

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

Alexia Nedel Sant'Ana

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE CÉLULAS SUPRESSORAS DERIVADAS DA
LINHAGEM MIELOIDE NA PROGRESSÃO DA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**

Porto Alegre

2022

Alexia Nedel Sant'Ana

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE CÉLULAS SUPRESSORAS DERIVADAS DA
LINHAGEM MIELOIDE NA PROGRESSÃO DA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Figueiró

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Sant'Ana, Alexia Nedel
AVALIAÇÃO DO PAPEL DE CÉLULAS SUPRESSORAS DERIVADAS
DA LINHAGEM MIELOIDE NA PROGRESSÃO DA LEUCEMIA
MIELOIDE AGUDA / Alexia Nedel Sant'Ana. -- 2022.
93 f.
Orientador: Fabrício Figueiró.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Leucemia Mieloide Aguda. 2. Imunossupressão. 3.
PMN-MDSCs. 4. M-MDSCs. 5. Prognóstico. I. Figueiró,
Fabrício, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à UFRGS, universidade pública e de qualidade, que me acolheu desde o início da vida acadêmica, e me ensinou para muito além das Ciências Biológicas. Um agradecimento especial ao meu orientador Fabrício, pela confiança em mim e na minha capacidade de realizar este trabalho. Seus ensinamentos e seu olhar cuidadoso permitiram uma trajetória tranquila.

Gostaria de agradecer também, aos médicos colaboradores do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Alessandra, Liane, Mariana, Ebellins e Vitor, que aceitaram realizar este trabalho conosco e trouxeram novos conhecimentos e perspectivas para o meu repertório como bióloga. Um agradecimento especial às colaboradoras do Setor de Diagnóstico Laboratorial, Ana Paula, Mariela e Pâmela, seus valiosos ensinamentos e orientações foram essenciais para a realização deste trabalho, e me fizeram crescer como profissional. Agradeço a todos professores, técnicos, funcionários e estagiários do Departamento de Bioquímica e do Serviço de Diagnóstico Laboratorial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela convivência e auxílio.

Agradeço aos colegas e amigos do laboratório 22, em especial às meninas do grupo das leucemias, Camila e Vitória, por toda a ajuda e discussões que enriqueceram meu trabalho, e à Juliete, por não medir esforços para ajudar. A todo o grupo de pesquisa do laboratório de Imunobioquímica do Câncer, os momentos com vocês e as experiências compartilhadas tornaram tudo mais leve.

Agradeço à minha família, pelo apoio e pela compreensão das ausências necessárias para chegar até aqui. Em especial, agradeço à minha mãe Denice, que

foi a primeira pessoa a acreditar em mim, e fez tudo que esteve ao seu alcance para que eu pudesse realizar meus sonhos. Meu mais sincero muito obrigada, mãe.

Agradeço ao meu companheiro Alexandre, pela compreensão, pelo incentivo, pelo compartilhamento de experiências, por todo o carinho e cuidado que teve comigo no nosso caminho juntos. Nossa história compartilhada me faz muito feliz.

À todas minhas amigas e amigos, pelas conversas, risadas, desabafos e ajuda. Obrigada por acreditarem e torcerem por mim. Vocês melhoram meus dias.

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma, fizeram este trabalho ser possível e enriqueceram minha trajetória.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Leucemia Mieloide Aguda	12
1.1.1. Prognóstico, estratificação de risco e tratamento da Leucemia Mieloide Aguda	14
1.2. Leucemia Mieloide Aguda e mecanismos de evasão imune	17
1.2.1. Células supressoras derivadas da linhagem mieloide (MDSCs).....	19
1.2.1.1. MDSCs na Leucemia Mieloide Aguda.....	24
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. Objetivo geral	26
2.2. Objetivos específicos	26
PARTE II	27
3. MANUSCRITO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA JOURNAL OF IMMUNOLOGY RESEARCH.....	28
PARTE III	64
4. DISCUSSÃO GERAL	65
5. CONCLUSÃO	78
6. PERSPECTIVAS.....	79
7. REFERÊNCIAS.....	81
ANEXO I.....	93

PARTE I

RESUMO

A Leucemia Mieloide Aguda (LMA) é caracterizada pela proliferação clonal e diferenciação anormal de progenitores da linhagem mieloide que resultam no acúmulo de blastos na medula óssea e sangue periférico dos pacientes. Posto que a expansão das células neoplásicas ocorre na medula óssea, há interação direta destas células com os componentes do sistema imune. Nesse contexto, a LMA é um câncer com forte caráter imunossupressor, o que facilita a progressão da doença e prejudica a eficácia de potenciais imunoterapias. Dentre os elementos que merecem destaque no microambiente tumoral da LMA, estão as células supressoras derivadas da linhagem mieloide (MDSCs). As MDSCs são compostas de células heterogêneas divididas em duas principais subpopulações, PMN-MDSCs (MDSCs polimorfonucleares) e M-MDSCs (MDSCs monocíticas), de acordo com as características morfológicas e imunofenotípicas que se assemelham às suas células análogas, neutrófilos e monócitos. No câncer, as MDSCs exercem diversos mecanismos de imunossupressão, induzem o crescimento tumoral, e estão associadas ao surgimento de metástases. Entretanto, ainda não foram definidos marcadores padrões para PMN-MDSCs, assim como há dúvidas acerca do estágio de maturação destas células. Neste trabalho, avaliamos o enriquecimento de estágios maturativos de neutrófilos e a frequência de PMN-MDSCs e M-MDSCs na medula óssea de pacientes com LMA. Observamos que pacientes com baixa razão de neutrófilos $CD11b^-CD16^-/CD11b^+CD16^+$ apresentam menor sobrevida, e que M-MDSCs e PMN-MDSCs, assim como a razão destas células sobre linfócitos T estão aumentadas em pacientes estratificados no grupo de risco adverso. Além disso, pacientes com a mutação *FLT3-ITD* também apresentam maior porcentagem de M-MDSCs e razão M-MDSCs/linfócitos T. Ainda, baseado na significância clínica, apontamos para a CD36 como potencial marcador de PMN-MDSCs na LMA. Dessa forma, nossos resultados encorajam a realização de estudos para confirmar o potencial prognóstico de PMN-MDSCs e M-MDSCs na LMA, assim como o desenvolvimento de terapias que tenham como alvo estas células.

Palavras-chave: Leucemia Mieloide Aguda, Imunossupressão, PMN-MDSCs, M-MDSCs, Prognóstico.

ABSTRACT

Acute Myeloid Leukemia (AML) is a malignancy characterized by clonal proliferation and abnormal differentiation of myeloid progenitors, which results in blasts accumulation in patients bone marrow and peripheral blood. Once malignant cell expansion occurs in bone marrow, there is a direct cross-talk between these cells and the immune microenvironment. In this sense, AML presents a strong immunosuppressive environment, enabling disease progression and hampering immunotherapy. An impacting element of AML immune milieu is the presence of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs). MDSCs are a heterogeneous cell population classified in two main populations, PMN-MDSCs (polymorphonuclear MDSCs) and M-MDSCs (monocytic MDSCs), according to the common morphological and immunophenotypic features with its classical counterparts, neutrophils and monocytes. In the set of cancer, MDSCs exert several immunosuppressive mechanisms, induce tumor growth, and are associated with metastasis development. However, there are no standard markers to define PMN-MDSCs, as well as a lack of information regarding its maturation stage. In the present study, we evaluated the enrichment of neutrophils maturation stages and the frequency of PMN-MDSCs and M-MDSCs on AML patients bone marrow. We reported that patients with a low CD11b⁻CD16⁻/CD11b⁺CD16⁺ neutrophil ratio show poorer overall survival, and that M-MDSCs and PMN-MDSCs, as well as its /T lymphocyte ratio are increased in adverse risk patients. Further, M-MDSCs and M-MDSC/T lymphocyte ratio were increased in *FLT3-ITD* carrier patients. Based on clinical significance, we pointed to CD36 as a potential marker of PMN-MDSCs in AML. Therefore, our results encourage future research to confirm prognostic potential of PMN-MDSCs and M-MDSCs in AML patients and design therapeutic approaches targeting these cells.

Keywords: Acute Myeloid Leukemia, Immunosuppression, PMN-MDSCs, M-MDSCs, Prognostic.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP *Adenosine monophosphate*

ATP *Adenosine 5'-triphosphate*

ATRA *All-trans retinoic acid*

BiTe Bispecific T-cell engaging antibody

DRM Doença residual mínima

e-MDSCs *Early-stage myeloid-derived suppressor cells*

EMT *Epithelial-to-mesenchymal transition*

EROs Espécies reativas de oxigênio

FAB French-American-British

G-MDSCs *Granulocytic myeloid-derived suppressor cells*

HDN *High density neutrophils*

IDO Indoleamina 2,3-dioxigenase

iNOS Óxido nítrico sintase induzível

INCA Instituto Nacional do Câncer

ITD *Internal tandem duplications*

LDN *Low density neutrophils*

LMA Leucemia Mieloide Aguda

LMA M0 Leucemia mieloblástica indiferenciada aguda

LMA M1 Leucemia mieloblástica com maturação mínima aguda

LMA M2 Leucemia mieloblástica com maturação aguda

LMA M3 Leucemia promielocítica aguda

LMA M4 Leucemia mielomonocítica aguda

LMA M4 eos Leucemia mielomonocítica com eosinofilia aguda

LMA M5 Leucemia monocítica aguda

LMA M6 Leucemia eritroide aguda

LMA M7 Leucemia megacarioblástica aguda

MDSCs *Myeloid-derived suppressor cells*

MHC II *Major histocompatibility complex class II*

M-MDSCs *Monocytic myeloid-derived suppressor cells*

MMP9 *Matrix metalloproteinase 9*

NK *Natural killer*

OMS Organização Mundial da Saúde

ONOO⁻ Peroxinitrito

PMN-MDSCs *Polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells*

PBMC *Peripheral blood mononuclear cells*

RT-qPCR *Real-time quantitative polymerase chain reaction*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leucemia Mieloide Aguda

A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma neoplasia caracterizada pela proliferação clonal e diferenciação anormal de células tronco e precursoras da linhagem mieloide, o que resulta no acúmulo de células imaturas chamadas de blastos no sangue periférico e na medula óssea dos pacientes. A expansão dos clones malignos prejudica a produção normal de células mieloides terminalmente diferenciadas e funcionais, como hemácias, plaquetas e leucócitos em geral (BARRETT, 2020). Como consequência, os pacientes com LMA apresentam um quadro típico decorrente da falência da medula óssea: fadiga e falta de ar durante o esforço devido à anemia; infecções recorrentes devido a neutropenia; e uma maior tendência à ocorrência de sangramentos e formação de hematomas devido a trombocitopenia (BARRETT, 2020).

