

Vanessa Araújo Varela

**GERAÇÃO *IN VITRO* DE POPULAÇÃO DE CÉLULAS SUPRESSORAS
MIELOIDES A PARTIR DA DIFERENCIAÇÃO DE LINHAGEM IMATURA
LEUCÊMICA THP1**

Tese apresentada à Faculdade Israelita de
Ciências da Saúde Albert Einstein para
obtenção do Título de Doutora em Ciências
da Saúde.

São Paulo

2022

Vanessa Araújo Varela

**GERAÇÃO *IN VITRO* DE POPULAÇÃO DE CÉLULAS SUPRESSORAS
MIELOIDES A PARTIR DA DIFERENCIAÇÃO DE LINHAGEM IMATURA
LEUCÊMICA THP1**

Tese apresentada à Faculdade Israelita de
Ciências da Saúde Albert Einstein para
obtenção do Título de Doutora em Ciências
da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Welbert de Oliveira
Pereira

São Paulo

2022

Varela, Vanessa Araújo

Geração in vitro de população de células supressoras mieloides a partir da diferenciação de linhagem imatura leucêmica THP1 / Vanessa Araújo Varela. -- São Paulo, 2022.
xvii, 72 f.

Tese (Doutorado) – Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *In vitro generation of myeloid-derived suppressor cells population from THP1 immature leukemic lineage differentiation.*

1. Células supressoras mieloides. 2. Leucemia mieloide aguda. 3. Microambiente tumoral. 4. Diferenciação celular.

Elaborada pelo Sistema Einstein Integrado de Bibliotecas

FACULDADE ISRAELITA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE ALBERT EINSTEIN

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

Vanessa Araújo Varela

**GERAÇÃO *IN VITRO* DE POPULAÇÃO DE CÉLULAS SUPRESSORAS
MIELOIDES A PARTIR DA DIFERENCIAÇÃO DE LINHAGEM IMATURA
LEUCÊMICA THP1**

Presidente da banca: Prof. Dr. Welbert de Oliveira Pereira

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Prof. Dr. Paulo Vidal Campregher

Dra. Eliane Antonioli

Profa. Dra. Fernanda Agostini Rocha

Membros suplentes:

Dra. Raquel de Melo Alves Paiva

Profa. Dra. Karina Griesi Oliveira

Prof. Dr. Marcelo Vivolo Aun

Aprovada em: 20/12/2022.

Dedicatória

Primeiramente agradeço à Deus, que me deu a vida, que sempre esteve comigo, me abençoando, protegendo, fortalecendo e capacitando.

Agradeço em especial aos meus pais Edevaldo Varela e Albaneide Varela e minha irmã Andressa Varela por todo amor e suporte (emocional e financeiro) de formas tão excepcionais. Por me ensinarem a ter fé em Deus e por serem meus fiéis companheiros, conselheiros e melhores amigos. Por todas as orações, e por todas as vezes que cederam seus ombros para meus lamentos e choros, por cada abraço, cada conversa, cada puxão de orelha, por todos os sacrifícios, mas principalmente por me ajudarem e me incentivarem com muita sabedoria e carinho em cada passo que eu dei. Não tenho nem palavras para descrever o quanto vocês são importantes para mim e o quanto foram importantes para que eu chegasse até aqui e para que esse trabalho fosse concretizado. Vocês são verdadeiros exemplos a serem seguidos. Cada conquista /sucesso que eu alcancei ou venha alcançar na vida é também de vocês! Amo vocês!

Não poderia deixar de mencionar também a minha avó materna Maria de Lourdes da Silva (*in memoriam*) e agradecer por sempre me amar e incentivar em todas as áreas da vida, e sempre demonstrar o quanto se orgulhava de mim. Ela foi um grande exemplo de pessoa, de mulher cheia de fé, temente a Deus e que nunca desistiu nem desanimou e que permaneceu alegre, persistente e amorosa mesmo diante de tantas dificuldades relacionadas a saúde. Mesmo sem saber quantos dias mais de vida teria ao meu lado, ela nunca deixou de me incentivar a seguir meus sonhos e de celebrar cada conquista comigo.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Welbert de Oliveira Pereira pela orientação, ensino, estímulo, paciência, confiança, e companheirismo sem os quais este trabalho não seria realizado. Por se preocupar com a minha formação pessoal e profissional de forma muito diferenciada e direcionada, permitindo que eu explorasse diversas atribuições e atividades além das comumente relacionadas diretamente à carreira acadêmica e científica, possibilitando assim que eu me sinta preparada para encarar as próximas fases sejam elas quais forem.

Aos meus colegas de grupo Tarcila Datoguia, Victória Caraciolo, Natalia Mazini, Sofia Gama, Gabriel Lopes, Débora Pimenta e aos mais recém-chegados Flávia Freddi, Nicolas Volpi, Lucas Ricci e Mariana Gaido pelo auxílio em algumas etapas de execução desse trabalho, pelas ricas discussões científicas, pelos ensinamentos, amizade, momentos descontraídos e pela agradável convivência.

À Profa. Dra. Mariane Amano por todo apoio científico ao longo deste projeto, em especial pela colaboração e parceria que possibilitou a realização dos experimentos de dosagem de citocinas no sobrenadante. E também à sua doutoranda, Leticia Heinen, pela colaboração no experimento de avaliação da proliferação de linfócitos ativados.

À colaboradora Profa. Dra. Luciana Marti que me auxiliou no aprendizado do protocolo de seleção e separação de células NK a partir das células mononucleares do sangue periférico utilizando *beads* magnéticas.

Ao programa de pós-graduação da Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein (FICSAE), ao coordenador Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo e também a toda equipe da coordenação, Laudiceia e Jaciele.

A todos os membros da Equipe do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa (Natália Torres, Andrea Viera, Alessandro Marins, Thiago Aloia, Edicleia Santos, Marta Diniz, Bruna Colli e Ana Ringheim Cadete). E aos demais profissionais do Núcleo de Apoio ao Pesquisador, Biblioteca, e Comitê de Ética em Pesquisa.

Aos demais professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-graduação da FICSAE que de muitas formas contribuíram para minha formação.

