

LEUCEMIAS AGUDAS

AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA VIA TP53/TP73 NA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

DA Pereira-Martins ^{a,b,c}, C Ortiz ^{b,c},
I Weinhuser ^{b,c}, DR Silveira ^d, TM Bianco ^e,
EM Rego ^c, AR Lucen-Araujo ^a

^a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),
Recife, PE, Brasil

^b Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP),
Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP,
Brasil

^c Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP,
Brasil

^d King's College London, London, United Kingdom

^e Centro de Terapia Celular (CTC), Fundação
Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP),
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP),
Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP,
Brasil

Embora mutações no gene supressor de tumor TP53 (TP53^{mut}) estejam presentes em menos de 10% dos casos de leucemia mieloide aguda (LMA) do adulto, pacientes TP53^{mut} geralmente apresentam respostas insatisfatórias ao tratamento. Em termos práticos, isso se justifica porque algumas drogas usadas nos protocolos atuais dependem da ativação da via do TP53. Entretanto, este pode não ser o único motivo. Análises preliminares do nosso grupo mostraram que um grupo de pacientes sem mutações no TP53 (TP53^{wt}) podem apresentar um comportamento clínico semelhante aos pacientes TP53^{mut}. Neste subgrupo, nós identificamos um aumento da expressão relativa de ΔNp73, uma das isoformas do gene TP73. Esta isoforma truncada tem origem a partir de um promotor adicional, a qual não apresenta o domínio de transativação proteína completa (TAp73). Desta forma, ela é incapaz de transcrever os genes responsáveis da via TP53/TP73, atuando de forma dominante negativa sob a via. Análise transcriptômica de pacientes adultos com LMA apresentando ΔNp73^{alto}/TP53^{wt} revelou um perfil transcricional similar ao perfil transcricional de pacientes TP53^{mut}, o que inclui um status de stemness e frequência aumentada de mutações em genes relacionados a um prognóstico adverso em LMA. Validando esses achados, a expressão forçada de ΔNp73 (por meio de vetores lentivirais) também conferiu um status de stemness em células CD34⁺ de doadores saudáveis. Funcionalmente, células CD34⁺/ΔNp73^{alto} apresentaram um aumento na taxa de proliferação celular e capacidade clonogênica. Em linhagens celulares de LMA TP53^{wt} (MOLM13 e MV4-11), a expressão lentiviral de ΔNp73 conferiu resistência a apoptose a diferentes drogas de uso clínico. Esses resultados foram corroborados ex vivo, onde amostras de pacientes que apresentaram ao diagnóstico um padrão ΔNp73^{alto} foram mais resistentes ao tratamento com venetoclax+5-azacitidina. Finalmente, os dados de acessibilidade da cromatina em pacientes com LMA permitiram a identificação de uma região diferencialmente acessível no intron 2 do gene TP73

(+24Kb após o início do sítio de transcrição, referido como pico B). Por meio de técnicas de CRISPR/Cas9, geramos células MOLM13 knockout sem essa região pico B (MOLM13-KO) para avaliar se esta atuaria como uma região controladora da expressão de ΔNp73. As células MOLM13-KO exibiram expressão significativamente reduzida de ΔNp73. A perda dessa região também prejudicou a capacidade de regular positivamente a expressão de ΔNp73 após estresse induzido por drogas, sugerindo ser esta a região responsável pela expressão diferencial desta isoforma. A análise de imunoprecipitação de cromatina comprovou uma redução da ligação do ΔNp73 as regiões reguladoras da expressão de TP53 e TP73, bem como de genes alvo da via, como o CDKN1A. Como resultado da diminuição de ΔNp73, as células MOLM13-KO se tornaram mais sensíveis a estímulos apoptóticos. Em resumo, células ΔNp73^{alto}/TP53^{wt} apresentam assinatura genética semelhante a células TP53^{mut}. Funcionalmente, células ΔNp73^{alto}/TP53^{wt} são mais resistentes a apoptose induzida por drogas e apresentam maior capacidade proliferativa. Além disso, é a primeira vez que um estudo identificou um enhancer capaz de direcionar a expressão diferencial das isoformas do gene TP73. Em combinação, nossos resultados podem ajudar a esclarecer o porquê pacientes TP53^{wt} apresentam respostas clínicas tão heterogêneas, além de fornecer um possível alvo terapêutico para pacientes adultos com LMA.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.452>

A INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DE EZRINA REDUZ O CRESCIMENTO, ADESÃO, MIGRAÇÃO E REGULA O GENES RELACIONADOS À APOPTOSE E CICLO CELULAR EM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

JCL Silva ^{a,b}, K Lima ^{a,c}, M Lazarini ^d, HP Vicari ^a,
WF Silva ^c, EM Rego ^c, BC Ede ^b, AJ Ridley ^b,
JA Machad-Neto ^e

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

^b Escola de Medicina Celular e Molecular, Faculdade
de Ciências da Vida, University of Bristol, Bristol,
Reino Unido

^c Laboratório de Investigação Médica em Patogênese
e Terapia Dirigida em Onco-Imuno-Hematologia
(LIM-31), Faculdade de Medicina, Universidade de
São Paulo (FMUSP), São Paulo, SP, Brasil

^d Departamento de Ciências Farmacêuticas,
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São
Paulo, SP, Brasil