De acordo com a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA), em 2020, no Brasil, ocorreram cerca de 5.920 novos casos de leucemias (aqui estão inclusas a LMA, a Leucemia Linfocítica Aguda, a Leucemia Mieloide Crônica e a Leucemia Linfocítica Crônica) em homens, e 4.890 novos casos em mulheres. No Rio Grande do Sul, estima-se que ocorreram 790 casos de leucemias em 2020, sendo a taxa bruta de incidência a cada 100.000 habitantes de 7,67 em homens, e 6,17 em mulheres (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2020).

Um estudo baseado na base de dados Global Burden of Disease 2017 demonstrou que a incidência de LMA aumentou gradualmente de 1990 a 2017 no

mundo todo (YI et al., 2020). Países desenvolvidos demonstraram uma tendência de maior taxa de incidência normalizada em função da idade e maior taxa de mortalidade em relação aos países em desenvolvimento. Nos Estados Unidos, por exemplo, a *American Cancer Society* estima que em 2022, ocorram 20.050 novos casos de LMA, e cerca de 11.540 mortes em decorrência da doença, sendo a maioria dos casos e mortes ocorrendo em adultos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022). Nesse contexto, a LMA é o tipo mais comum de leucemia em adultos, sendo responsável por cerca de 80% dos casos neste grupo (DE KOUCHKOVSKY; ABDUL-HAY, 2016).

Em 1976, a classificação French-American-British (FAB) foi elaborada por um grupo de especialistas na área. Segundo o sistema de classificação FAB, a LMA é subdividida de acordo com características morfológicas (tipo celular acometido) e maturação do blasto, sendo classificada em LMA M0 - mieloblástica indiferenciada; LMA M1 - mieloblástica com maturação mínima; LMA M2 - mieloblástica com maturação; LMA M3 - promielocítica; LMA M4 - mielomonocítica; LMA M4 eos - mielomonocítica com eosinofilia; LMA M5 - monocítica; LMA M6 - eritroide; e LMA M7 - megacarioblástica (BENNETT et al., 1976).

Entretanto, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a LMA é classificada considerando critérios primariamente citogenéticos e moleculares, mas que também incluem morfologia, imunofenótipo e apresentação clínica (ARBER et al., 2016). De acordo com a revisão de 2016, a OMS classifica a LMA em seis categorias: LMA com anormalidades genéticas recorrentes; LMA relacionada a alterações mielodisplásicas; neoplasias mieloides associadas a terapias; LMA não anteriormente especificada (aqui estão incluídas as classificações morfológicas LMA M0, M1, M2, M4, M5, M6, M7, leucemia basofílica aguda e panmielose aguda com mielofibrose);

sarcoma mieloide; e proliferação mieloide associada a Síndrome de Down (ARBER et al., 2016; KHWAJA et al., 2016).

1.1.1. Prognóstico, estratificação de risco e tratamento da Leucemia Mieloide Aguda

O prognóstico de pacientes com LMA é comumente descrito como ruim, sendo que nos Estados Unidos, segundo o National Cancer Institute, a taxa de sobrevivência em 5 anos é de apenas 30,5% (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2022). O alcance da remissão e a sobrevivência após o diagnóstico depende de fatores como idade, status de performance, presença de comorbidades ou prévio diagnóstico de desordens mieloproliferativas, além de mutações gênicas e alterações citogenéticas, sendo os dois últimos fatores responsáveis por dois terços da variação prognóstica (DE KOUCHKOVSKY; ABDUL-HAY, 2016; DÖHNER et al., 2017). O cariótipo, nesse caso, é um fator preditivo independente de menor sobrevivência (DE KOUCHKOVSKY; ABDUL-HAY, 2016). Contudo, o impacto prognóstico de um marcador (molecular ou cariotípico) é contexto-dependente, ou seja, é influenciado pela presença ou ausência de outras anormalidades (DÖHNER et al., 2017; PAPAEMMANUIL et al., 2016).

Como exemplo, a presença de mutações nos genes *RUNX1* e *TP53*, assim como cariótipo complexo, cariótipo monossomal e aneuploidias como -5/5q- e -7/7q- conferem um prognóstico ruim (DÖHNER et al., 2017). As mutações nos genes *RUNX1* e *TP53* e a presença de cariótipo complexo são fatores preditivos independentes de pior prognóstico, porém a combinação da mutação no *TP53* e cariótipo complexo, prevê o pior desfecho (DÖHNER et al., 2017; PAPAEMMANUIL et al., 2016). Por outro lado, mutação no gene *NPM1* confere um bom prognóstico, entretanto, apenas sem a presença da mutação *FLT3-ITD*, ou com a presença desta mutação com baixa proporção alélica (DÖHNER et al., 2017). A mutação *FLT3-ITD*,

por sua vez, quando presente em pacientes com cariótipo normal está associada a uma pior sobrevida, porém seu impacto nas taxas de sobrevida e recidiva depende da proporção alélica (DÖHNER et al., 2017; PORT et al., 2014).

Dessa forma, a LMA é uma doença complexa, dinâmica e heterogênea, com a presença de vários subclones (DE KOUCHKOVSKY; ABDUL-HAY, 2016). Assim, análises moleculares e cariotípicas auxiliam na estratificação dos pacientes em grupos de risco favorável, intermediário e adverso (DÖHNER et al., 2017). A definição do risco permite a escolha do tratamento adequado e sua intensidade (DE KOUCHKOVSKY; ABDUL-HAY, 2016).

Em geral, o tratamento da LMA consiste nas fases de indução, consolidação e manutenção (KHWAJA et al., 2016). Nesse contexto, os pacientes elegíveis vão para a quimioterapia de indução, a qual consiste no regime “7+3”, que combina 7 dias de infusão de citarabina com 3 dias de uma antraciclina. Os pacientes que não atingem remissão podem ser direcionados para um segundo ciclo de indução (DE KOUCHKOVSKY; ABDUL-HAY, 2016). Entretanto, cerca de 60 a 80% dos pacientes atingem remissão e podem seguir para a terapia de consolidação para erradicar os clones remanescentes e prevenir a recidiva (BÜCHNER et al., 2012; DE KOUCHKOVSKY; ABDUL-HAY, 2016). Na terapia de consolidação, a escolha é feita entre tratamento citotóxico ou transplante de células tronco hematopoiéticas, e depende do risco de morte associado ao tratamento, e de fatores como status de performance e idade do paciente (DE KOUCHKOVSKY; ABDUL-HAY, 2016; KHWAJA et al., 2016). Ainda, é possível realizar a terapia de manutenção de longa duração, entretanto é raramente necessário e pouco realizado (KHWAJA et al., 2016).

Pacientes idosos geralmente possuem um perfil citogenético adverso, além de menor probabilidade de responder a quimioterapia e maior suscetibilidade à toxicidade associada ao tratamento (DE KOUCHKOVSKY; ABDUL-HAY, 2016). Apesar disso, pacientes idosos elegíveis podem se beneficiar do regime 7+3, além de regimes com baixas doses de citarabina, quando em comparação a cuidados paliativos (BURNETT et al., 2007; DE KOUCHKOVSKY; ABDUL-HAY, 2016). Para aqueles não elegíveis, existem evidências que agentes hipometilantes são capazes de promover uma melhora na sobrevida geral (DOMBRET et al., 2015; FENAUX et al., 2010).

No caso da leucemia promielocítica aguda (subtipo FAB M3), até 90% dos pacientes conseguem atingir a remissão completa (KHWAJA et al., 2016). Isso se deve em grande parte, à satisfatória resposta ao tratamento com ácido trans-retinóico (ATRA - *all-trans retinoic acid*) e trióxido de arsênio, que degradam a proteína aberrante formada pela fusão entre os genes *PML* e *RARA*, a qual impede a diferenciação das células mielóides e está presente na maioria dos pacientes desse grupo (LO-COCO et al., 2013; SANZ et al., 2009).

A resposta ao tratamento é idealmente avaliada através da detecção da doença residual mínima (DRM), e é realizada inicialmente, logo após o ciclo de indução e/ou consolidação, ou, pode ser avaliada sequencialmente ao longo da terapia de consolidação para detectar recidiva morfológica (DÖHNER et al., 2017). A análise é feita através de citometria de fluxo ou técnicas moleculares como PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) e sequenciamento de nova geração, e seu monitoramento permite a reestratificação do risco dos pacientes quando necessário (DÖHNER et al., 2017).

O resultado do tratamento convencional é de remissão completa para cerca de 70% dos pacientes, no entanto, a sobrevida em 5 anos é de cerca de 30 a 45% (BOSE; VACHHANI; CORTES, 2017; BÜCHNER et al., 2012). Além disso, em torno de 25% apresentam resistência ao tratamento (BÜCHNER et al., 2012). Ainda, um dos principais problemas no tratamento da LMA é a recidiva, sendo que neste grupo a sobrevida a longo prazo é de cerca de apenas 10% (ROWE et al., 2005). Assim, posto que os resultados do tratamento da LMA ainda são insatisfatórios, há a necessidade de identificar mecanismos de resistência ao tratamento, como mecanismos de evasão imune, por exemplo, com o objetivo de aliar novos alvos terapêuticos ao tratamento citotóxico já consolidado.

1.2. Leucemia Mieloide Aguda e mecanismos de evasão imune

Diversos estudos relatam que o microambiente da LMA é imunotolerante, o que se demonstra a partir de mecanismos de evasão imune ou imunossupressão realizada ativamente pelos blastos (Figura 1) (BARRETT, 2020). Nesse contexto, há prejuízos na apresentação de antígenos, por exemplo, como demonstrado pela diminuição da expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II) observada em pacientes após transplante de células tronco hematopoiéticas (CHRISTOPHER et al., 2018). Xiao e colaboradores reportaram que a diminuição da diferenciação de células dendríticas plasmocitóides está fortemente correlacionada com uma doença residual mínima positiva e menor sobrevida (XIAO et al., 2019).

Além disso, os blastos são capazes de expressar ligantes de moléculas de *checkpoint* imune como PD-L1 e galectina-9, que, ao se ligarem nos seus receptores

em linfócitos T e células *natural killer* (NK), induzem a disfunção dessas células (JIA et al., 2018; TETTAMANTI et al., 2022). Notavelmente, a frequência de linfócitos T CD8⁺ que expressam moléculas de *checkpoint* imune e a superexpressão da molécula inibitória NKG2A são fatores preditivos de falha na resposta ao tratamento quimioterápico de indução e de transplante de células tronco hematopoiéticas, além de estarem associados a maior taxa de recidiva em pacientes com LMA (KONG et al., 2016; STRINGARIS et al., 2014).

Os blastos de LMA também produzem uma gama de fatores solúveis inibitórios, como IL-10, TGF- β e indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), que são capazes de induzir linfócitos T regulatórios, cuja frequência também está associada com um pior prognóstico (SHENGHUI et al., 2011; TETTAMANTI et al., 2022). Dentre as outras populações regulatórias expandidas durante o curso da LMA, também estão os macrófagos caracterizados pelo perfil anti-inflamatório, historicamente conhecidos como M2, e as células supressoras derivadas da linhagem mieloide (MDSCs - *myeloid-derived suppressor cells*) (TETTAMANTI et al., 2022).