Aos membros avaliadores da banca por todas as contribuições e por aceitarem fazer parte deste grande momento.

Ao suporte financeiro fornecido pelo AmigoH por meio do projeto do Prof. Welbert (SGPP: 3182-17).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, número do processo 88887.518214/2020-00.

Sumário

Dedicatória	v
Agradecimentos.....	vi
Lista de figuras	x
Lista de quadros	xi
Lista de abreviaturas	xii
Resumo	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Células supressoras mieloides	1
1.1.1 MDSC e doenças autoimunes	2
1.1.2 MDSC e sepse e choque séptico	3
1.1.3 MDSC e câncer	4
1.1.4 MDSC na leucemia mieloide aguda	5
1.2 Aspectos gerais e específicos da leucemia mieloide aguda.....	6
1.4 Resposta imune, o papel das células NK e a apoptose	11
1.4 Mecanismo de escape imunológico pelas células leucêmicas e interações MDSC- microambiente	14
1.5 Terapias-alvo para MDSC	18
1.6 Linhagem celular THP1	20
1.7 Objetivos.....	21
2 MÉTODOS	22
2.1 Aspectos éticos	22
2.2 Linhagens celulares.....	22
2.3 Separação do PBMC a partir do sangue periférico	22
2.4 Isolamento das células NK	23
2.5 Diferenciação de células leucêmicas imortalizadas.....	24
2.6 Separação e purificação das células diferenciadas por <i>cell sorting</i>	24
2.7 Imunofenotipagem por citometria de fluxo.....	25
2.8 Análise da expressão gênica.....	26
2.8.1 Extração de RNA.....	26
2.8.2 Síntese de cDNA	27
2.8.3 Reação de PCR quantitativo em tempo real.....	27

2.9 Dosagem de citocinas e quimiocinas produzidas pelas células leucêmicas.....	29
2.10 Ensaio de proliferação de linfócitos	29
2.10.1 Preparo e marcação das amostras para ensaio de proliferação	29
2.10.2 Ensaio de proliferação	30
2.11 Ensaio de <i>killing</i> células leucêmicas <i>versus</i> NK	30
2.11.1 Avaliação da apoptose	31
2.12 Análise estatística.....	31
3 RESULTADOS	32
3.1 Protocolo de diferenciação	32
3.2 Imunofenotipagem das células THP1 estimuladas e não estimuladas	33
3.3 Seleção da população THP1-MDSC-like (<i>sorting</i>).....	36
3.4 Avaliação da expressão gênica das populações purificadas	37
3.5 Avaliação da secreção de citocinas e quimiocinas imunrregularórias	40
3.6 Avaliação do efeito do SN de THP1-MDSC-like sob a proliferação de linfócitos.....	41
3.7 Avaliação do efeito do do SN de THP1-MDSC-like sob as células NK e células leucêmicas (ensaio do <i>killing</i>).....	42
4 DISCUSSÃO	47
5 CONCLUSÕES	59
6 REFERÊNCIAS	60
Abstract	

Lista de figuras

Figura 1. Marcadores do câncer	11
Figura 2. Marcadores moleculares das células NK e das células tumorais envolvidas no reconhecimento e <i>killing</i>	12
Figura 3. Mecanismos de escape imunológico pelas células leucêmicas	15
Figura 4. Mecanismos dependentes de MDSC que impulsionam a progressão tumoral	17
Figura 5. Estratégias para direcionamento de células supressoras mieloides.....	19
Figura 6. Protocolo padronizado da diferenciação das células THP1 em células supressoras mieloides	33
Figura 7. Imunofenotipagem por citometria de fluxo	34
Figura 8. Estratégia de <i>sorting</i> utilizada para selecionar as células THP1-MDSC-like ..	37
Figura 9. Expressão gênica das células THP1-nCT e THP1-MDSC-like após o <i>sorting</i>	39
Figura 10. Citocinas e quimiocinas imunoregulatórias detectadas no sobrenadante de cultura celular após protocolo de diferenciação.....	41
Figura 11. Ensaio de proliferação linfocitária	42
Figura 12. Ensaio de <i>killing</i> com células NK <i>versus</i> células leucêmicas	44

Lista de quadros

Quadro 1. Informações sobre os anticorpos (diluições, clones, código de referência e empresa)	25
Quadro 2. Sequência de <i>primers</i>	28
Quadro 3. Resumo da fase de padronização do protocolo de diferenciação	32
Quadro 4. Caracterização das células supressoras de linhagem mieloide de acordo com a literatura.....	35
Quadro 5. Resumo dos marcadores fenotípicos e funcionais das MDSC na literatura comparados com os obtidos nesse estudo	46

Lista de abreviaturas

ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpos (<i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>)
AF	<i>Alexa Fluor</i>
ANOVA	Análise de variância
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APAF-1	<i>Apoptotic peptidase activating factor 1</i>
APC	<i>Allophycocyanin</i>
ARG-1	Arginase-1
ATP	Adenosina trifosfato
ATRA	Ácido <i>all-trans</i> retinóico (<i>All-trans retinoic acid</i>)
BAK	<i>BCL2 antagonist/killer</i>
Bax	<i>BCL-associated X</i>
BB	<i>Brilliant Blue</i>
Bcl-2	<i>B cell lymphoma-2</i>
Bcl-XL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BD	<i>Becton, Dickinson and Company</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BV	<i>Brilliant Violet</i>
CAR	Receptor antigênico quimérico (<i>Chimeric antigen receptor</i>)
CCA	Colangiocarcinoma maligno
CCL18	<i>C-C motif chemokine ligand 18</i>
CCL22	<i>C-C motif chemokine ligand 22</i>
CD	Cluster de diferenciação (<i>Cluster of differentiation</i>)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEBPA	<i>CCAAT/enhancer-binding protein alpha</i>
CT	Controle
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CTH	Células-tronco hematopoiéticas
CTL	Células-tronco leucêmicas
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4</i>
CTM	Células-tronco mesenquimais ou células estromais mesenquimais

