 vs 0.87 ± 0.53). When associating LSC frequency with NPM1 gene status, 65.62% of LSClow group and 40% of LSChigh group were NPM1 mutated. When the co-mutational status was considered, among individuals with LSClow, 81.8% (n=18) was FLT3 wtNPM1 mut, 13.64% (n=3) was FLT3 mutNPM1 mut, and 4.56% (n=1) FLT3 mutNPM1 wt. In the LSChigh group, 37.5% (n=12) was FLT3 wtNPM1 mut, 37.5% (n=12) was FLT3 mutNPM1 mut, and 25% (n=8) FLT3 mutNPM1 mut. Overall, complete remission (CR/CRi) rate was 64.5% (n=60) after 2 cycles of chemotherapy. No significant difference was observed between groups: 59.4% (n=19) in the LSClow and 67.2% (n=41) in the LSChigh group achieved CR. After remission, 15.6% (n=5) of the patients relapsed in the LSClow group as compared to 16.2% (n=16) of the LSChigh patients. The LSClow group had a mean overall survival (OS) and event-free survival (EFS) of 568 and 541 days, respectively, whereas the LSChigh group had both mean OS and EFS of 466 days. We also assessed outcomes according to ELN2017 risk stratification. Favorable-risk patients with low LSC levels had a mean OS of 130 days, compared to 182 days for those with high LSC levels. Intermediate-risk patients with low LSC levels had a mean OS of 174 days, while the high LSC group had a mean OS of 228 days. Adverse-risk patients with low LSC levels had no measurable mean OS, whereas those with high LSC levels had a mean OS of 216 days. No significant differences in survival distributions between the groups. Our data indicated that FLT3 mutation was more prevalent in patients with higher frequency of LSCs indicating that cases with high LSC content at the flow cytometry initial examination should be quickly assessed for FLT3 mutation, especially considering that target therapy with FLT3 inhibitors can be included in the induction regimen. In agreement, ELN2017 favorable-risk patients had lower LSC quantification at diagnosis. The implication of LSC quantification in survival was not statistically demonstrated due to technical limitations including the number of patients with available data, but remission and survival rates suggested that LSChigh group present worse outcomes. The findings suggest that LSC identification is a potential biomarker that can guide clinicians, particularly for assessment of AML with out karyotypic

abnormalities that rely only on mutational profiles, not always available in low and middle-income countries.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2024.09.587>

ASSOCIAÇÃO ENTRE VENETOCLAX, CITARABINA E BORTEZOMIBE PARA TRATAMENTO DE PACIENTE COM LLA-T EARLY T REFRATÁRIA E RECIDIVADA: RELATO DE CASO

AL Emrich, LE Toyonaga, MG Chaves, IHB Massaut

Centro de Pesquisas Oncológicas de Santa Catarina (CEPON), Florianópolis, SC, Brasil

Introdução: A leucemia linfoblástica aguda de células T (LLA-T) é uma neoplasia hematológica de difícil tratamento. Este relato descreve um caso de LLA-T early-T refratária à terapia de indução, que apresentou resposta completa após terapia-alvo. **Descrição do caso:** Paciente do sexo feminino, 40 anos, apresentou ao diagnóstico febre, dispneia, dor torácica e equimoses. O hemograma revelou anemia (Hb 7,4 g/dL), leucocitose ($191.250/mm^3$) com 90% de blastos, e trombocitopenia (plaquetas $28.000/mm^3$). Uma TC de tórax identificou massa mediastinal ($6,3 \times 5,9 \times 1,8$ cm), e adenopatias axilares e inguinais. A citometria de fluxo de MO identificou 89% de células precursoras linfoides T (CD45+ fraco, CD34-/, C3+, CD7++, CD117-/+). A paciente foi diagnosticada com Leucemia Linfoblástica Aguda de células early-T. O estudo de cariótipo revelou uma anomalia numérica isolada (47,XX,+3[12]/46,XX [8]). A paciente foi submetida à quimioterapia de indução com protocolo Total Therapy XV adaptado; porém na avaliação de medula no D26 ainda apresentava 10% de blastos linfoides T. No D46 da terapia de indução-remissão apresentou DRM 0,11%. Iniciado terapia de consolidação com altas doses de metotrexato, mantendo DRM negativa após o primeiro ciclo ($< 0,05\%$) e TC de tórax sem evidência de massa mediastinal. Após 3º ciclo da consolidação houve perda de DRM (0,1%), tendo-se optado por reintensificação adaptada com HD-ARAC (2 g/m² 12/12h D1-D3), Venetoclax (400 mg D1-D14) e Bortezomibe (1,3 mg/m² no D1, D4, D8 e D11). Após o primeiro ciclo houve resposta completa, resultado que se manteve após o 2º e 3º ciclo. Enquanto aguardava transplante, foi realizado 1 ciclo do protocolo POMP. Paciente foi submetida a transplante alogênico de MO com DRM negativa, porém evoluiu com recidiva da doença 4 meses após o TMO. **Discussão:** Este caso destaca a importância de estratégias terapêuticas inovadoras em LLA-T refratárias, enfatizando o papel crucial da terapia-alvo. A doença frequentemente apresenta superexpressão de BCL-2, proteína anti-apoptótica que promove a sobrevivência celular ao inibir a via apoptótica intrínseca. O venetoclax atua especificamente como inibidor de BCL-2, ligando-se ao seu sítio BH3 e bloqueando a interação com proteínas pró-apoptóticas da família BCL-2, liberando estas proteínas para ativar efetores como BAX e BAK, que permeabilizam a membrana mitocondrial externa, desencadeando a apoptose celular. O bortezomibe, por sua vez, inibe o proteossoma 26S, responsável pela degradação de