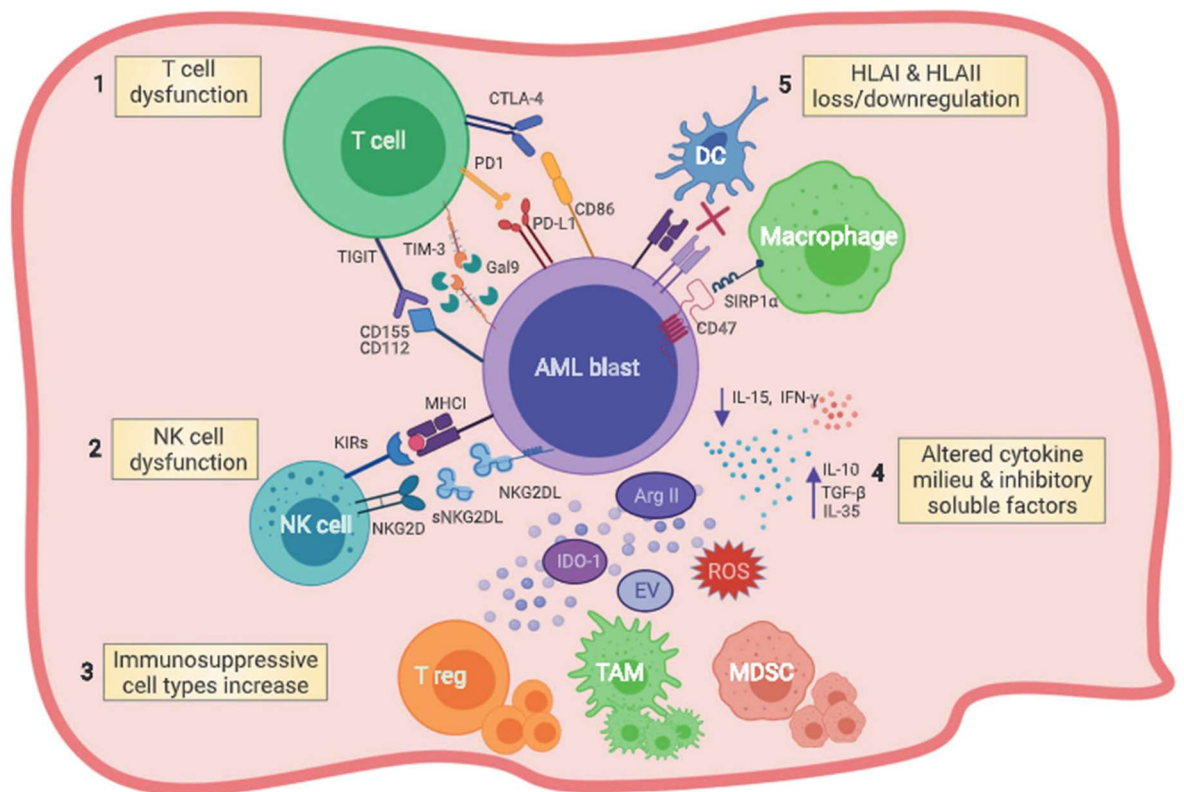


Figura 1. Mecanismos de evasão imune exercidos pelos blastos na progressão da LMA (retirado de TETTAMANTI et al. 2021).

1.2.1. Células supressoras derivadas da linhagem mieloide (MDSCs)

As MDSCs são uma população heterogênea derivada de progenitores mieloides que dariam origem a monócitos e neutrófilos clássicos. Dessa forma, existem duas principais populações de MDSCs: MDSCs monocíticas (M-MDSCs) e MDSCs polimorfonucleares ou granulocíticas (PMN-MDSCs ou G-MDSCs). Ainda existe um terceiro subgrupo, menos estudado, de células chamadas de e-MDSCs (*early-stage* MDSCs), caracterizadas por um fenótipo mais imaturo (VEGLIA; SANSEVIERO; GABRILOVICH, 2021).

Apesar do interesse no estudo das MDSCs ter aumentado consideravelmente nos últimos anos, ainda existe muita discussão acerca de marcadores padrões para definir estas células, assim como seu estágio de maturação (BERGENFELZ; LEANDERSSON, 2020; BRONTE et al., 2016; HEGDE; LEADER; MERAD, 2021). Em geral, os marcadores CD11b e CD33 são considerados consenso para M-MDSCs e PMN-MDSCs humanas. As M-MDSCs ainda são descritas pelo fenótipo CD14⁺HLA-DR⁻, sendo o último marcador responsável pela separação de monócitos normais, os quais são HLA-DR⁺ (BRONTE et al., 2016). Já as PMN-MDSCs são CD15⁺/CD66b⁺HLA-DR⁻, fenótipo que não faz distinção de neutrófilos clássicos (BRONTE et al., 2016; HEGDE; LEADER; MERAD, 2021). Dessa forma, em muitos casos ainda se faz necessária a separação por gradiente de densidade, posto que as PMN-MDSCs permanecem na fase das células mononucleares, ao passo que os neutrófilos normais separam na camada de alta densidade (BRONTE et al., 2016). Nos últimos anos, estudos têm proposto novos marcadores para diferenciar as PMN-MDSCs de neutrófilos clássicos, como as proteínas CD36 e LOX-1 (AL-KHAMI et al., 2017; CONDAMINE et al., 2016).

Durante muito tempo os pesquisadores definiram PMN-MDSCs como células imaturas, mas trabalhos recentes têm desafiado essa conclusão (MUSOLINO et al., 2017; ORTIZ et al., 2015). Nesse contexto, alguns autores classificam as PMN-MDSCs como células presentes no compartimento maduro de neutrófilos CD11b⁺CD13⁺CD16⁺, ou ainda como uma mistura de células em diferentes estágios maturativos (MEHMETI-AJRADINI et al., 2020; PEREZ et al., 2020). Assim, ainda são necessários estudos para avaliar o estágio de maturação de PMN-MDSCs, assim como para descrever marcadores definitivos para estas células.

Em contrapartida às células análogas, as MDSCs são caracterizadas por sua ação imunossupressora (Figura 2). Assim, a expansão dessas células no câncer prejudica a resposta imune anti-tumoral e consequentemente facilita a progressão da doença (GROTH et al., 2019).

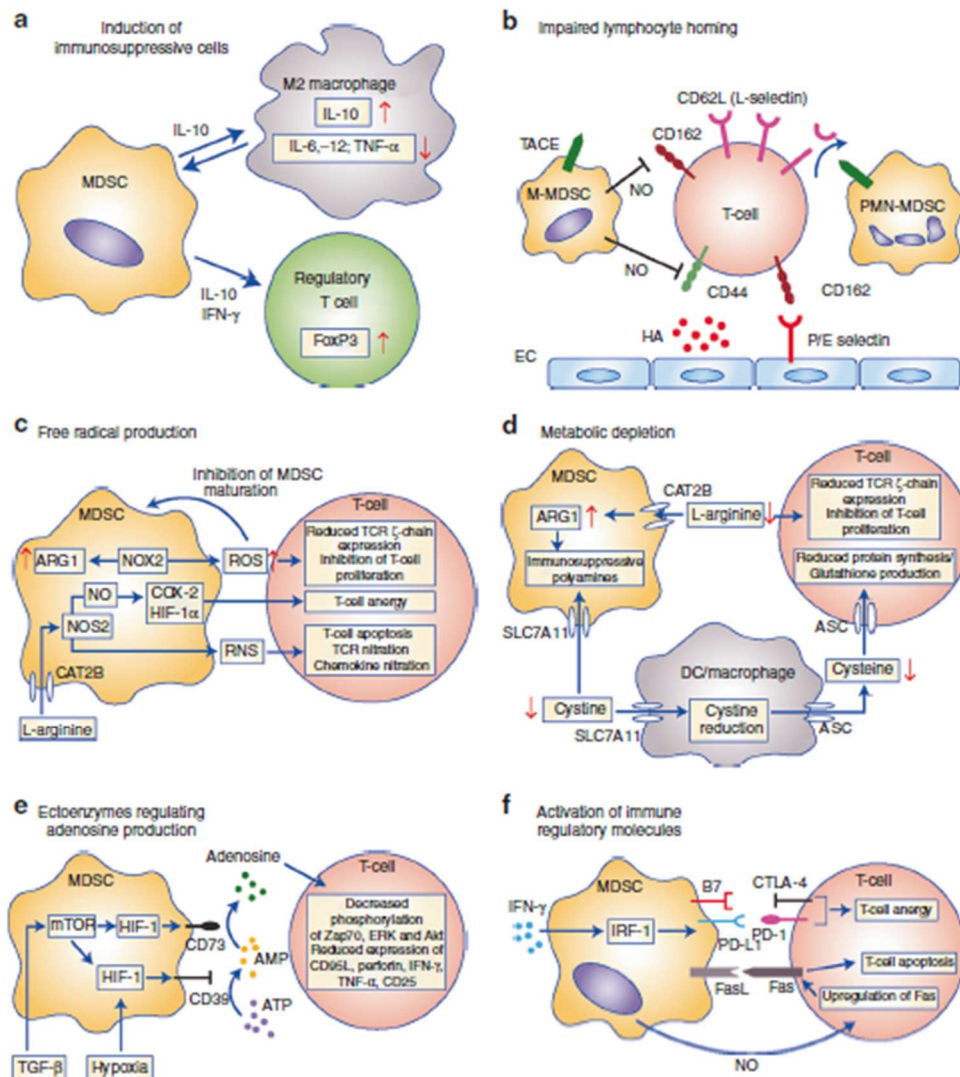


Figura 2. Funções imunossupressoras mediadas pelas MDSCs (retirado de GROTH et al. 2019).

Dentre a ampla gama de mecanismos imunossupressores demonstrados em células humanas e modelos animais, as MDSCs são capazes de suprimir a

proliferação e inibir a ativação de linfócitos T efetores (BAUMANN et al., 2020; BIAN et al., 2018; RODRIGUEZ et al., 2004). Isso ocorre por meio da depleção de metabólitos essenciais como a arginina e o triptofano, através da atividade das enzimas arginase e IDO, além do sequestro da cistina, um precursor da cisteína, aminoácido necessário para a viabilidade dos linfócitos T (GROTH et al., 2019; RODRIGUEZ et al., 2004). Além disso, as MDSCs paralisam as atividades dos linfócitos T através da transferência do metabólito metilglioal, e da expressão de moléculas inibitórias como o *checkpoint* imune PD-L1 (BAUMANN et al., 2020; GROTH et al., 2019).

Ademais, as MDSCs liberam espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO), através da atividade das enzimas NADPH oxidase e óxido nítrico sintase induzível (iNOS), respectivamente (GROTH et al., 2019). As EROs podem se combinar com o NO e formar peroxinitritos (ONOO⁻), que causam a nitração de resíduos de tirosina na membrana de linfócitos T, induzindo a dissociação do complexo TCR-CD3 e prejudicando a interação física entre o TCR e CD8, o que resulta no impedimento da resposta antígeno-específica pelos linfócitos (NAGARAJ et al., 2010).