COX	<i>Cyclooxygenase</i>
CXCL10	<i>C-X-C motif chemokine ligand 10</i> ou proteína induzível por interferon-gama (IP-10)
DECH	Doença do enxerto contra hospedeiro (<i>Graft versus host disease</i>)
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNMT3A	<i>DNA methyltransferase 3 alpha</i>
F	<i>Forward primer (Left primer)</i>
FAB	<i>French-American-British Co-operative Group</i>
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FAS	<i>Fas-associated protein</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FLT3	<i>Fms-like tyrosine kinase 3</i>
GAL-9	Galectina 9
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos (<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>)
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos (<i>Hepatocyte growth factor</i>)
HL60	Linhagem celular leucêmica humana derivada de um paciente com leucemia promielocítica aguda
IDH	Isocitrato desidrogenase (<i>Isocitrate dehydrogenase</i>)
IDO	<i>Indoleamine 2,3-dioxygenase</i>
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IL2RB	Subunidade beta do receptor de interleucina 2 (CD122)
KIR	Inibidores de imunoglobulina de célula assassina (<i>Killer-cell immunoglobulin-like receptor</i>)
LAG-3	<i>Lymphocyte-activation gene 3</i>
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
<i>Lin1</i>	<i>Anti-Human Lineage Cocktail 1</i>
LLA	Leucemia linfoblástica aguda

LMA	Leucemia mieloide aguda
LPA	Leucemia promielocítica aguda
LPS	Lipopolissacarídeos
M-CSF	Fator estimulador de macrófagos (<i>Macrophage colony-stimulating fator</i>)
MDSC	Células supressoras de linhagem mieloide (<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>)
MFI	Intensidade média de fluorescência (<i>Mean fluorescence intensity</i>)
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (<i>Major histocompatibility complex</i>)
MM	Mieloma múltiplo
MO	Medula óssea
MRC1	Receptor de manose C-tipo 1 (CD206)
NGS	Sequenciamento de nova geração (<i>New generation sequencing</i>)
NK	<i>Natural killer</i>
NOS2	Óxido nítrico sintase 2
NPM1	<i>Nucleophosmin 1</i>
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico (<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Tampão fosfato-salina (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PC5	R-phycoerythrin-Cyanine 5
PD-1	Proteína de morte celular programada 1 (<i>Programmed cell death protein 1</i>)
PD-L1	Ligante da proteína de morte celular programada (<i>Programmed death-ligand 1</i>)
PE	<i>Phycoerythrin</i>
R	<i>Reverse primer (Right primer)</i>
RNS	Espécies reativas de nitrogênio (<i>Reactive nitrogen species</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive oxygen species</i>)
S100A8	Proteína A8 de ligação ao cálcio S100
S100A9	Proteína A9 de ligação ao cálcio S100
SA-PE	<i>Streptavidin-conjugated with phycoerythrin</i>
SBF	Soro bovino fetal (<i>Fetal bovine serum</i>)
SCF	Fator de célula-tronco (<i>Stem cell fator</i>)
SN	Sobrenadante

TA	Temperatura ambiente
TAM	Macrófagos associados ao tumor (<i>Tumor-associated macrophage</i>)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEM	Transição epitélio-mesenquimal
TET2	<i>Tet methylcytosine dioxygenase 2</i>
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta (<i>Transforming growth factor beta</i>)
THP1	Linhagem celular monocítica humana derivada de um paciente com leucemia mielomonocítica aguda
TIM3	<i>T-cell immunoglobulin mucin 3</i>
TME	Microambiente tumoral (<i>Tumor microenvironment</i>)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>)
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado a TNF (<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>)
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)
WT	Selvagem (<i>Wild type</i>)

Resumo

Introdução: Células supressoras mieloides são uma população heterogênea de células mieloides imaturas com potente perfil supressor que regulam negativamente as respostas imunes. Estas células são componentes importantes do microambiente de diversas doenças, incluindo tumores sólidos e hematológicos, doenças autoimunes e inflamação crônica. No entanto, sua ampla utilização nos estudos é dificultada e limitada por se tratarem de uma população rara, de difícil isolamento, expansão, diferenciação, manutenção em cultura e complicada caracterização fenotípica e funcional. **Objetivo:** Desenvolver um protocolo de produção de células supressoras mieloides a partir da diferenciação da linhagem leucêmica imatura THP-1 com caracterização fenotípica e funcional consistente com a literatura e cujas células geradas sejam capazes de contribuir para o escape imunológico de linhagens LMA. **Métodos:** Estimulamos células leucêmicas imaturas THP1 com G-CSF (100ng/mL) e IL-4 (20ng/mL) por 7 dias para diferenciação no perfil MDSC-like. Ao final do protocolo, avaliamos a imunofenotipagem e a expressão gênica para caracterização fenotípica e realizamos ensaios de liberação de citocinas, proliferação de linfócitos e *killing* com células NK para caracterização funcional. **Resultados:** Fomos capazes de diferenciar de forma robusta células THP1 em uma população MDSC-like, denominadas de THP1-MDSC-like, que apresentaram imunofenotipagem e perfil de expressão gênica compatível com o descrito na literatura. Estas células THP1-MDSC-like secretam para o microambiente diversas citocinas imunorreguladoras de forma consistente com o perfil supressor relacionado às MDSC na literatura. Além disso, o sobrenadante destas células foi capaz de diminuir a proliferação de linfócitos ativados e protegeram as células leucêmicas (THP1 e HL60) da apoptose induzida pelas células NK. Adicionalmente, indo além do que é relatado na literatura, verificamos se essa diferenciação fenotípica e funcional não se desviou para um perfil semelhante ao de macrófagos e observamos que nossas células THP1-MDSC-like não apresentam características de macrófagos M1 ou M2. O produto final deste trabalho, as células THP1-MDSC-like, tem potencial de solucionar um dos grandes desafios atuais na comunidade científica que é a geração de células MDSC-like em larga escala, podendo assim impactar o curso de diversos estudos e modelos em contextos variados, como por exemplo em cânceres, imunodeficiências, autoimunidade e inflamações crônicas. **Conclusões:** Desenvolvemos um protocolo eficaz para produção de células

supressoras mieloides em a partir da diferenciação da linhagem celular mieloide imatura THP-1 induzida por G-CSF e IL-4 que foram caracterizadas imunofenotipicamente e funcionalmente de forma robusta e consistente com a literatura. Além disso, demonstramos que as células supressoras de THP1-MDSC-*like* são capazes de contribuir para o escape imunológico de linhagens LMA.