proteínas ubiquitinadas. Esta inibição leva ao acúmulo de proteínas mal dobradas e pró-apoptóticas, aumentando o estresse celular e promovendo a morte celular. Além disso, o bortezomibe pode sensibilizar as células leucêmicas à apoptose induzida por venetoclax, criando uma sinergia terapêutica. **Conclusão:** O manejo da LLA-T refratária representa um desafio significativo, especialmente em pacientes que não respondem às terapias de indução convencionais. Este relato ilustra o potencial de novas combinações terapêuticas, como inibidor de BCL-2 associado a inibidor de proteossoma. No presente caso, a paciente respondeu de forma notável a essa combinação após falhar na terapia convencional, alcançando remissão molecular completa que foi mantida até o transplante alogênico de medula óssea. A recidiva precoce pós-transplante, entretanto, nos faz considerar a necessidade de avaliar a associação de tais drogas precocemente ao tratamento, com o intuito de evitar recidiva/refratariedade da doença.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2024.09.588>

DERMATOSE NEUTROFÍLICA ASSOCIADA A AZACITIDINA

RCR Queiroz, VA Rocha, BM Oliveira, VR Ferrarez, PDS Perez, VL Costa, FR Kerbauy

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

Introdução: A Azacitidina, um agente hipometilante utilizado no tratamento da Síndrome Mielodisplásica (SMD) e Leucemia Mieloide Aguda (LMA), é conhecida por causar eventos adversos cutâneos comuns, com poucos relatos de lesões de pele graves. Este estudo descreve dois casos de dermatose neutrofílica durante o tratamento com Azacitidina. **Relato de caso:** Paciente 1. Mulher de 57 anos, hipertensa, com astenia e sangramento mucocutâneo há 6 meses. Admitida com pancitopenia, a imunofenotipagem da medula óssea revelou 16% de blastos mieloides e cariótipo tumoral complexo, diagnosticando LMA/SMD com anormalidades citogenéticas associadas a mielodisplasia. Foi tratada com Venetoclax 100 mg/dia e Azacitidina 75 mg/m², junto com Voriconazol 400 mg/dia. Após 15 dias, desenvolveu placas hiperemiadas com halo central nos membros superiores, acompanhadas de febre (até 38,8°C). A biópsia de pele mostrou dermatite neutrofílica sugestiva de Síndrome de Sweet. Recebeu corticoterapia (Prednisona 1 mg/kg/dia) por 2 semanas, com melhora significativa das lesões. Paciente 2. Homem de 62 anos, hipertenso, com febre, astenia e sangramento mucocutâneo há 2 semanas. Admitido com pancitopenia, a imunofenotipagem da medula óssea revelou 72% de blastos mieloides e cariótipo tumoral complexo, diagnosticando LMA com anormalidades citogenéticas associadas a mielodisplasia. Foi tratado com Venetoclax 100 mg/dia e Azacitidina 75 mg/m², junto com Voriconazol 400 mg/dia. Após 5 dias, desenvolveu nódulos violáceos e ulcerados nas mãos após tentativa de acesso venoso. A biópsia de pele foi inespecífica, com fibrose, mas o quadro clínico sugeriu Pioderma Gangrenoso. Recebeu corticoterapia (Prednisona 1 mg/kg/dia) por 2 semanas, com