Outro mecanismo utilizado pelas MDSCs é a produção da molécula imunossupressora adenosina, através da expressão das ectoenzimas CD39, responsável por metabolizar o ATP a AMP, e CD73, que converte o AMP em adenosina (GROTH et al., 2019). A adenosina, por sua vez, inibe a proliferação celular, a produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α , e a expressão de moléculas efetoras como perforina e Fas ligante de linfócitos T (HOSKIN et al., 2008). A redução da frequência de MDSCs CD39⁺CD73⁺ circulantes devido ao

tratamento com metformina aumentou a função pró-tumoral de linfócitos T, o que foi correlacionado com uma maior sobrevida de pacientes diabéticas com câncer de ovário (LI et al., 2018).

Apesar de sua principal atividade supressora ser sobre linfócitos T, as MDSCs ainda inibem as funções citotóxicas, a produção de citocinas e a transdução de sinal por células NK, o que é causado pelo menos em parte, pela liberação de NO (ELKABETS et al., 2010; STIFF et al., 2018). Além disso, as MDSCs são capazes de impedir a maturação de células dendríticas, promover a redução do *uptake* de antígenos, mudar o padrão de produção de citocinas destas células para um perfil anti-inflamatório, bloquear a habilidade de induzir linfócitos T produtores de IFN- γ , além de inibir a apresentação cruzada de antígenos (POSCHKE et al., 2012; UGOLINI et al., 2020).

Ainda, estudos demonstram que as MDSCs promovem a expansão e o recrutamento de outras populações regulatórias ou anti-inflamatórias. As MDSCs induzem linfócitos T regulatórios em um mecanismo dependente de IL-10 e IFN- γ , além de aumentar seu recrutamento possivelmente através de quimiocinas como CCL5 (HUANG et al., 2006; SCHLECKER et al., 2012). Além disso, a produção de IL-10 por estas células também promove a mudança do perfil de macrófagos para M2-*like*, caracterizado por funções anti-inflamatórias (BEURY et al., 2014).

Por fim, além de proteger o tumor da ação do sistema imune, as MDSCs favorecem a progressão do câncer de diferentes maneiras. Estas células produzem fatores de crescimento como bFGF e VEGF, além da metaloproteinase de matriz 9 (MMP9), importantes mediadores da remodelação tecidual necessária para a invasão e estabelecimento de células tumorais (LECHNER; LIEBERTZ; EPSTEIN, 2010;

TARTOUR et al., 2011; YAN et al., 2010). As MDSCs estão associadas à formação do nicho pré-metastático, e através da produção de MMP9, promovem a remodelação do microambiente vascular por meio da degradação da matriz extracelular e indução de capilarização aberrante, ao passo que a depleção de MMP9 diminui a formação de metástase (YAN et al., 2010). Por último, as MDSCs são capazes de induzir um fenótipo similar a células-tronco em células tumorais, contribuindo para a transição epitélio mesenquimal (EMT do inglês *epithelial-to-mesenchymal transition*), fenômeno importante para a invasão do tecido pelo câncer (CUI et al., 2013; TOH et al., 2011). Isso ocorre através da indução da expressão de genes associados a EMT, e da produção de moléculas como TGF- β , EGF e HGF pelas MDSCs, o que é concomitante com um aumento na incidência de tumor e metástase (CUI et al., 2013; TOH et al., 2011).

1.2.1.1. MDSCs na Leucemia Mieloide Aguda

Diversos trabalhos já relataram que a frequência de MDSCs está elevada em pacientes com LMA (PYZER et al., 2017; SUN et al., 2015; WANG et al., 2020). Pyzer e colaboradores demonstraram que o cultivo de blastos de pacientes com LMA juntamente com células mononucleares do sangue periférico (PBMC) induz a expansão de MDSCs CD11b⁺HLA-DR⁻, e que a proliferação promovida pela linhagem celular THP-1 é dependente da indução da expressão de c-myc pela oncoproteína MUC1 presente nas vesículas extracelulares derivadas das células neoplásicas (PYZER et al., 2017).

Além disso, a frequência elevada de blastos MDSCs-like CD11b⁺CD33⁺HLA-DR⁻ na medula óssea foi relatada como um fator preditivo de menor sobrevida em

pacientes com LMA (HYUN et al., 2020). Em concordância com isso, Wang e colaboradores reportaram que a frequência de M-MDSCs CD45⁺CD14⁺HLA-DR⁻ circulantes no momento do diagnóstico estava aumentada em pacientes que não atingiram remissão completa, e estava associada a uma menor sobrevida (WANG et al., 2020). Uma análise multivariada confirmou o valor prognóstico independente dos níveis de M-MDSCs CD45⁺CD14⁺HLA-DR^{-low} no sangue periférico de pacientes com LMA, que predizem uma menor sobrevida. Entretanto, os mesmos autores relataram que pacientes que tiveram uma diminuição na frequência de M-MDSCs após a terapia de indução apresentaram menor sobrevida em comparação aos pacientes que tiveram um aumento destas células (PETERLIN et al., 2022). Por outro lado, em pacientes que atingem remissão completa, o número de MDSCs CD33⁺CD11b⁺HLA-DR^{-low} diminui significativamente após o tratamento, o que não é observado naqueles com remissão parcial ou que não atingem a remissão (SUN et al., 2015).

Os trabalhos avaliando MDSCs em pacientes com LMA focaram majoritariamente em fenótipos generalistas de células mieloides ou fenótipos associados com M-MDSCs, resultando em uma lacuna de dados sobre o valor prognóstico e potenciais marcadores de PMN-MDSCs na LMA. Além disso, posto que a LMA é uma forte candidata para abordagens que incluam imunoterapias, e que apresenta diversos mecanismos de evasão imune que podem prejudicar o resultado deste tipo de tratamento, são necessários estudos que elucidem o perfil de células imunes em pacientes com LMA, bem como a associação destes componentes com o prognóstico desses pacientes (BARRETT, 2020; TETTAMANTI et al., 2022).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o valor preditivo da frequência de M-MDSCs, PMN-MDSCs e do enriquecimento de estágios maturativos de neutrófilos da medula óssea de pacientes com Leucemia Mieloide Aguda em relação a fatores prognósticos da doença.

2.2 Objetivos específicos

- I. Verificar as frequências de estágios maturativos de neutrófilos, de PMN-MDSCs e M-MDSCs na medula óssea do paciente com LMA e relacionar com a estratificação de risco, a resposta ao tratamento de indução e a presença ou ausência de alterações cariotípicas e da mutação *FLT3*-ITD.
- II. Avaliar o impacto do enriquecimento dos estágios maturativos de neutrófilos e dos níveis de PMN-MDSCs e M-MDSCs na sobrevida de pacientes com LMA.
- III. Avaliar a CD36 como potencial marcador de PMN-MDSCs em pacientes com LMA a partir de sua significância clínica.

PARTE II

PARTE III

4. DISCUSSÃO GERAL

A característica inata da LMA, sua policlonalidade, assim como suas funções adquiridas durante a tumorigênese devido ao surgimento de mutações impulsionado por pressões seletivas, a torna uma doença com forte caráter imunoevasivo (BARRETT, 2020). Além disso, o conhecimento de que o transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas tem capacidade de controlar a progressão da LMA, aumentar a sobrevida e reduzir a taxa de recidiva através do efeito do enxerto contra leucemia, encoraja o uso de abordagens imunoterapêuticas na LMA (BARRETT, 2020; CORNELISSEN et al., 2012; KAYSER et al., 2020). Nesse contexto, o uso de anticorpos monoclonais como o gentuzumabe ozogamicina, um anticorpo anti-CD33 conjugado com fármacos já foi aprovado, e outras alternativas como anticorpos biespecíficos e inibidores de *checkpoints* estão em fase de testes (ISIDORI et al., 2021). Assim, o papel dos componentes imunes do microambiente neoplásico da LMA vem sendo estudado nos últimos anos como uma tentativa de criar novas imunoterapias para a doença (TETTAMANTI et al., 2022).

Assim, posto que as MDSCs são reconhecidamente um elemento central para a evasão imune tumoral, neste trabalho, buscamos elucidar o potencial valor prognóstico destas células em pacientes com LMA (LI et al., 2021). Entretanto, a falta de definição de um fenótipo padrão para caracterizar MDSCs e de informações sobre seu estágio maturativo é um grande empecilho para a realização de estudos como estes (BRONTE et al., 2016). Assim, avaliamos o enriquecimento dos estágios de maturação dos neutrófilos dos pacientes com LMA, utilizando os marcadores CD11b e CD16, com o intuito de encontrar possíveis diferenças na frequência de algum dos

compartimentos maturativos entre pacientes estratificados de acordo com fatores prognósticos. A significância clínica do aumento da frequência de um dos compartimento em pacientes que possuem um prognóstico ruim, pode indicar a expansão de MDSCs, uma vez que vários trabalhos já relataram o aumento dessas células em pacientes com menor taxa de remissão e pior sobrevida na LMA e em outros tipos de câncer (HYUN et al., 2020; WANG et al., 2020; ZHANG et al., 2016).

De acordo com a teoria da hematopoiese de emergência, primeiramente descrita para a origem das MDSCs, estas células surgem a partir de alterações na mielopoiese causadas por condições de inflamação crônica presentes em patologias como o câncer (LI et al., 2021; VEGLIA; PEREGO; GABRILOVICH, 2018). Em condições fisiológicas, o dano tecidual ou infecções induzem sinais como ligantes de TLR (*Toll-like receptor*), padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs - *pathogen-associated molecular patterns*) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs - *damage-associated molecular patterns*), os quais mobilizam rapidamente as células mieloides da medula óssea. Isso resulta na ativação clássica de monócitos e granulócitos, que tem curta duração e termina com a eliminação do patógeno ou ameaça (LI et al., 2021). Entretanto, na inflamação não-resolvida presente nas condições do câncer, os sinais de ativação da hematopoiese são relativamente fracos, porém com uma longa duração (VEGLIA; PEREGO; GABRILOVICH, 2018). Os mediadores da expansão e ativação patológica dos precursores mieloides são comumente classificados em dois grupos: o primeiro grupo consiste principalmente de fatores de crescimento produzidos pelas células cancerosas e pelo estroma da medula óssea como GM-CSF, G-CSF, M-CSF, S-SCF, VEGF, e é responsável pela proliferação das células mieloides imaturas; o segundo grupo de mediadores é responsável pela conversão das células mieloides imaturas em MDSCs no tumor, ou

sua ativação patológica, e é composto principalmente por citocinas como IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-13, TNF- α , TGF β , e outros fatores solúveis como prostaglandina E2 (PGE2), HMBG1, S100A8 e S100A9 (LI et al., 2021; VEGLIA; PEREGO; GABRILOVICH, 2018). Essa teoria sustenta que as MDSCs são células imaturas que surgem logo no início da diferenciação de células mieloides (Figura 3).

