

METFORMINA IN VITRO INDUZ APOPTOSE E INIBE A VIA JAK/STAT EM MODELOS DE NEOPLASIA COM MUTAÇÃO CSF3R T618I

NP Fonseca^{a,b}, BA Fenerich^{a,b}, ABA Silva^{a,b},
JL Coelho-Silva^{a,b}, JC Fernandes^{a,b},
CLA Silva^{a,b}, JA Machado-Neto^c, F Traina^{a,b}

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

^b Centro de Terapia Celular, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

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

Objetivos: O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos celulares e moleculares da metformina em leucemia neutrofilica crônica (LNC) com CSF3R T618I. Como demonstrado anteriormente, linhagem celular Ba/F3 foi transduzida para expressar CSF3R T618I e tratada *in vitro* com metformina. Foi observado redução da viabilidade celular e indução da apoptose de forma dose-dependente. Em células primárias de sangue periférico e medula óssea de paciente com LNC CSF3R T618I, a metformina reduziu a viabilidade, aumentou a apoptose celular e aboliu a formação de colônias de células progenitoras hematopoéticas. **Material e métodos:** Linhagem celular Ba/F3 CSF3R T618I foi tratada *in vitro* com metformina (dose course: Ø[RPMI], 1 mM, 5 mM, 10 mM e 20 mM por 24 horas; time course: 0, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas na dose de 5 mM) e submetidas a western blot. Para avaliação do efeito do tratamento *in vivo* com metformina na carga tumoral das células Ba/F3 CSF3R T618I em modelo murino alógrafico, fêmeas NSG de 8 a 12 semanas de vida, receberam injeção subcutânea dorsal contendo 2×10^6 células Ba/F3 CSF3R T618I, ressuspensas em 50 µl de PBS e 50 µl de Matrigel. Os animais foram seguidos até o primeiro animal atingir 1 cm do tumor no maior eixo, randomizados segundo peso e tamanho do tumor, em grupo tratado com metformina 125 mg/kg (n = 10) ou veículo (PBS, n = 9) via intraperitoneal, 1 vez ao dia por 11 dias. Os tumores foram obtidos e mensurados quanto ao peso e volume ($V = W^2 \times L \times 0.52$, em que W e L são os diâmetros menor e maior, respectivamente). **Resultados e discussão:** Na dose de 1 mM o efeito do tratamento da linhagem Ba/F3 CSF3R T618I com metformina foi dependente da via AMPK, o que não ocorreu em doses maiores. Observamos uma redução na fosforilação de STAT3, STAT5, MAPK e ERK e Rictor e um aumento na fosforilação de AKT e 4E-BP1, de forma dose-dependente. A apoptose foi induzida nas células tratadas com metformina, observado pela clivagem das proteínas Caspase 3 e PARP1. Dano do DNA foi verificado pela fosforilação de H2AX. Observamos uma redução nos níveis de fosforilação das proteínas JAK2, STAT3, STAT5, AKT e Rictor de forma tempo-dependente. Ativação de ERK foi verificada após 4 horas tratamento com diminuição nas últimas 48 horas. Em modelo murino, a metformina diminuiu a carga tumoral de células Ba/F3 CSF3R T618I até o dia 9 de tratamento, mas isso não foi sustentado até o fim do tratamento. Também não observamos diferenças



no peso do tumor entre os dois grupos. Resultados de Western Blot dos tumores demonstraram um aumento na ativação das proteínas STAT3, AKT, Rictor e ERK e inibição de Ciclina D1 no grupo tratado. **Conclusões:** Em modelos celulares de neoplasia com mutação CSF3R T618I, a metformina *in vitro* induziu a apoptose e inibiu a via JAK/STAT, entretanto, o efeito anti-neoplásico da metformina *in vivo* não foi confirmado. Suporte: FAPESP, CAPES e CNPq.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.10.235>

MONÓCITOS DE PACIENTES COM POLICITEMIA VERA ESTÃO ENVOLVIDOS NA ERITROFAGOCITOSE

MD Borges^a, RS Costa^a, DM Albuquerque^a,
C Lanaro^a, KY Fertrin^b, FF Costa^a

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

^b University of Washington, Seattle, United States



A eritropoiese em estresse (EE), caracterizada pelo aumento da atividade eritropoietica, é regulada pelos macrófagos centrais das ilhas eritroblásticas (IEs) através da expressão de moléculas de adesão celular, metabolismo de ferro e daquelas que identificam e fagocitam eritrócitos danificados e senescentes. Esses receptores também são expressos nos monócitos (MCs), sugerindo que eles podem estar envolvidos na eritropoiese e na eritrofagocitose, especialmente os MCs intermediários CD14⁺CD16⁺ (MC-I) e clássicos CD14⁺CD16⁻ (MC-C). A Policitemia Vera (PV) é caracterizada pela superprodução de células vermelhas, resultando em um estado crônico de EE. A depleção de macrófagos da IE em modelo animal de PV reverte a esplenomegalia e a eritrocitose, indicando seu papel importante na EE crônica presente na doença. Ainda não se sabe se os MCs têm o mesmo papel em humanos ou se eles têm expressões diferentes de moléculas-chave, o que poderia contribuir para maior severidade da doença. O objetivo deste trabalho foi investigar se MCs circulantes de pacientes com PV estão envolvidos na eritrofagocitose e qual o seu papel na EE crônica através das diferenças de expressão de moléculas de adesão a células eritroides, perfil anti-inflamatório, eritrofagocitose e metabolismo de ferro. Utilizando citometria de fluxo, MCs de sangue periférico de indivíduos controle (CTRL) e de pacientes PV foram investigados quanto a presença intracelular de glicoforina (CD235a) (nCTRL=13; nPV=17) e fenotipados para as moléculas: sialoadesina (CD169), VCAM1 (CD106), receptor do complexo hemoglobina-haptoglobina (CD163), receptor de manose (CD206), SIRPα (CD172) e ferroportina (Fpn) (nCTRL=21; nPV=17). A separação em subtipos foi feita através da expressão de CD14 e CD16. Comparados aos MCs CTRL, foi encontrada maior porcentagem de MCs PV circulantes contendo CD235a intracelular ($0.35 \pm 0.07 \times 4.48 \pm 1.08$, $p < 0.0001$), indicando que eles participam da eritrofagocitose. Além disso, os MC-Cs PV apresentaram maior expressão de CD169 e CD106 e menor expressão de CD172 ($1,167 \pm 216.6 \times 1,834 \pm 241.9$, $p = 0.009$; $1,427 \pm 217.1 \times 2,849 \pm 182.3$, $p = 0.0004$; $104,707 \pm 9,546 \times 77,070 \pm 8,756$, $p = 0.0428$, respectivamente); os MC-I tiveram maior