



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

MANUELA ALBUQUERQUE DE MELO

**Avaliação da autofagia como mecanismo limitante da eficiência terapêutica de inibidores farmacológicos de FLT3 em leucemia mieloide aguda**

Ribeirão Preto

2023

MANUELA ALBUQUERQUE DE MELO

**Avaliação da autofagia como mecanismo limitante da eficiência terapêutica de inibidores farmacológicos de FLT3 em leucemia mieloide aguda**

Versão Resumida, conforme Resolução CoPGr nº 7569, de 03 de outubro de 2018, a qual regulamenta a disponibilização das dissertações e teses no Portal da Universidade de São Paulo.

Programa: Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular

Área de Concentração: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fabíola Traina

Co-orientador: Prof. Dr. João Agostinho Machado Neto

Ribeirão Preto

2023

## **APOIO E SUPORTE FINANCEIRO**

O presente trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001;
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Processo: 409401/2021-8;
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Processo: 2021/11112-0.
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP – Centros de Pesquisa, Inovação e Difusão [CEPID] - Centro de Terapia Celular [CTC] - Processo: 13/08135-2); (INCTC/FAPESP Processo: 2014/50947-7)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Células-Tronco e Terapia Celular – INCTC Processo: 465539/2014-9.

MELO, Manuela Albuquerque de. **Avaliação da autofagia como mecanismo limitante da eficiência terapêutica de inibidores farmacológicos de FLT3 em leucemia mieloide aguda.** 2023. Mestrado em Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular - Faculdade de Medicina Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

## RESUMO

Mutações no gene *FLT3* atingem cerca de 30% dos pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA), sendo a FLT3-ITD a mais frequente e relacionada a um pior prognóstico. O desenvolvimento de inibidores de FLT3 representou um avanço no tratamento da LMA, pois reduzem a proliferação celular e melhoram a sobrevida dos pacientes. Contudo, a limitação clínica no tratamento da LMA com mutação FLT3 representa uma oportunidade de investigar combinações de fármacos que resultem em melhores resultados terapêuticos. O presente estudo, portanto, tem como objetivo comprovar que inibidores de FLT3 induzem autofagia e que a terapia combinada com inibidores da autofagia potencializam o efeito anti-leucêmico dos inibidores de FLT3. Para tanto, investigamos, por meio de análise de dados públicos de expressão gênica, e análises de enriquecimento de conjuntos gênicos (GSEA), os efeitos do tratamento *ex vivo* com midostaurin e quizartinib em células primárias de pacientes com LMA. Para avaliar autofagia decorrente do tratamento com inibidores de FLT3, as linhagens celulares com mutação FLT3-ITD MOLM13 (homozigose) e MV4-11 (heterozigose) foram tratadas *in vitro* por 48 horas com inibidor de FLT3 de primeira ou segunda geração (midostaurin, na dose de 12.5 nM e quizartinib na dose de 1.25 nM, respectivamente); a autofagia foi visualizada através de microscopia óptica (coloração panótica), microscopia de fluorescência e citometria de fluxo (ambas pela detecção da sonda celular de livre-permeabilização laranja de acridina) e os mecanismos moleculares da indução da autofagia foi realizada por meio da análise de expressão proteica por Western Blotting. Para avaliar os efeitos anti-leucêmicos decorrente do tratamento com fármacos inibidores de FLT3 e de autofagia, as linhagens celulares e as células primárias foram tratadas por 48 horas com midostaurin na dose de 12.5 nM e quizartinib na dose de 1.25 nM combinados ou não com a inibição farmacológica (cloroquina na dose de 5 µM) ou genética (silenciamento gênico de ATG5 através de partículas lentivirais) da autofagia e a sobrevida celular foi avaliada a partir de ensaios de viabilidade (metiltiazoltetrazólio), proliferação (anti-Ki-67 humano) e morte celular (Anexina V). Para comparação entre variáveis contínuas em grupos categóricos foi utilizado o teste ANOVA e o pós-teste de Bonferroni. Observamos o enriquecimento de genes da autofagia em pacientes com LMA e mutação em FLT3 que responderam mal ao tratamento *ex vivo* com midostaurin e quizartinib ( $p < 0,05$ ). Em linhagens celulares de LMA com mutação FLT3 (MOLM13 e MV4-11), o tratamento *in vitro* com inibidores de FLT3 aumentou a vacuolização citoplasmática e a formação de autofagolisossomos ( $p < 0,05$ ). A análise de expressão proteica permitiu observar que o tratamento com midostaurin e quizartinib induziu autofagia a partir da degradação da proteína p62 e da conversão da proteína LC3B-I em LC3B-II com posterior degradação de LC3B-II, e a indução da autofagia foi mediada por meio da inibição