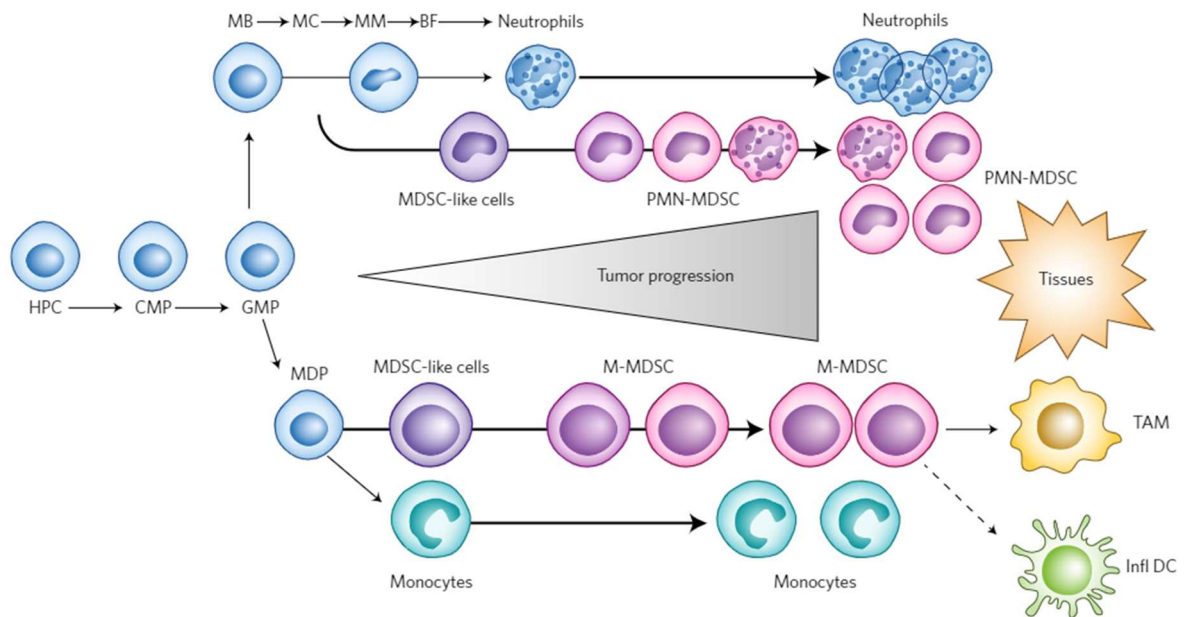


Figura 3. Diferenciação e acúmulo de MDSCs de acordo com o modelo da hematopoiese de emergência. (Retirado de VEGLIA et al. 2018).

De acordo com esse modelo, Brandau e colaboradores relataram que a porcentagem de PMN-MDSCs $SSC^{high}CD66b^{+}$ com características de granulócitos imaturos está elevada no sangue periférico de pacientes com diversos tipos de tumores sólidos em comparação a indivíduos saudáveis (BRANDAU et al., 2011). A partir da observação da morfologia nuclear dessas células, os autores as descreveram como uma população em diferentes estágios de diferenciação de neutrófilos imaturos, variando de células com morfologia mielocítica, metamielocítica

e de banda. Além disso, as PMN-MDSCs apresentaram menor nível de apoptose e menor capacidade migratória em resposta ao meio condicionado de células tumorais quando em comparação a neutrófilos clássicos dos mesmos doadores. Esses resultados indicam que estas células possuem um perfil imaturo, uma vez que neutrófilos clássicos entram em apoptose logo após a maturação e são as primeiras a migrar em resposta a estímulos inflamatórios (BRANDAU et al., 2011; GEERING; SIMON, 2011; KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Entretanto, o mesmo trabalho demonstrou que os pacientes possuíam níveis variáveis de populações CD11b⁻CD16⁻, CD11b⁺CD16⁻ e CD11b⁺CD16⁺ (BRANDAU et al., 2011).

Em concordância, a análise morfológica de PMN-MDSCs SSC^{high}CD33⁺CD11b⁺CD14⁻CD64⁻CD15⁺ também revelou uma mistura heterogênea de populações com morfologias mielocítica e do tipo banda, porém com predominância de células polimorfonucleares, característica de neutrófilos maduros. É interessante salientar, entretanto, que a análise de células CD15⁺ de baixa densidade de PBMCs de indivíduos saudáveis, pacientes com câncer de mama, melanoma e sepse, demonstrou que os pacientes com câncer possuíam uma subpopulação única caracterizada pela downregulação dos marcadores associados a maturidade de neutrófilos CD45, CD13 e CD10 (MEHMETI-AJRADINI et al., 2020).

Nós observamos que pacientes que atingiram remissão completa possuem menor porcentagem de neutrófilos imaturos CD11b⁻CD16⁻ em comparação a neutrófilos maduros CD11b⁺CD16⁺. Esse resultado está em concordância com os trabalhos que caracterizam PMN-MDSCs como uma população imatura, pois a menor frequência de neutrófilos imaturos parece ser favorável para a resposta ao tratamento. Notavelmente, a alta frequência de neutrófilos imaturos CD15⁺CD244⁻CD16^{low} estava

associada com menor sobrevida geral e sobrevida livre de progressão em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas tratados com inibidores de *checkpoint* imune (MEZQUITA et al., 2021). Entretanto, apesar desta subpopulação possuir certo grau de imaturidade (CD16^{low}), ela não inclui células com o fenótipo ainda mais imaturo CD11b⁻CD16⁻, e tanto quanto sabemos, não existem outros trabalhos associando MDSCs deste compartimento a um pior prognóstico em pacientes com câncer.

Contudo, em contrapartida ao conceito de que a população de MDSCs seria composta primariamente de células imaturas estabelecido pelo modelo de hematopoiese de emergência, alguns pesquisadores sustentam a teoria de que as MDSCs surgem a partir da reprogramação ou ativação alternativa de monócitos e neutrófilos já maduros, que assumem então um perfil imunossupressor (MILLRUD; BERGENFELZ; LEANDERSSON, 2017; PILLAY et al., 2013).

De acordo, Marini e colaboradores demonstraram que a população de PMN-MDSCs CD66b⁺CD33^{dim}HLA-DR⁻ de pacientes com linfoma é majoritariamente composta de células maduras CD11b⁺CD16⁺, apesar dos outros subsets CD11b⁻CD16⁻ e CD11b⁺CD16⁻ também estarem presentes (MARINI et al., 2016). Além disso, a expressão aumentada de CD11b em comparação aos neutrófilos CD11b⁺CD16⁺ de densidade alta dos mesmos doadores ou de doadores saudáveis sugere um estado de ativação nas PMN-MDSCs. Os autores demonstraram que estas células possuem o efeito supressor sobre a proliferação de linfócitos T, característica funcional necessária para confirmar que o fenótipo em questão se trata de PMN-MDSCs. Ainda, os pacientes com altos níveis de PMN-MDSCs CD66b⁺CD33^{dim}HLA-DR⁻

apresentaram menor sobrevida, apesar dos autores não terem encontrado associação de nenhum dos compartimentos de maturação com fatores prognósticos.

Na mesma linha, PMN-MDSCs CD14⁻CD66b⁺CD33^{dim}HLA-DR^{-/low} de pacientes com câncer de cabeça e pescoço são compostas de células CD11b⁻CD16⁻, CD11b⁺CD16⁻ e CD11b⁺CD16⁺, o que foi confirmado pela análise da morfologia nuclear. Das três subpopulações, apenas a população madura estava associada a uma pior sobrevida nos pacientes, além de ser a subpopulação com maior capacidade imunossupressora (LANG et al., 2018). Entretanto, o mesmo trabalho relatou que a infiltração de células CD15⁺MPO⁻ com uma morfologia imatura do tipo blasto no tumor estava associada com o marcador de MDSCs S100A9, e demonstrou uma tendência de correlação com menor sobrevida livre de recidiva em uma coorte de câncer de mama. O mesmo foi observado em um estudo com pacientes com mieloma múltiplo, que demonstrou que as PMN-MDSCs destes pacientes se encontram no compartimento maduro CD11b⁺CD13⁺CD16⁺ baseado na significância clínica destas células, que estavam associadas com menor sobrevida livre de progressão, além de possuírem a atividade imunossupressora mais forte quando comparado às células intermediárias ou imaturas (PEREZ et al., 2020).

Um estudo muito interessante de Sagiv e colaboradores analisou as características de neutrófilos de alta densidade (HDN do inglês *high density neutrophils*) e neutrófilos de baixa densidade (LDN do inglês *low density neutrophils*) do sangue periférico de pacientes com câncer de mama e de pulmão, baseado no conhecimento de que as MDSCs co-purificam com as células de baixa densidade na centrifugação por gradiente de densidade (BRONTE et al., 2016). Os LDNs CD66b⁺ dos pacientes estavam aumentados em comparação a indivíduos saudáveis, além de

apresentarem maior expressão de CD11b e CD66b em comparação aos HDNs (neutrófilos clássicos) dos mesmos pacientes, sugerindo um fenótipo ativado (SAGIV et al., 2015). Ainda, os LDNs dos pacientes consistem de células heterogêneas com morfologia imatura e madura, ao passo que as HDNs dos mesmos pacientes possuem uma morfologia homogênea madura. Curiosamente, no mesmo trabalho, através do rastreamento de HDNs e LDNs marcados em camundongos, os autores observaram que os LDNs deixam a medula óssea rapidamente, enquanto os HDNs necessitam de 24 horas adicionais para maturar e deixar a medula. Ainda, os HDNs são capazes de mudar para a fração dos LDNs, sugerindo que os LDNs consistem de PMN-MDSCs imaturas que deixam a medula óssea precocemente, além de neutrófilos já maduros presentes na fração de alta densidade que mudam para a fração de baixa densidade ao longo do tempo. De fato, os LDNs apresentaram menor atividade antitumoral e maior atividade imunossupressora, consistente com o perfil de MDSCs. Ainda, a transição de HDNs à LDNs é observada apenas em camundongos com tumores em estágios avançados, demonstrando que esta mudança é provavelmente mediada por uma longa exposição a citocinas e quimiocinas do microambiente tumoral.

Os trabalhos que caracterizam as PMN-MDSCs como células maduras estão de acordo com nosso resultado de que pacientes com LMA que apresentam baixa razão de células $CD11b^+CD16^-/CD11b^+CD16^+$ possuem menor sobrevida geral. É importante salientar que a exclusão de pacientes com APL resultou em perda de significância da análise, possivelmente devido à redução do número amostral ou ao bom prognóstico comum à APL (WANG; CHEN, 2008). Contudo, o dado de sobrevida entra em conflito com a observação de que pacientes que atingem remissão completa possuem menor frequência de neutrófilos imaturos, posto que isso indica um possível

impacto negativo das células duplo-negativas para a resposta ao tratamento, um efeito já observado para M-MDSCs em pacientes com LMA (WANG et al., 2020).