Descritores: Células supressoras mieloides; Leucemia mieloide aguda; Microambiente tumoral; Diferenciação celular

1 INTRODUÇÃO

1.1 Células supressoras mieloides

As células denominadas células supressoras mieloides ou células supressoras de linhagem mielóide (MDSC – *myeloid-derived suppressor cells*), foram reveladas pela literatura científica há 15 anos, descrevendo inicialmente um grupo vagamente definido de células mieloides com potente atividade regulatória imunológica. Nos últimos anos, a natureza e o papel biológico das MDSC tornaram-se mais claros e as MDSC emergiram como um regulador universal da função imunológica em muitas condições patológicas (por exemplo, câncer, inflamação crônica e doenças autoimunes).^(1, 2) No entanto, possivelmente estas células já vinham sendo relatadas na literatura desde muito antes. Foi em 1995 que o primeiro estudo documentando a presença de células imaturas dotadas de capacidade supressiva em tecidos de câncer de cabeça e pescoço e linfonodos foi publicado.⁽³⁾ Progressivamente, cada vez mais estudos surgiram apoiando o conceito inicial da existência de uma população mielóide com funções supressoras.^(3,4) Atualmente, a definição de MDSC é de uma população heterogênea de células mieloides imaturas com potente perfil supressor que regulam negativamente as respostas imunes.^(2,5-12)

Foram descritas duas grandes subpopulações de MDSC: as neutrofílicas (PMN-MDSC, também denominadas algumas vezes de G-MDSC) e as monocíticas (M-MDSC, denominadas também por alguns autores como Mo-MDSC). Há relatos também de uma terceira população chamada de imaturas (i-MDSC, conhecidas também como e-MDSC, que significa MDSC em estágio inicial).^(2,4-9,13,14)

Em termos de morfologia, fenótipo e função, as MDSC não são um simples subconjunto definido de células mieloides, mas sim uma população heterogênea que, como tal, expressa uma mistura de marcadores de superfície típicos para células mieloides, mas não possui marcadores de linhagem para linfócitos, células *natural killer* (NK), macrófagos e células dendríticas.⁽¹⁵⁾ Devido sua grande heterogeneidade, não há um consenso na literatura quanto a imunofenotipagem das MDSC.^(4,6) De acordo com Bronte et al.⁽⁷⁾ as PMN-MDSC são caracterizadas por CD14⁻CD11b⁺CD15⁺(ou CD66b⁺), as M-MDSC apresentam CD11b⁺CD14⁺HLA-DR^{low/-}CD15⁻, e as i-MDSC são Lin⁻(CD3/14/15/19/56)/HLA-DR⁻/CD33⁺.⁽⁷⁾ Por outro lado, alguns autores não consideram o

CD33 como marcador de células imaturas mas sim de células PMN-MDSC^(6,16) e até mesmo M-MDSC, por exemplo.^(16,17)

Durante a hematopoese normal, pequenas quantidades de MDSC são geradas com o objetivo de manter um *pool* de progenitores mieloides na medula óssea (MO). Essa população, rara em condições saudáveis, pode estar presente na MO, sangue periférico, linfonodos e baço. As MDSC podem ser encontradas em maior abundância quando relacionadas a condições patológicas em que há alterações na via de diferenciação hematopoiética, levando à expansão e acúmulo de MDSC, como na inflamação crônica, infecção, estresse, autoimunidade e, principalmente, no câncer. A maior parte do conhecimento sobre a função das MDSC vem de estudos sobre modelos de câncer, principalmente em tumores sólidos.^(4-6,8,9,11,13,14,18,19)

O acúmulo de MDSC é um fenômeno complexo e gradual regido por múltiplos fatores, um primeiro grupo de sinais é importante para a expansão de células mieloides imaturas, enquanto um segundo grupo é responsável por sua ativação patológica. O primeiro grupo de sinais é impulsionado por fatores produzidos pelo estroma da MO ou tumores e inclui: Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), Fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), Fator estimulador de macrófagos (M-CSF), Fator de célula-tronco (SCF), Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e ácidos graxos poli-insaturados. Os fatores/reguladores transcricionais STAT3, STAT5, IRF8, C/EBP β , NOTCH desempenham um papel importante neste processo. Outros fatores envolvidos neste processo incluem os receptores de adenosina A2b, NLRP3, proteína do retinoblastoma 1 (RB1) e alarminas proteína A8 de ligação ao cálcio S100 (S100A8) e proteína A9 de ligação ao cálcio S100 (S100A9). Adicionalmente, a literatura revela que as moléculas antiapoptóticas c-FLIP e MCL-1 estão respectivamente envolvidas no desenvolvimento de M-MDSC e PMN-MDSC em cânceres. O segundo grupo de sinais é mediado por citocinas inflamatórias e DAMP, que incluem IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-13, TNF e o ligante TLR, HMGB1. Esses fatores sinalizam principalmente via NF- κ B, STAT1 e STAT6.^(2,20-26)

1.1.1 MDSC e doenças autoimunes

Uma grande vertente em evidência nos últimos anos é o envolvimento das MDSC em doenças autoimunes como a artrite reumatoide, diabetes tipo 1, esclerose

múltipla e doença inflamatória intestinal. Uma das principais funções das células MDSC nesse contexto é devido sua capacidade de afetar negativamente as respostas imunológicas regulando a função das células T CD4 e CD8, sendo apontadas até como possíveis alvos terapêuticos.^(19,27)

