

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 neutrofílica 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 alográfico, 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

expressão de CD169 e CD106 ($2,221 \pm 322.4 \times 3,150 \pm 321.8$, $p = 0.0371$; $2,186 \pm 201.7 \times 2,721 \pm 153.5$, $p = 0.0238$, respectivamente); e os não clássicos CD14^{low}CD16⁺ (MC-NC) de CD206, CD163, CD172 e CD106 ($181.2 \pm 8.5 \times 268.6 \pm 13.4$, $p < 0.0001$; $312.3 \pm 15.1 \times 368.8 \pm 12.1$, $p = 0.0174$; $13,923 \pm 2256 \times 22,792 \pm 3211$, $p = 0.0161$; $1,234 \pm 96 \times 1,498 \pm 58.9$, $p = 0.004$, respectivamente). A menor expressão de CD172 nos MC-Cs PV sugere menor sinal inibitório para a eritrofagocitose nessas células. Não houve diferença na expressão de Fpn. Apesar dos MC-Cs e MC-I já terem sido relacionados com a eritropoiese, os MC-NC apresentaram maior número de moléculas diferencialmente expressas, mostrando que também podem estar envolvidos. Isso sugere que os MCs PV são mais propensos a aderir a células eritroides e contribuir para a formação de IEs. A maior eritrofagocitose dos MCs PV circulantes foi acompanhada da maior expressão de marcadores relevantes para a adesão de células eritroides nos MCs de todos os subtipos. Mais estudos são necessários para um melhor entendimento do papel dos MCs na EE e na formação de IEs, fornecendo possíveis alvos para o tratamento da EE crônica presente na PV.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.10.236>

NATURAL KILLER CELLS PHENOTYPE CORRELATES WITH TYROSINE KINASE INHIBITORS TREATMENT RESPONSE IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA PATIENTS

LS Binelli, AFO Costa, LO Marani, IA Lopes, F Traina, LC Palma, PMM Garibaldi, LL Figueiredo-Pontes

Hematology Division, Department of Medical Images, Hematology, and Clinical Oncology, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

Background: Despite well-known Natural Killer (NK) cells antitumor activity, its potential in regulating Chronic Myeloid Leukemia (CML) is not fully established. Tyrosine kinase inhibitors (TKI) treatment, besides reducing BCR-ABL1 transcripts, seems to result in immunomodulation that partly restore the immune dysregulation of the disease. Numerical, functional and maturation defects might be associated with CML risk stratification, molecular response profile or even with resistance to treatment with TKI. Therefore, we aimed to immunophenotypically characterize frequency, subtypes and maturation profile of NK cells in CML patients, by Multiparametric Flow Cytometry (MFC), during monitoring of TKI treatment. **Methods:** 11 Peripheral Blood samples from patients with CML (Clinical Hospital of Ribeirão Preto - HCRP-USP) and 10 healthy donors (controls) were analyzed. Clinical, laboratory and ELN2017 risk stratification were assessed. NK cells were defined as CD19-CD3-CD56⁺ and: CD56brightCD16- (secretory), CD56dimCD16⁺ (cytotoxic), CD11b-CD27- (tolerant); CD27+CD11b- (immature secretor), CD27+CD11b+ (secretory) and CD11b+CD27- (cytotoxic). Based on molecular response levels assessed by BCR-ABL1 RT-qPCR, patients were classified in G1 (without loss of molecular response to the 1st

line of TKI; n = 3), G2 (loss of molecular response to 1st line of TKI; n = 3) and G3 (loss of molecular response to 2nd generation TKI; n = 5). Mann Whitney or Kruskal-Wallis tests ($p < 0.05$) were applied using SPSS (v.20). **Results:** A higher frequency of lymphocytes in CML patients was observed when compared to controls ($p = 0.0242$), but no difference was found in the frequency of NK cells. G1 and G2 showed a higher frequency of NK cells than G3 ($p = 0.7774$). Even though no statistical significance was found, CD27-CD11b- and CD27+CD11b- NK cells showed a higher frequency, while CD27+CD11b+ NK cells showed a lower frequency in CML when compared to controls. Frequency of CD27+CD11b- NK cells was higher in G2 and G3 when compared to G1. G3 showed an immature profile with higher percentages of CD27-CD11b- and CD27+CD11b- NK cells when compared to controls, while the more mature CD27+CD11b+ NK cells showed a lower frequency in CML. Furthermore, a lower frequency of CD56brightCD16- ($p = 0.0002$) and CD56dimCD16⁺ ($p = 0.0448$) NK cells was observed in CML, as well as the frequency of CD27-CD11b+ cytotoxic NK cells, consistent to what we found in G3 and supporting our hypothesis. **Conclusion:** We observed that patients with loss of molecular response in treatment with 1st and 2nd TKI generation presented an immature non-effective NK cell profile, with deficient cytotoxicity. This scenario might result in impaired tumor surveillance of CML, meaning that phenotypic changes in NK cells may directly affect risk stratification and treatment response in CML. However due to the small number of patients and the lack of a functional assay, it is not possible to confirm that the cytotoxic cell may actually be deficient. Our findings and further functional studies can contribute to a better understanding of the physiopathology, prognosis and monitoring of CML, response to TKI therapy, as well as help to define therapeutic strategies based on immunotherapy mediated by NK cells.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.10.237>

PERFIL CLÍNICO E TERAPÊUTICO DAS LEUCEMIAS MIELÓIDES CRÔNICAS EM FASE CRÔNICA ASSISTIDAS EM SERVIÇO DE HEMATOLOGIA

ML Puls^a, AAL Puls^b

^a Santa Casa de Araraquara (SCA), Araraquara, SP, Brasil

^b Clínica GastroHematológica Ararense (CGHA), Faculdade de Medicina São Leopoldo Mandic (FMSLM), Araras, SP, Brasil

Objetivo: Descrição da experiência dos últimos 8 anos de acompanhamento, diagnóstico e terapêutica de pacientes com leucemia mielóide crônica (LMC) em serviço médico de hematologia & hemoterapia no interior do estado de São Paulo. **Material e métodos:** Estudo descritivo, retrospectivo e observacional realizado a partir de dados obtidos por meio da análise de prontuários eletrônicos de portadores de LMC em fase crônica admitidos e atendidos de janeiro de 2012 (ano de implantação do sistema de prontuários eletrônicos nesta instituição) a dezembro de 2020 em serviço médico