Dessa forma, as PMN-MDSCs parecem ser, na verdade, uma população altamente heterogênea com células em diferentes estágios maturativos caracterizados pela expressão de diferentes marcadores, além de potencialmente apresentarem um estado de ativação específico (VEGLIA et al., 2021). Entretanto, apenas PMN-MDSCs com fenótipo maduro impactaram negativamente na sobrevida de pacientes com câncer, em concordância com nosso trabalho (LANG et al., 2018; PEREZ et al., 2020). Além disso, apesar de haver trabalhos relatando o impacto prognóstico de fatores como a razão de neutrófilos sobre linfócitos na LMA, a literatura carece de dados sobre a influência de diferentes estágios maturativos de neutrófilos na progressão desta doença (ZHANG et al., 2021). Assim, estudos prospectivos com maior número amostral são necessários para avaliar o impacto destas subpopulações no prognóstico de pacientes com LMA, bem como para definir a expressão dos marcadores de maturidade de PMN-MDSCs no contexto dessa doença.

Na tentativa de encontrar marcadores que diferenciam PMN-MDSCs de suas células análogas, Al-Khami e colaboradores demonstraram que a CD36 está upregulada em PMN-MDSCs do tumor de pacientes com adenocarcinoma de colo e carcinoma de células renais, quando em comparação aos neutrófilos clássicos dos mesmos pacientes ou de indivíduos saudáveis (AL-KHAMI et al., 2017). A CD36 é uma glicoproteína transmembrana com função de translocase de ácidos graxos, e no câncer, exerce uma função pró-tumoral induzindo o crescimento do tumor, o surgimento de metástases e aumentando a resistência através da regulação do metabolismo de lipídios (RUAN; MENG; SONG, 2022; WANG; LI, 2019). Além disso,

ela é expressa por diversas células imunes como macrófagos, MDSCs, linfócitos T regulatórios e células apresentadoras de antígeno, participando da modulação da imunidade tumoral (RUAN; MENG; SONG, 2022; WANG; LI, 2019). Na LMA, a expressão de CD36 nos blastos está associada com menor sobrevida e maior risco de recidiva (PEREA et al., 2005). Além disso, blastos de LMA resistentes ao tratamento com citarabina upregulam CD36 e apresentam um perfil de alta oxidação de ácidos graxos e fosforilação oxidativa, o que está associado com uma pior resposta ao tratamento (FARGE et al., 2017). Ainda, o bloqueio de CD36 aumentou a citotoxicidade da citarabina em blastos de LMA *in vitro* e em um modelo animal (ZHANG et al., 2022).

A expressão de CD36 em PMN-MDSCs é induzida por fatores solúveis do microambiente tumoral como G-CSF, GM-CSF e IL-6, aumentando a captação e o acúmulo de lipídios e o metabolismo oxidativo. Isso ocorre em paralelo com um aumento da expressão das enzimas arginase e iNOS e da capacidade de supressão da proliferação de linfócitos T (AL-KHAMI et al., 2017). No presente trabalho, observamos que a frequência de PMN-MDSCs CD45⁺CD33^{low}HLA-DR⁻CD36⁺ está elevada em pacientes com LMA de risco adverso quando comparado ao grupo de risco intermediário. Entretanto, a análise não atingiu significância estatística em comparação aos pacientes de risco favorável, o que acreditamos que seja devido ao pequeno número amostral deste grupo (n=7). O mesmo ocorre quando retiramos os pacientes com APL da análise, possivelmente devido ao mesmo efeito de redução do tamanho amostral. Entretanto, considerando que MDSCs estão associadas a um pior prognóstico, o resultado da análise de toda a coorte de LMA indica a CD36 como um potencial marcador de PMN-MDSCs no contexto da LMA, dada a sua relevância

clínica e caracterização imunofenotípica em outros tipos de câncer (AL-KHAMI et al., 2017; ZHANG et al., 2016).

O aumento do efeito antitumoral promovido pelo nocaute de CD36 em modelos animais de câncer de colo e carcinoma de pulmão é dependente de linfócitos T (AL-KHAMI et al., 2017). De fato, é amplamente conhecido que o efeito imunossupressor das MDSCs é majoritariamente exercido sobre estas células (GROTH et al., 2019). Corroborando com a frequência de PMN-MDSCs, demonstramos que a razão PMN-MDSCs/linfócitos T está aumentada em pacientes do grupo de risco adverso, desta vez em comparação ao grupo de risco intermediário e favorável, na análise da coorte completa. Apesar da elevada razão PMN-MDSCs/linfócitos T em pacientes do risco adverso não representar uma relação de causalidade, posto que a estratificação de risco é definida primariamente no momento do diagnóstico do paciente, é possível que as PMN-MDSCs estejam exercendo funções pró-tumorais já no início do desenvolvimento da LMA, como já relatado em outros modelos de câncer (MEHMETI-AJRADINI et al., 2020; VEGLIA et al., 2021). Além disso, as PMN-MDSCs induzem a disfunção de linfócitos T de diversas maneiras, dentre elas a liberação de espécies reativas de oxigênio, peroxinitritos e produção de fatores como PGE2 e arginase (VEGLIA; SANSEVIERO; GABRILOVICH, 2021). Em concordância com isso, estudos relatam uma associação entre a disfunção de linfócitos T e falha na resposta ao tratamento e menor sobrevida na LMA (KONG et al., 2016; TANG et al., 2020). Coincidentemente, pacientes com LMA do grupo de risco adverso demonstraram maior porcentagem de linfócitos T CD8⁺ senescentes (TANG et al., 2020).

Assim, posto que o CD36 está envolvido na malignidade da LMA e associado com um pior prognóstico nos pacientes com essa doença, nossos resultados

incentivam futuros trabalhos buscando estratégias imunoterapêuticas que tenham como alvo a CD36 de células PMN-MDSCs (FARGE et al., 2017; PEREA et al., 2005; ZHANG et al., 2022).

Em uma coorte de LMA, foi demonstrada a presença de blastos MDSC-*like* com o fenótipo CD45⁺CD11b⁺CD33⁺HLA-DR⁻ na medula óssea dos pacientes. Esta subpopulação expressava níveis elevados das enzimas arginase e iNOS, e foi capaz de diminuir a citotoxicidade de linfócitos T CD8⁺ sobre a linhagem celular de LMA NB4, bem como de suprimir a proliferação dos linfócitos T, quando em comparação aos blastos não MDSC-*like*. Esta população estava associada a estratificação de risco adversa dos pacientes, e era composta por uma maioria de células CD14⁺. De acordo, nós relatamos uma maior frequência de M-MDSCs CD45⁺CD14⁺HLA-DR⁻, bem como uma maior razão M-MDSCs/linfócitos T no grupo de risco adverso na análise de toda nossa coorte. A estratificação de risco dos pacientes com LMA é definida principalmente por características citogenéticas (DÖHNER et al., 2017). Curiosamente, Pyzer e colaboradores observaram que em alguns pacientes com LMA, as MDSCs possuem uma origem em comum com os blastos, pois apresentam as mesmas anomalias citogenéticas presentes nos clones (PYZER et al., 2017).

Em tempo, as M-MDSCs utilizam mecanismos como liberação de NO e citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β , além da expressão de moléculas inibitórias como PD-L1 para induzir a apoptose e disfunção de linfócitos T (VEGLIA; SANSEVIERO; GABRILOVICH, 2021). A depleção de M-MDSCs de PBMCs de pacientes com LMA previamente ao tratamento com o anticorpo biespecífico anti-CD33 (*BiTe - Bispecific T-cell engaging antibody*) AMG 330 aumentou a lise dos blastos mediada pelo anticorpo *in vitro* (JITSCHIN et al., 2018). Além disso, apesar

de na nossa coorte não termos encontrado significância estatística na diferença de sobrevida entre pacientes com alta e baixa frequência de M-MDSCs, Peterlin e colaboradores demonstraram que a alta porcentagem de M-MDSCs CD45⁺CD33⁺CD11b⁺CD14⁺HLA-DR^{-low} no sangue periférico de pacientes com LMA no momento do diagnóstico é um fator preditivo independente para menor sobrevida (PETERLIN et al., 2022). Ainda, pacientes com baixa frequência destas células apresentaram menor taxa de recidiva após atingir remissão (PETERLIN et al., 2022). Possivelmente, não encontramos diferença estatística na análise de sobrevida devido ao baixo número amostral e ao pouco tempo de acompanhamento. Contudo, em conjunto, estes dados encorajam o desenvolvimento de terapias para LMA que tenham como alvo as M-MDSCs.

Além disso, nossos resultados demonstraram um aumento da porcentagem de M-MDSCs e da razão M-MDSCs/linfócitos T em pacientes com a mutação *FLT3*-ITD. O *FLT3* é um receptor tirosina quinase ativado através da dimerização e transfosforilação induzida por ligantes, o que resulta na proliferação celular (KIYOI; KAWASHIMA; ISHIKAWA, 2020). Na mutação *FLT3*-ITD, o domínio justamembrana possui duplicações internas em tandem (ITD do inglês *internal tandem duplications*) que resultam em uma ativação constitutiva da função tirosina quinase, levando proliferação descontrolada dos blastos de LMA (ZHAO et al., 2022). Na LMA, a mutação *FLT3*-ITD ocorre em aproximadamente 20% dos pacientes, e é um fator preditivo independente para pior sobrevida (KIYOI; KAWASHIMA; ISHIKAWA, 2020). Por isso, ela é utilizada para definir o prognóstico dos pacientes, além de ser um alvo de terapias em desenvolvimento na LMA (DÖHNER et al., 2017; KIYOI; KAWASHIMA; ISHIKAWA, 2020; ZHAO et al., 2022). Nesse contexto, resultados promissores de Chen e colaboradores demonstraram que pacientes com

oligometástases de vários tipos de câncer tratados com Sunitinibe, um inibidor de tirosina quinase multi-alvos contra VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR, c-kit, FLT3, e RET, apresentaram uma redução da frequência de M-MDSCs e seus níveis de arginase, concomitantemente com um aumento da proliferação de linfócitos T, o que foi correlacionado com uma diminuição de linfócitos T regulatórios em pacientes responsivos (CHEN et al., 2015). Assim, estes dados incentivam futuros estudos para elucidar o efeito de inibidores de FLT3 nas MDSCs de pacientes com LMA.