No lúpus eritematoso sistêmico (LES), por exemplo, um estudo de Ji et al.⁽²⁸⁾ revelou que as MDSC apresentaram capacidade de regular o equilíbrio celular Th17/Treg e que isso pode ser um fator patogênico crítico.⁽²⁸⁾ Outro estudo mostrou um aumento significativo de PMN-MDSC no sangue periférico de pacientes com LES ativo. O aumento de MDSC foi positivamente correlacionado com a atividade sérica de arginase-1 (ARG-1), respostas Th17 e a gravidade da doença. Os autores também demonstraram, em um modelo humanizado de LES, que MDSC induziu lesão renal via resposta Th17 de maneira dependente de ARG-1.^(27,29)

Já na artrite reumatoide, foi descrito que as M-MDSC e PMN-MDSC desempenham diferentes funções supressoras e regulam as respostas imunes de uma maneira diferente. Essa ambiguidade devido à heterogeneidade da população de células MDSC, das interações entre MDSC e diferentes subconjuntos de células T CD4+, e dos diferentes estágios e condições da doença evidencia um pouco mais a complexidade dessas células.⁽¹⁹⁾ Neste contexto ambíguo, as M-MDSC possuem uma ação anti-inflamatória com inibição de células T, expansão de Treg, redução da inflamação e redução da severidade da doença, em contrapartida as PMN-MDSC possuem mais uma ação pró-inflamatória como expansão de Th17, promoção de inflamação e exacerbação da severidade da doença.^(19,30,31)

1.1.2 MDSC e sepse e choque séptico

As MDSC também desempenham um papel significativo na desregulação imunológica na sepse e na sua progressão para o choque séptico. As MDSC são liberadas transitoriamente pelo maquinário hematopoiético durante muitas respostas inflamatórias e consideradas como um mecanismo regulatório inato para evitar uma resposta pró-inflamatória exacerbada. No entanto, se essa expansão de MDSC e sua infiltração tecidual persistirem, ela pode induzir uma fisiopatologia significativa, incluindo linfopenia, imunossupressão hospedeira e imunoparalisia (supressão profunda do sistema imunológico) que contribuem para a piora dos desfechos dos pacientes.⁽³²⁻³⁴⁾

1.1.3 MDSC e câncer

No câncer, onde essas células foram mais bem estudadas, o aumento na frequência e no número de MDSC depende tanto da carga tumoral como dos fatores secretados pelo tumor que regulam a sobrevivência e a expansão das células progenitoras mieloides. Estudos revelaram que os números de MDSC circulantes estão correlacionados com mau prognóstico, angiogênese tumoral, osteoporose e evasão tumoral da imunidade do hospedeiro. Alguns estudos clínicos identificaram as MDSC como um valioso marcador preditivo no câncer.^(2,5,18,35)

De forma geral, as MDSC têm um papel patológico triplo no câncer: (I) elas suprimem respostas imunes adaptativas antitumorais específicas que, por sua vez, facilitam o crescimento do tumor; (II) elas mesmas aumentam o crescimento de tumores já estabelecidos pela secreção de diferentes moléculas; e (III) elas podem fornecer uma centelha para o início da tumorigênese no microambiente inflamatório.^(36,37)

Veglia et al.⁽²⁾ evidenciaram o valor das MDSC em prever a resposta a várias terapias contra o câncer em diversos estudos que sugerem que a frequência de M-MDSC se correlacionou negativamente com a resposta à quimioterapia no câncer de mama, colo do útero, próstata, e carcinoma de células escamosas; da mesma forma, a frequência de PMN-MDSC correlaciona-se negativamente com a resposta à quimioterapia no câncer colorretal. Adicionalmente, a frequência de M-MDSC foi preditora da falha da radioterapia no carcinoma hepatocelular. O percentual de M-MDSC e PMN-MDSC circulantes correlacionou-se negativamente com resposta clínica objetiva ao ipilimumab, anticorpo *cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4* (CTLA-4) em pacientes com melanoma não ressecável. Além disso, no melanoma, a frequência M-MDSC poderia prever a falha da imunoterapia de segunda linha usando anticorpo anti-proteína de morte celular programada 1 (PD-1) (nivolumab) após falha do tratamento de primeira linha ipilimumab. Ademais, em modelos de tumor de camundongos, a inibição de MDSC durante a imunoterapia aumentou seu efeito terapêutico.⁽²⁾

Em relação às neoplasias hematológicas, Veglia et al.⁽²⁾ também evidenciaram que a frequência de M-MDSC se correlacionou com a redução da sobrevida em mieloma múltiplo (MM), linfoma de Hodgkin e também o linfoma não-Hodgkin, incluindo o linfoma difuso de células B grandes.⁽²⁾ Brimnes et al.⁽³⁸⁾ relataram pela primeira vez um aumento no número de MDSC no sangue periférico de pacientes

com MM em comparação com controles saudáveis em 2010.^(38,39) Mais tarde, Wang et al.⁽⁴⁰⁾ mostraram que os níveis de M-MDSC estavam positivamente correlacionados com a recidiva do MM e negativamente correlacionados com os desfechos do tratamento.^(39,40)

1.1.4 MDSC na leucemia mieloide aguda

Estudos clínicos já mostraram que MDSC são acumuladas no sangue periférico e MO de pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA) em comparação com doadores saudáveis.⁽⁴¹⁾ Além disso, o microambiente da LMA promove a expansão da população de MDSC na MO,⁽⁴²⁾ existe uma correlação positiva e relevante entre o aumento da população de MDSC e o pior prognóstico dos pacientes e a detecção de doença residual mínima está diretamente associada à presença de população de MDSC.^(39,43) Maiores frequências de M-MDSC e i-MDSC foram identificadas no sangue periférico de pacientes com LMA,^(39,44) e as MDSC circulantes elevadas foram significativamente correlacionados com menor remissão completa e maiores taxas de recaída e menor sobrevida a longo prazo nesses pacientes.^(39,45) No entanto, mais estudos são necessários, principalmente em relação ao envolvimento das MDSC nas neoplasias hematológicas.