da via de sinalização PI3K-AKT-mTOR. A combinação de inibidor de FLT3 com a inibição genética ou farmacológica da autofagia potencializou o efeito antineoplásico dos inibidores de FLT3 demonstrado através da redução da viabilidade celular ( $p < 0,05$ ) e do aumento da apoptose celular ( $p < 0,05$ ) comparado com a monoterapia com inibidores de FLT3. Contudo, a inibição da autofagia não demonstrou alterar a capacidade de proliferação celular ( $p > 0,05$ ). O tratamento combinado de midostaurin ou quizartinib com a cloroquina reduziu a viabilidade e aumentou a apoptose em células de paciente com LMA com mutação FLT3-ITD, mas não em paciente com LMA com FLT3-WT. Em conclusão, os inibidores de FLT3 de primeira ou segunda geração induzem autofagia em células de LMA com mutação FLT3. A inibição da autofagia pode, portanto, aumentar o efeito anti-leucêmico de inibidores de FLT3, servindo como um potencial alvo terapêutico e auxiliando no melhor entendimento de mecanismos de resistência farmacológica.

Palavras chaves: autofagia, inibidor de FLT3, leucemia mieloide aguda

MELO, Manuela Albuquerque de. **Assessment of autophagy as a therapeutic efficiency limiting mechanism of FLT3 pharmacological inhibitors on acute myeloid leukemia.** 2023. Master program in clinical oncology, stem cells and cell-based therapy – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

## ABSTRACT

Mutations in the *FLT3* gene affect about 30% of patients with acute myeloid leukemia (AML), with FLT3-ITD being the most frequent and related to a worse prognosis. The development of FLT3 inhibitors represented a breakthrough in the treatment of AML, as they reduce cell proliferation and improve patient survival. However, the clinical limitation in the treatment of AML with FLT3 mutation represents an opportunity to investigate combinations of drugs that result in better therapeutic results. The present study, therefore, aims to prove that FLT3 inhibitors induce autophagy and that combined therapy with autophagy inhibitors potentiate the anti-leukemic effect of FLT3 inhibitors. To this end, we investigated, through analysis of public gene expression data, and gene pool enrichment analyzes (GSEA), the effects of ex vivo treatment with midostaurin and quizartinib in primary cells of patients with AML. To evaluate autophagy resulting from treatment with FLT3 inhibitors, cell lines with FLT3-ITD mutation MOLM13 (homozygosity) and MV4-11 (heterozygosity) were treated in vitro for 48 hours with a first- or second-generation FLT3 inhibitor (midostaurin, at a dose of 12.5 nM and quizartinib at a dose of 1.25 nM, respectively); autophagy was visualized through optical microscopy (panoptic staining), fluorescence microscopy and flow cytometry (both by detection of the acridine orange free-permeabilization cell probe) and the molecular mechanisms of autophagy induction were performed through analysis of protein expression by Western Blotting. To evaluate the anti-leukemic effects resulting from the treatment with drugs that inhibit FLT3 and autophagy, cell lines and primary cells were treated for 48 hours with midostaurin at a dose of 12.5 nM and quizartinib at a dose of 1.25 nM combined or not with pharmacological (chloroquine at a dose of 5  $\mu$ M) or genetic (*ATG5* gene silencing through lentiviral particles) inhibition of autophagy. phagia and cell survival was evaluated from viability (methylthiazoltetrazolium), proliferation (anti-human Ki-67) and cell death (Annexin V) assays. For comparison between continuous variables in categorical groups, the ANOVA test and the Bonferroni post-test were used. We observed enrichment of autophagy genes in patients with AML and FLT3 mutation who responded poorly to ex vivo treatment with midostaurin and quizartinib ( $p < 0.05$ ). In AML cell lines with FLT3 mutation (MOLM13 and MV4-11), in vitro treatment with FLT3 inhibitors increased cytoplasmic vacuolation and autophagolysosome formation ( $p < 0.05$ ). Protein expression analysis showed that treatment with midostaurin and quizartinib induced autophagy from the degradation of the p62 protein and the conversion of the LC3B-I protein into LC3B-II with subsequent degradation of LC3B-II, and the induction of autophagy was mediated through the inhibition of the PI3K-AKT-mTOR signaling pathway. The combination of FLT3 inhibitor with genetic or pharmacological inhibition of autophagy potentiated the antineoplastic effect of FLT3 inhibitors demonstrated by reduced cell

viability ( $p < 0.05$ ) and increased cell apoptosis ( $p < 0.05$ ) compared to monotherapy with FLT3 inhibitors. However, the inhibition of autophagy did not alter the ability of cell proliferation ( $p > 0.05$ ). Combined treatment of midostaurin or quizartinib with chloroquine reduced viability and increased apoptosis in cells from AML patient with FLT3-ITD mutation, but not in AML patient with FLT3-WT. In conclusion, first or second generation FLT3 inhibitors induce autophagy in FLT3 mutated AML cells. Inhibition of autophagy may therefore enhance the anti-leukemic effect of FLT3 inhibitors, serving as a potential therapeutic target and helping to better understand drug resistance mechanisms.

Keywords: autophagy, FLT3 inhibitor, acute myeloid leukemia