Mesmo os modelos incorporando características demográficas, clínicas, variações na resposta ao tratamento e alterações citogenéticas como fatores preditivos para a sobrevida dos pacientes com LMA, possuem uma probabilidade de acerto de 75 a 80% (DÖHNER et al., 2017). Assim, dada a significância clínica de M-MDSCs e PMN-MDSCs na LMA constatada neste trabalho, nossos resultados estimulam futuros trabalhos que busquem confirmar o potencial prognóstico destas células. Para isso, é necessário que se defina o *cut-off* da frequência destas células nos pacientes para definir um valor prognóstico. Na LMA, Wang e colaboradores observaram uma frequência média de 4,21% para M-MDSCs em PBMCs dos pacientes, ao passo que outra coorte apresentou uma mediana de 0,19% de M-MDSCs em células nucleadas CD45⁺⁺ do sangue periférico (PETERLIN et al., 2022; WANG et al., 2020). Jitschin e coautores relataram uma porcentagem média de 28,98% de M-MDSCs dentre os monócitos CD14⁺ de pacientes com LMA (JITSCHIN et al., 2018). Além disso, a contagem absoluta de M-MDSCs por 10⁹/mL de PBMCs foi de 0,4687 em uma coorte de 30 pacientes com a mesma doença (WANG et al., 2018). Como podemos observar, não há padronização nos relatos dos níveis destas células na LMA, o que dificulta a definição de um ponto de corte para a possível estratificação dos pacientes na prática clínica. Considerando a exclusão dos blastos

da análise, nós encontramos uma frequência média de 1,090% M-MDSCs na medula óssea dos pacientes de toda a nossa coorte, enquanto a remoção dos pacientes com APL resultou em uma média de 1,390%. Para as PMN-MDSCs, a porcentagem média foi de 0,6723% para todos os pacientes, e de 0,8228% após a exclusão dos pacientes com APL. Apesar de alguns trabalhos demonstrarem a expressão do marcador característico das PMN-MDSCs CD15 na população geral de MDSCs nos pacientes com LMA, não há relatos da frequência exata destas células nesta doença, o que também ressalta a falta da definição de um imunofenótipo padrão para estas células (HYUN et al., 2020; PYZER et al., 2017). Notavelmente, nossos resultados demonstram que nos pacientes com LMA, há uma maior expansão de M-MDSCs em relação às PMN-MDSCs, entretanto, em um trabalho com pacientes com diversos tipos de tumores sólidos, foi demonstrado que a frequência de PMN-MDSCs supera a de M-MDSCs no câncer (CASSETTA et al., 2020). Assim, mais estudos são necessários para estimar a frequência média de MDSCs na medula óssea e no sangue periférico de pacientes com LMA, buscando uma padronização na reportagem destes dados.

5. CONCLUSÃO

A caracterização da imunobiologia da LMA, assim como a definição da influência dos componentes imunes no desenvolvimento e prognóstico da doença é de suma importância para melhorar a sobrevida dos pacientes. Neste trabalho, indicamos que a baixa razão de células $CD11b^-CD16^-/CD11b^+CD16^+$ impacta negativamente na sobrevida de pacientes com LMA. Ainda, ressaltamos a CD36

como um potencial marcador de PMN-MDSCs na LMA, além de apontarmos M-MDSCs e PMN-MDSCs como fatores prognósticos negativos a serem considerados nesta doença, apesar da necessidade de estudos prospectivos com maior número amostral para confirmar estes dados. Ademais, nosso estudo retrospectivo possui outras limitações devido à sua natureza, como a impossibilidade de avaliar os fenótipos ideais das subpopulações de MDSCs, e a falta de dados completos para alguns pacientes. O último fator reduziu nosso poder estatístico em algumas análises, o que também pode estar influenciando os testes estatísticos excluindo os pacientes com APL. Dessa forma, se fazem necessários estudos com maior amostragem para ambos os grupos, e idealmente, que permitam caracterizar a coorte de acordo com as recomendações da OMS, algo que ainda é inviável em diversos países em desenvolvimento devido aos altos custos dos testes genéticos necessários. Ainda assim, nossos resultados sugerem fortemente a realização de trabalhos para confirmar o potencial prognóstico de MDSCs em pacientes com LMA, bem como para o desenvolvimento de imunoterapias que contemplem estas células como alvo no futuro.

6. PERSPECTIVAS

Como perspectivas, pretendemos aumentar o número amostral do nosso estudo, para que tenhamos maior poder estatístico e possamos concluir com mais confiança os resultados, assim como estratificar os pacientes por idade e analisar a coorte de pacientes com APL separadamente devido a sua distinta natureza clínica.

Além disso, planejamos acrescentar uma análise univariada e multivariada para confirmar o potencial prognóstico das MDSCs.

Ainda, realizaremos um estudo prospectivo, avaliando a frequência de MDSCs na medula óssea e no sangue periférico de pacientes com LMA, seu impacto prognóstico e seus mecanismos de imunossupressão.

7. REFERÊNCIAS

AL-KHAMI, A. A. et al. Exogenous lipid uptake induces metabolic and functional reprogramming of tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. **Oncoimmunology**, v. 6, n. 10, p. e1344804, 30 Jun. 2017.

AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022. **Key Statistics for Acute Myeloid Leukemia (AML)**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/about/key-statistics.html#:~:text=About%2060%2C650%20new%20cases%20of,About%2011%2C540%20deaths%20from%20AML>>. Acesso em: 30 out. 2022.

ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391–2405, 19 May 2016.

BARRETT, A. J. Acute myeloid leukaemia and the immune system: implications for immunotherapy. **British Journal of Haematology**, v. 188, n. 1, p. 147–158, Jan. 2020.

BAUMANN, T. et al. Regulatory myeloid cells paralyze T cells through cell-cell transfer of the metabolite methylglyoxal. **Nature Immunology**, v. 21, n. 5, p. 555–566, May 2020.

BENNETT, J. M. et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. **British Journal of Haematology**, v. 33, n. 4, p. 451–458, Aug. 1976.

BERGENFELZ, C.; LEANDERSSON, K. The Generation and Identity of Human

Myeloid-Derived Suppressor Cells. **Frontiers in oncology**, v. 10, p. 109, 7 Feb. 2020.

BEURY, D. W. et al. Cross-talk among myeloid-derived suppressor cells, macrophages, and tumor cells impacts the inflammatory milieu of solid tumors. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 96, n. 6, p. 1109–1118, Dec. 2014.

BIAN, Z. et al. Arginase-1 is neither constitutively expressed in nor required for myeloid-derived suppressor cell-mediated inhibition of T-cell proliferation. **European Journal of Immunology**, v. 48, n. 6, p. 1046–1058, Jun. 2018.

BOSE, P.; VACHHANI, P.; CORTES, J. E. Treatment of relapsed/refractory acute myeloid leukemia. **Current treatment options in oncology**, v. 18, n. 3, p. 17, Mar. 2017.

BRANDAU, S. et al. Myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of cancer patients contain a subset of immature neutrophils with impaired migratory properties. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, n. 2, p. 311–317, Feb. 2011.

BRONTE, V. et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. **Nature Communications**, v. 7, p. 12150, 6 Jul. 2016.

BÜCHNER, T. et al. Acute Myeloid Leukemia (AML): different treatment strategies versus a common standard arm--combined prospective analysis by the German AML Intergroup. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 29, p. 3604–3610, 10 Oct. 2012.

BURNETT, A. K. et al. A comparison of low-dose cytarabine and hydroxyurea with or without all-trans retinoic acid for acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome in patients not considered fit for intensive treatment. **Cancer**, v. 109, n. 6, p. 1114–1124, 15 Mar. 2007.

CASSETTA, L. et al. Differential expansion of circulating human MDSC subsets in patients with cancer, infection and inflammation. **Journal for immunotherapy of cancer**, v. 8, n. 2, Sep. 2020.

CHEN, H.-M. et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells as an Immune Parameter in Patients with Concurrent Sunitinib and Stereotactic Body Radiotherapy. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 18, p. 4073–4085, 15 Sep. 2015.

CHRISTOPHER, M. J. et al. Immune Escape of Relapsed AML Cells after Allogeneic Transplantation. **The New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 24, p. 2330–2341, 13 Dec. 2018.

CONDAMINE, T. et al. Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. **Science Immunology**, v. 1, n. 2, 5 Aug. 2016.

CORNELISSEN, J. J. et al. Comparative analysis of the value of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in acute myeloid leukemia with monosomal karyotype versus other cytogenetic risk categories. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 17, p. 2140–2146, 10 Jun. 2012.

CUI, T. X. et al. Myeloid-derived suppressor cells enhance stemness of cancer cells by inducing microRNA101 and suppressing the corepressor CtBP2. **Immunity**, v. 39, n. 3, p. 611–621, 19 Sep. 2013.

DE KOUCHKOVSKY, I.; ABDUL-HAY, M. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. **Blood cancer journal**, v. 6, n. 7, p. e441, 1 Jul. 2016.

DÖHNER, H. et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. **Blood**, v. 129, n. 4, p. 424–447,

26 Jan. 2017.

DOMBRET, H. et al. International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts. **Blood**, v. 126, n. 3, p. 291–299, 16 Jul. 2015.

ELKABETS, M. et al. IL-1 β regulates a novel myeloid-derived suppressor cell subset that impairs NK cell development and function. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 12, p. 3347–3357, Dec. 2010.

FARGE, T. et al. Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. **Cancer discovery**, v. 7, n. 7, p. 716–735, Jul. 2017.

FENAU, P. et al. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 4, p. 562–569, 1 Feb. 2010.

GEERING, B.; SIMON, H. U. Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. **Cell Death and Differentiation**, v. 18, n. 9, p. 1457–1469, Sep. 2011.

GROTH, C. et al. Immunosuppression mediated by myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) during tumour progression. **British Journal of Cancer**, v. 120, n. 1, p. 16–25, Jan. 2019.

HEGDE, S.; LEADER, A. M.; MERAD, M. MDSC: Markers, development, states, and unaddressed complexity. **Immunity**, v. 54, n. 5, p. 875–884, 11 May 2021.

HOSKIN, D. W. et al. Inhibition of T cell and natural killer cell function by adenosine and its contribution to immune evasion by tumor cells (Review). **International Journal of Oncology**, v. 32, n. 3, p. 527–535, Mar. 2008.

HUANG, B. et al. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. **Cancer Research**, v. 66, n. 2, p. 1123–1131, 15 Jan. 2006.

HYUN, S. Y. et al. Immunosuppressive role of CD11b+ CD33+ HLA-DR- myeloid-derived suppressor cells-like blast subpopulation in acute myeloid leukemia. **Cancer medicine**, v. 9, n. 19, p. 7007–7017, Oct. 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA — Português (Brasil). Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa>>. Acesso em: 30 out. 2022.

ISIDORI, A. et al. Immunotherapy in acute myeloid leukemia: where we stand. **Frontiers in oncology**, v. 11, p. 656218, 10 May 2021.

JIA, B. et al. Bone marrow CD8 T cells express high frequency of PD-1 and exhibit reduced anti-leukemia response in newly diagnosed AML patients. **Blood cancer journal**, v. 8, n. 3, p. 34, 21 Mar. 2018.

JITSCHIN, R. et al. CD33/CD3-bispecific T-cell engaging (BiTE®) antibody construct targets monocytic AML myeloid-derived suppressor cells. **Journal for immunotherapy of cancer**, v. 6, n. 1, p. 116, 5 Nov. 2018.

KAYSER, S. et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation improves outcome of adults with t(6;9) acute myeloid leukemia: results from an international collaborative study. **Haematologica**, v. 105, n. 1, p. 161–169, Jan. 2020.

KHWAJA, A. et al. Acute myeloid leukaemia. **Nature reviews. Disease primers**, v. 2, p. 16010, 10 Mar. 2016.