Estimativas globais de 2020 apontam que ocorreram 19,3 milhões de novos casos de câncer e quase 10,0 milhões de mortes por câncer. De acordo com a GLOBOCAN 2020, só de leucemias foram estimados 474,519 mil novos casos e 311,594 mil mortes.⁽⁴⁶⁾ Os dados disponíveis apontam para o fato de que a LMA é a leucemia aguda mais comum entre adultos e sua incidência aumenta com a idade. É também a segunda leucemia aguda mais comum em crianças.^(47,48,49,50)

Considerando esses números de incidência e mortalidade alarmantes, é imperativo dedicar tempo e recursos para o estudo dos cânceres, incluindo a LMA. Também é necessário averiguar o envolvimento das MDSC nesse cenário, uma vez que as MDSC vêm ganhando evidência nos últimos anos como potentes imunoreguladores do microambiente e emergiram também como potenciais alvos terapêuticos, principalmente relacionadas ao microambiente de tumores sólidos e mais recentemente relacionadas também ao microambiente leucêmico, podendo assim

interferir com o surgimento, evolução e recidiva da LMA além de influenciar na resposta ao tratamento e na sobrevida do paciente.^(2,18,19,46,51,52)

1.2 Aspectos gerais e específicos da leucemia mieloide aguda

A história inicial da leucemia remonta a 200 anos. Não há consenso sobre a descoberta e a história precoce da leucemia na literatura atual. Alfred Velpeau, Alfred Donné, John Bennett e Rudolf Virchow são os quatro mais frequentemente citados como "aquele" que descobriu leucemia.⁽⁵³⁾

A LMA é uma doença hematopoiética maligna clonal originada de alterações genéticas e moleculares heterogêneas alterando a função hematopoiética normal das células progenitoras mieloides.^(54,55)

Diversas mutações genéticas e epigenéticas fazem parte da evolução clonal da LMA em que as células mutadas adquirem características fundamentais do câncer como por exemplo a capacidade de auto-renovação, alta taxa de proliferação e aquisição de resistência à apoptose. Como resultado, há uma produção de células anômalas constituída de subtipos celulares mutados e que não completaram sua maturação, denominados blastos (precursores mieloides transformados) que proliferam e se acumulam na MO.^(11,54,56,57) Estes blastos continuam sofrendo mutações, o que confere a heterogeneidade clonal (característica particularmente marcante da LMA), e continuam se expandindo de forma gradativa na MO, comprometendo a hematopoese. Então, ocorre também a liberação dos blastos para o sangue periférico e a invasão de outros tecidos.^(49,54,56,58,59) Ou seja, a LMA apresenta-se como uma doença heterogênea que tipicamente envolve MO e sangue periférico e, em vários casos, tecidos extramedulares.^(11,60) Embora o prognóstico dos pacientes com LMA tenha melhorado nas últimas décadas, apenas um em cada quatro pacientes sobrevive 5 anos ou mais.⁽⁵⁵⁾

O diagnóstico, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), é um processo complexo. A MO ou o sangue periférico devem conter menos de 20% de blastos de linhagem mieloide. Além disso, são realizados diversos outros exames: análise morfológica, imunofenotipagem por citometria de fluxo, citogenética e sequenciamento de nova geração (NGS – *new generation sequencing*) a fim de definir os subtipos da doença mediante os marcadores celulares, fenotípicos e mutacionais e alterações cromossômicas relacionadas.^(49,54,61-63)

As manifestações clínicas (sinais e sintomas) comuns incluem fraqueza, fadiga, infecções recorrentes e distúrbios hemorrágicos (hematomas, equimoses, epistaxe).⁽⁶⁴⁾ No processo leucêmico, a febre ocorre por meio de dois mecanismos: febre neoplásica, decorrente do processo de proliferação clonal, ou por neutropenia e subseqüentes infecções recorrentes. A pancitopenia (diminuição em todas as linhagens de células sanguíneas, ou seja, anemia, neutropenia e trombocitopenia) surge da falência da MO e ocupação por blastos leucêmicos.⁽¹¹⁾ Os distúrbios da coagulação (trombóticos ou hemorrágicos) são apresentações mais graves da LMA.⁽⁶⁵⁾ Todos os tipos de LMA podem apresentar comprometimento da coagulação, embora ocorra comumente na leucemia promielocítica aguda (LPA).⁽⁶⁶⁾ A leucocitose é outra apresentação clínica definida como hiperleucocitose sintomática, que é uma emergência médica observada em 10-20% dos pacientes com LMA. Embora a leucocitose possa se manifestar por meio de alterações patológicas em vários órgãos, os principais sintomas clínicos e potencialmente fatais estão relacionados ao sistema nervoso central e aos pulmões.⁽⁶⁷⁾ Os sintomas extramedulares incluem hepatoesplenomegalia, linfadenopatia e lesões ósseas.⁽⁶⁸⁾

O prognóstico da LMA é influenciado pela idade do paciente, cariótipo e características genômicas. A média de idade do diagnóstico é de 68 anos. Estima-se que aproximadamente 80% dos pacientes com idade ≥ 65 anos tenham taxas de mortalidade $\geq 30\%$ após intensiva quimioterapia de indução. Devido a isso, a maioria dos pacientes com LMA recém-diagnosticada com idade ≥ 60 anos recebe terapias de baixa intensidade.^(69,70)

Os marcadores genéticos são de suma importância na compreensão da fisiopatologia da LMA, sendo utilizados para classificação de risco, determinação de tratamento e prognóstico (favorável, intermediário, mau prognóstico).^(54,71) Estudos que descreveram a evolução genética e epigenética da LMA do diagnóstico à recaída indicam que o perfil molecular da LMA muda durante a doença. Cada mutação aumenta a complexidade genética, o que faz com que o aumento da heterogeneidade clonal esteja associado a desfechos desfavoráveis na LMA.⁽⁵⁵⁾

Para pacientes com LMA citogeneticamente normal, o prognóstico pode ser especificado pelo *status* mutacional dos genes *nucleophosmin 1* (NPM1), *Fms-like tyrosine kinase 3* (FLT3) e *CCAAT/enhancer-binding protein alpha* (CEBPA). Mutações do gene isocitrato desidrogenase 1 (IDH1 – *isocitrate dehydrogenase*) têm sido relatadas como fator prognóstico adverso apenas em subgrupos geneticamente

definidos de pacientes. Já em relação ao gene IDH2, uma meta-análise recente encontrou um impacto prognóstico positivo das mutações IDH2 na sobrevivência.⁽⁶⁹⁾