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

Objetivo: As atuais opções terapêuticas disponíveis para pacientes adultos com leucemia linfoblástica aguda (LLA) permanecem limitadas. Recentemente, nosso grupo de pesquisa

identificou o gene EZR, que codifica a proteína ezrina, como marcador prognóstico independente e alvo molecular para leucemia mieloide aguda. Ezrina é uma importante proteína associada ao citoesqueleto que permite a transdução de sinal entre proteínas de membrana como tirosina quinases, Rho GTPases e filamentos de actina. O presente estudo teve como objetivo verificar o impacto da inibição farmacológica de ezrina na viabilidade, crescimento clonal autônomo, apoptose, adesão, migração e expressão gênica na LLA. **Métodos:** As linhagens celulares de LLA Jurkat, NALM6 e REH e células primárias de pacientes com LLA (n = 15) foram tratadas com concentrações crescentes do inibidor de ezrina, NSC305787. A viabilidade celular foi avaliada por MTT, colônias autônomas por ensaio clonogênico, análise de expressão gênica por PCRq, adesão celular avaliada por ensaio de adesão em fibronectina, migração celular por transwell e quimiotaxia com CXCL12, vias de sinalização foram investigadas por western blot e proteômica. A expressão diferencial de genes foi determinada na ferramenta Galaxy. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste ANOVA e pós-teste de Bonferroni, sendo considerado estatisticamente significativo um valor de $p < 0,05$. **Resultados:** O tratamento com NSC305787 reduziu significativamente a viabilidade celular das células Jurkat, NALM6 e REH de uma maneira dependente da concentração ($p < 0,05$). Os valores de IC50 foram 5,1, 3,3 e 4,3 μM para Jurkat, NALM6 e REH, respectivamente, no tempo de tratamento de 24 horas. O tratamento a longo prazo com NSC305787 reduziu o crescimento clonal autônomo de células Jurkat, NALM6 e REH de maneira dependente da concentração ($p < 0,05$). A inibição farmacológica de ezrin reduziu fortemente a adesão e migração em células LLA ($p < 0,05$). Em células primárias, NSC305787 reduziu a viabilidade celular em uma faixa de IC50 de 2,5 a 11,2 μM . O tratamento com NSC305787 (1,6 μM / 24 h), levou a redução de CCNA2 e aumento de CDKN1A, BCL2L1 e BIM ($p < 0,05$) em células Jurkat; redução de CCNA2 e BCL2 e aumento de BCL2L1, BAX e BAD em células NALM6; redução de CCNA2 e CCNB1 e aumento de CDKN1A, CDKN1B, BCL2L1, MCL1 e BAX em células REH. Em todas as linhagens celulares, o inibidor reduziu a fosforilação de RPS6 e induziu a clivagem de PARP1. Dados proteômicos de células NALM6 tratadas com NSC305787 (3,2 μM / 12h) evidenciaram uma regulação positiva de proteínas envolvidas em processos biológicos, como regulação do ciclo celular e processos catabólicos de RNA, e regulação negativa do alongamento da tradução mitocondrial e alongamento da tradução. **Discussão e conclusão:** A regulação negativa de genes relacionados à progressão do ciclo celular e resposta anti-apoptótica e a regulação positiva de genes relacionados à parada do ciclo celular, pró-apoptóticos suportam a hipótese de que NSC305787 está envolvido com mecanismos de indução de morte celular. Nossos resultados indicam que o inibidor de ezrina, NSC305787, tem efeitos antileucêmicos em modelos de LLA. Apoio: CNPq, CAPES e FAPESP.

NOVEL POTENTIAL HDAC INHIBITOR INDUCES CELL DIFFERENTIATION IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA CELLS

JAEG Carlos^a, LC Almeida^a, K Lima^b, MT Tavares^c, KB Waitman^c, LV Cost-Lotufo^a, R Paris-Filho^c, JA Machad-Neto^a

^a Department of Pharmacology, Biomedical Science Institute, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil

^b Department of Internal Medicine, Hematology Division, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil

^c Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Science, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil

Objective: Histone deacetylases (HDAC) are enzymes responsible for the deacetylation of histone proteins and play important roles in cell survival, cell proliferation, and gene expression in various types of cancers, including leukemias. High HDAC levels have been observed in hematological neoplasm patients being associated with poor prognosis. In a previous study, we identified three purine-derived phenylhydroxamate as potential HDAC inhibitors with selective potential antineoplastic effects in hematological neoplasms. The present study aimed to evaluate the effects of compound 82, the most potent purine-derived phenylhydroxamate identified, on cell differentiation of acute myeloid leukemia cells. **Material and methods:** NB4-R2 (resistant to ATRA) and THP-1 leukemia cell lines were used. Vorinostat was used as a reference drug. Compound 82, a purine-derived phenylhydroxamate with potential HDAC inhibitor activity, was used. Cells were exposed for 96h to the vehicle or the drugs. Cell differentiation was evaluated by CD11b staining and flow cytometry, and morphological analysis by cytospin and panoptic staining. Statistical analysis was performed by ANOVA and Bonferroni post-test. A $p < 0.05$ was considered significant. **Results:** NB4-R2 and THP-1 cells treated with vorinostat or compound 82 presented increased markers of differentiation (CD11b) ($p < 0.05$). A reduction in the nucleus-to-cytoplasm ratio and increases in vacuolization were observed upon 96h of exposition to drugs. **Discussion and Conclusion:** Therapy based on cell differentiation has been successfully applied to some types of acute leukemias, such as acute promyelocytic leukemia. Thus, the identification of new compounds with the potential to induce differentiation is of interest in oncohematology. Our results indicate that purine-derived phenylhydroxamate induced cell differentiation in acute leukemia cell lines. **Funding:** Supported by CNPq, CAPES, and FAPESP.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.454>

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.453>