KIYOI, H.; KAWASHIMA, N.; ISHIKAWA, Y. FLT3 mutations in acute myeloid

leukemia: Therapeutic paradigm beyond inhibitor development. **Cancer Science**, v. 111, n. 2, p. 312–322, Feb. 2020.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews. Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–175, Mar. 2013.

KONG, Y. et al. T-Cell Immunoglobulin and ITIM Domain (TIGIT) Associates with CD8+ T-Cell Exhaustion and Poor Clinical Outcome in AML Patients. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 12, p. 3057–3066, 15 Jun. 2016.

LANG, S. et al. Clinical Relevance and Suppressive Capacity of Human Myeloid-Derived Suppressor Cell Subsets. **Clinical Cancer Research**, v. 24, n. 19, p. 4834–4844, 1 Oct. 2018.

LECHNER, M. G.; LIEBERTZ, D. J.; EPSTEIN, A. L. Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Immunology**, v. 185, n. 4, p. 2273–2284, 15 Aug. 2010.

LI, K. et al. Myeloid-derived suppressor cells as immunosuppressive regulators and therapeutic targets in cancer. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 6, n. 1, p. 362, 7 Oct. 2021.

LI, L. et al. Metformin-Induced Reduction of CD39 and CD73 Blocks Myeloid-Derived Suppressor Cell Activity in Patients with Ovarian Cancer. **Cancer Research**, v. 78, n. 7, p. 1779–1791, 1 Apr. 2018.

LO-COCO, F. et al. Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 2, p. 111–121, 11 Jul. 2013.

MARINI, O. et al. Identification of granulocytic myeloid-derived suppressor cells (G-MDSCs) in the peripheral blood of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma patients. **Oncotarget**, v. 7, n. 19, p. 27676–27688, 10 May 2016.

MEHMETI-AJRADINI, M. et al. Human G-MDSCs are neutrophils at distinct maturation stages promoting tumor growth in breast cancer. **Life Science Alliance**, v. 3, n. 11, Nov. 2020.

MEZQUITA, L. et al. Predicting immunotherapy outcomes under therapy in patients with advanced NSCLC using dNLR and its early dynamics. **European Journal of Cancer**, v. 151, p. 211–220, Jul. 2021.

MILLRUD, C. R.; BERGENFELZ, C.; LEANDERSSON, K. On the origin of myeloid-derived suppressor cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 2, p. 3649–3665, 10 Jan. 2017.

MUSOLINO, C. et al. Immature myeloid-derived suppressor cells: A bridge between inflammation and cancer (Review). **Oncology Reports**, v. 37, n. 2, p. 671–683, Feb. 2017.

NAGARAJ, S. et al. Mechanism of T cell tolerance induced by myeloid-derived suppressor cells. **Journal of Immunology**, v. 184, n. 6, p. 3106–3116, 15 Mar. 2010.

NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2022. **Acute Myeloid Leukemia — Cancer Stat Facts**. Disponível em: <<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>>. Acesso em: 30 out. 2022.

ORTIZ, M. L. et al. Immature myeloid cells directly contribute to skin tumor development by recruiting IL-17-producing CD4⁺ T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 212, n. 3, p. 351–367, 9 Mar. 2015.

PAPAEMMANUIL, E. et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid

leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 23, p. 2209–2221, 9 Jun. 2016.

PEREA, G. et al. Adverse prognostic impact of CD36 and CD2 expression in adult de novo acute myeloid leukemia patients. **Leukemia Research**, v. 29, n. 10, p. 1109–1116, Oct. 2005.

PEREZ, C. et al. Immunogenomic identification and characterization of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in multiple myeloma. **Blood**, v. 136, n. 2, p. 199–209, 9 Jul. 2020.

PETERLIN, P. et al. Peripheral levels of monocytic myeloid-derived suppressive cells before and after first induction predict relapse and survivals in AML patients. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 13 Oct. 2022.

PILLAY, J. et al. Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 20, p. 3813–3827, Oct. 2013.

PORT, M. et al. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication, nucleophosmin 1, and CEBPA gene mutations for acute myeloid leukemia patients with normal karyotype and younger than 60 years: a systematic review and meta-analysis. **Annals of Hematology**, v. 93, n. 8, p. 1279–1286, Aug. 2014.

POSCHKE, I. et al. Myeloid-derived suppressor cells impair the quality of dendritic cell vaccines. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 61, n. 6, p. 827–838, Jun. 2012.

PYZER, A. R. et al. MUC1-mediated induction of myeloid-derived suppressor cells in patients with acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 129, n. 13, p. 1791–1801, 30 Mar. 2017.

RODRIGUEZ, P. C. et al. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. **Cancer Research**, v. 64, n. 16, p. 5839–5849, 15 Aug. 2004.

ROWE, J. M. et al. Very Poor Survival of Patients with AML Who Relapse after Achieving a First Complete Remission: The Eastern Cooperative Oncology Group Experience. **Blood**, v. 106, n. 11, p. 546–546, 16 Nov. 2005.

RUAN, C.; MENG, Y.; SONG, H. CD36: an emerging therapeutic target for cancer and its molecular mechanisms. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 148, n. 7, p. 1551–1558, Jul. 2022.

SAGIV, J. Y. et al. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. **Cell reports**, v. 10, n. 4, p. 562–573, 3 Feb. 2015.

SANZ, M. A. et al. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. **Blood**, v. 113, n. 9, p. 1875–1891, 26 Feb. 2009.

SCHLECKER, E. et al. Tumor-infiltrating monocytic myeloid-derived suppressor cells mediate CCR5-dependent recruitment of regulatory T cells favoring tumor growth. **Journal of Immunology**, v. 189, n. 12, p. 5602–5611, 15 Dec. 2012.

SHENGHUI, Z. et al. Elevated frequencies of CD4⁺ CD25⁺ CD127^{lo} regulatory T cells is associated to poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. **International Journal of Cancer**, v. 129, n. 6, p. 1373–1381, 15 Sep. 2011.

STIFF, A. et al. Nitric Oxide Production by Myeloid-Derived Suppressor Cells Plays a Role in Impairing Fc Receptor-Mediated Natural Killer Cell Function. **Clinical Cancer Research**, v. 24, n. 8, p. 1891–1904, 15 Apr. 2018.

STRINGARIS, K. et al. Leukemia-induced phenotypic and functional defects in natural killer cells predict failure to achieve remission in acute myeloid leukemia. **Haematologica**, v. 99, n. 5, p. 836–847, May 2014.

SUN, H. et al. Increase in myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) associated with minimal residual disease (MRD) detection in adult acute myeloid leukemia. **International Journal of Hematology**, v. 102, n. 5, p. 579–586, Nov. 2015.

TANG, L. et al. Characterization of Immune Dysfunction and Identification of Prognostic Immune-Related Risk Factors in Acute Myeloid Leukemia. **Clinical Cancer Research**, v. 26, n. 7, p. 1763–1772, 1 Apr. 2020.

TARTOUR, E. et al. Angiogenesis and immunity: a bidirectional link potentially relevant for the monitoring of antiangiogenic therapy and the development of novel therapeutic combination with immunotherapy. **Cancer metastasis reviews**, v. 30, n. 1, p. 83–95, Mar. 2011.

TETTAMANTI, S. et al. Catch me if you can: how AML and its niche escape immunotherapy. **Leukemia**, v. 36, n. 1, p. 13–22, Jan. 2022.

TOH, B. et al. Mesenchymal transition and dissemination of cancer cells is driven by myeloid-derived suppressor cells infiltrating the primary tumor. **PLoS Biology**, v. 9, n. 9, p. e1001162, 27 Sep. 2011.

UGOLINI, A. et al. Polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells limit antigen cross-presentation by dendritic cells in cancer. **Journal of Clinical Investigation Insight**, v. 5, n. 15, 6 Aug. 2020.

VEGLIA, F.; PEREGO, M.; GABRILOVICH, D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. **Nature Immunology**, v. 19, n. 2, p. 108–119, Feb. 2018.

VEGLIA, F.; SANSEVIERO, E.; GABRILOVICH, D. I. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. **Nature Reviews. Immunology**, v. 21, n. 8, p. 485–498, Aug. 2021.

VEGLIA, F. et al. Analysis of classical neutrophils and polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients and tumor-bearing mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 218, n. 4, 5 Apr. 2021.

WANG, H. et al. Circulating Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Are Elevated and Associated with Poor Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. **Journal of immunology research**, v. 2020, p. 7363084, 21 Dec. 2020.

WANG, J.; LI, Y. CD36 tango in cancer: signaling pathways and functions. **Theranostics**, v. 9, n. 17, p. 4893–4908, 9 Jul. 2019.

WANG, L. et al. VISTA is highly expressed on MDSCs and mediates an inhibition of T cell response in patients with AML. **Oncoimmunology**, v. 7, n. 9, p. e1469594, 11 Jul. 2018.

WANG, Z.-Y.; CHEN, Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. **Blood**, v. 111, n. 5, p. 2505–2515, 1 Mar. 2008.

XIAO, W. et al. Loss of plasmacytoid dendritic cell differentiation is highly predictive for post-induction measurable residual disease and inferior outcomes in acute myeloid leukemia. **Haematologica**, v. 104, n. 7, p. 1378–1387, Jul. 2019.

YAN, H. H. et al. Gr-1+CD11b+ myeloid cells tip the balance of immune protection to tumor promotion in the premetastatic lung. **Cancer Research**, v. 70, n. 15, p. 6139–6149, 1 Aug. 2010.

YI, M. et al. The global burden and attributable risk factor analysis of acute myeloid

leukemia in 195 countries and territories from 1990 to 2017: estimates based on the global burden of disease study 2017. **Journal of hematology & oncology**, v. 13, n. 1, p. 72, 8 Jun. 2020.

ZHANG, Q. et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio correlates with prognosis and response to chemotherapy in patients with non-M3 de novo acute myeloid leukemia. **Translational cancer research**, v. 10, n. 2, p. 1013–1024, Feb. 2021.

ZHANG, S. et al. The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Patients with Solid Tumors: A Meta-Analysis. **Plos One**, v. 11, n. 10, p. e0164514, 25 Oct. 2016.

ZHANG, Y. et al. IL-6 promotes chemoresistance via upregulating CD36 mediated fatty acids uptake in acute myeloid leukemia. **Experimental Cell Research**, v. 415, n. 1, p. 113112, 1 Jun. 2022.

ZHAO, J. C. et al. A review of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. **Blood Reviews**, v. 52, p. 100905, Mar. 2022.

ANEXO I

Tabela 1. Fenótipos analisados no trabalho.

	Análise da maturação de neutrófilos			Análise das subpopulações de MDSCs	
	Neutrófilos imaturos	Neutrófilos intermediários	Neutrófilos maduros	PMN-MDSCs	M-MDSCs
Fenótipo	CD11b ⁻ CD16 ⁻	CD11b ⁺ CD16 ⁻	CD11b ⁺ CD16 ⁺	CD45 ⁺ HLA-DR ⁻ CD33 ^{low} CD36 ⁺	CD45 ⁺ HLA-DR ⁻ CD14 ⁺