Alguns dos genes tipicamente mutados são os relacionados às vias de sinalização e ativação da proteína quinase. Mutações no gene FLT3, estão associadas à ativação e proliferação aberrante de blastos leucêmicos.⁽⁷²⁾ O FLT3 tem um papel especial na leucemogênese por colaborar com outras mutações, principalmente aquelas que envolvem o gene NPM1. Pacientes com mutação NPM1 são estratificados como prognóstico favorável. No entanto, a estratificação de risco é alterada e o curso clínico está associado a recidivas precoces quando ambas as mutações coexistem (FLT3 e NPM1).^(69,73,74) Outro importante grupo de mutações fundadoras está relacionado a genes que regulam a metilação epigenética do DNA e a modificação da cromatina. A mutação *DNA methyltransferase 3 alpha* (DNMT3A), por exemplo, prejudica e bloqueia a diferenciação de HSC e a mutação *tet methylcytosine dioxygenase 2* (TET2) prejudica a diferenciação mielóide,⁽⁷⁴⁾ sendo ambas consideradas um fator prognóstico negativo.⁽⁶⁹⁾ As principais alterações citogenéticas também são descritas como responsáveis pelo desenvolvimento da LMA (como translocação cromossômica, amplificação de genes, inserção ou deleção) e essas marcas também são importantes para classificação de risco e estratégia de tratamento.^(75,76)

Anteriormente as leucemias eram classificadas e nomeadas de acordo com sistema de estadiamento *French-American-British Co-operative Group* (FAB) de 1976 e a classificação das leucemias mielóides agudas era separada de M0 a M7 (de acordo com o desenvolvimento das células e sua morfologia),⁽⁷⁷⁾ entretanto, esta classificação foi substituída pela classificação da OMS que leva em conta vários parâmetros clínico-patológicos, complementando a classificação pré-existente com informações citogenéticas e moleculares, tornando a categorização mais robusta e específica. Além disso, com o avanço das técnicas de biologia molecular e celular, o advento do NGS e identificação de vários biomarcadores, a classificação OMS foi revisada em 2017, trazendo múltiplas mudanças na classificação tradicional para LMA, neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas.^(54,78,79) Atualmente, a LMA é classificada em 6 grandes categorias: LMA com anormalidades genéticas recorrentes; LMA com alterações relacionadas à mielodisplasia; neoplasias mielóides relacionadas à terapia; LMA, sem outra especificação; sarcoma mielóide; e proliferações mielóides relacionadas à síndrome de Down.⁽⁵⁴⁾

O tratamento convencional e padrão para a LMA é o tratamento quimioterápico de indução que consiste em protocolos terapêuticos quimioterápicos que combinam dois medicamentos com a finalidade de erradicar células leucêmicas, no caso, a citarabina junto com antraciclina (daunorrubicina ou idarrubicina). Embora este tratamento induza remissões completas na maioria dos pacientes, muitos enfrentam uma recaída (resistência adaptativa) ou têm doença refratária (resistência primária). A recaída da LMA deve-se à sobrevivência de células de leucemia resistentes à terapia (doença residual mínima). Além disso, pacientes mais velhos são frequentemente considerados inapropriados para receber tratamento à base de citotóxicos.⁽⁸⁰⁾

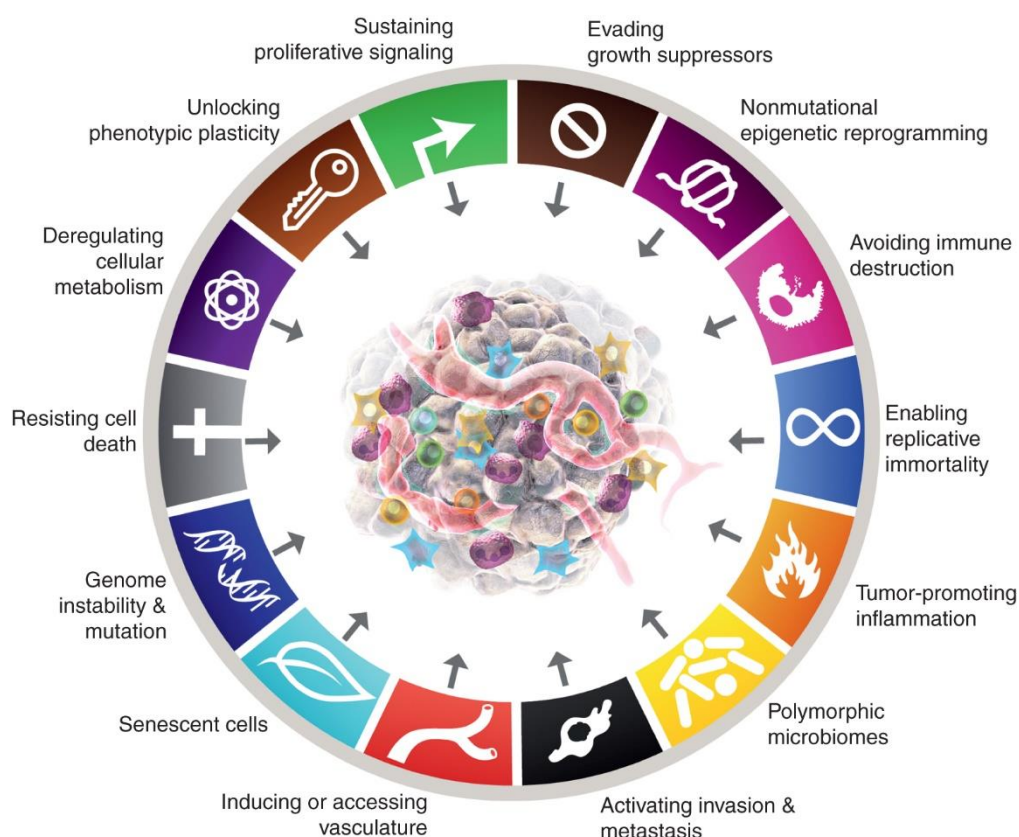
Enquanto muitas das LMA são tratadas com quimioterapias de indução (citarabina com antraciclina), os pacientes diagnosticados com leucemia LPA de baixo risco recebem tratamento de indução com trióxido de arsênio mais ácido *all-trans* retinóico (ATRA – *all-trans retinoic acid*),⁽⁸¹⁾ o que leva à remissão da doença com excelentes resultados em termos de sobrevida global.⁽⁸²⁾ Essa leucemia se distingue das outras não só pelo tratamento, mas principalmente por características citogenéticas, clínicas e biológicas com características moleculares, fenotípicas e clínicas peculiares. A LPA é caracterizada pela translocação t(15;17).⁽⁶⁹⁾

O transplante de células-tronco hematopoiéticas (CTH) alogênicas representa uma estratégia importante em busca de cura e para prevenir a recaída da doença para a maioria dos pacientes com LMA que atingem a remissão. O consenso atual, baseado na classificação de risco, recomenda o transplante de células-tronco alogênicas mieloblásticas para a LMA de maior risco, mas não para a de menor risco. A estratégia que une o transplante autólogo e quimioterapia de consolidação são considerados de benefício equivalente para LMA de risco intermediário. Nos pacientes com LMA recém-diagnosticada e de melhor prognóstico, o transplante de CTH alogênicas mieloablativo na primeira remissão completa leva a uma melhor sobrevida geral e à sobrevivência livre de leucemia quando comparado com abordagens não transplantadas nesses grupos de risco.^(83,84)

Todo a complexidade e heterogeneidade mutacional que envolve a LMA torna desafiadora a implementação de terapias-alvo específicas, além disso há a contribuição da escassez de agentes farmacológicos para a maioria dos eventos mutacionais encontrados na LMA.⁽⁸⁵⁾ Por isso, estudos que visam o entendimento das anormalidades citogenéticas, alterações epigenéticas, mutações, mecanismos de apoptose e principalmente da resposta imunológica são o caminho para o

desenvolvimento de tratamentos que sejam mais específicos e individualizados a fim de obter o melhor resultado para a sobrevivência do paciente, principalmente em casos de recidiva e refratariedade.^(86,87)

Em 2000, Hanahan et al. descreveram as características do câncer como autossuficiência de crescimento, resistência a sinais inibitórios de crescimento e apoptóticos, replicação ilimitada, capacidade de adquirir nutrição promovendo angiogênese, invasão e metástase.⁽⁸⁸⁾ Em 2011, esses conceitos foram refinados e o reconhecimento de que a evasão imunológica é um atributo central adicional das células cancerígenas.⁽⁸⁹⁾ Esta característica fundamental do câncer é particularmente marcante na LMA.⁽⁹⁰⁾ Recentemente, em 2022, novas adições foram propostas por Hanahan, trazendo a perspectiva de que a plasticidade fenotípica e a diferenciação interrompida são uma característica discreta e que a reprogramação epigenética não mutacional e os microbiomas polimórficos constituem características distintas que facilitam a aquisição de capacidades marcantes, podendo ser considerados determinantes mecanicistas pelas quais as capacidades marcantes do câncer são adquiridas. Além disso, células senescentes, de origens variadas, podem ser adicionadas à lista de tipos celulares funcionalmente importantes no microambiente tumoral (TME – *tumor microenvironment*).⁽⁹¹⁾ Na figura 1 abaixo encontra-se a exemplificação de todas essas características marcantes dos cânceres.



Fonte: Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discov.* 2022;12(1):31-46. Figure 6. Hallmarks of cancer—new additions; p. 43.⁽⁹¹⁾

Figura 1. Marcadores do câncer

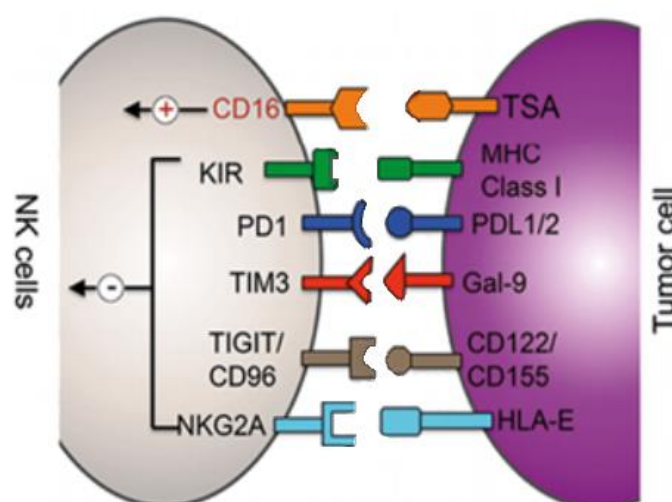
A evasão do sistema imune permanece sendo um dos mais importantes componentes do cenário neoplásico, especialmente porque o sistema imune é a terceira barreira de contenção de tumor num organismo humano após reparo de DNA e apoptose pela via intrínseca. Desta forma, é crucial compreender os elementos imunológicos envolvidos nesse reconhecimento e eliminação de células da neoplasia, em especial da LMA, para o avanço da compreensão da fisiopatologia da LMA e para o desenvolvimento de terapias específicas.^(42,89,92)

1.4 Resposta imune, o papel das células NK e a apoptose

A resposta imune contra tumores, incluindo a resposta imune anti-leucêmica, compreende as fases de reconhecimento da célula neoplásica e sua eliminação, sendo ambas igualmente importantes.⁽⁹²⁾

As células NK são de origem linfóide e exibem uma resposta inata contra células infectadas por vírus, mas estas também são capazes de montar uma

resposta imune contra células tumorais. As NK são capazes de distinguir células do corpo que possuem densidade normal ou diminuída de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC – *major histocompatibility complex*) em sua membrana mesmo sem exposição prévia a essas células. As células NK contêm receptores que podem ativar ou inibir sua atividade.⁽⁹³⁻⁹⁶⁾ Os receptores caracterizados (Figura 2) incluem o MHC ligando os inibidores de imunoglobulina de célula assassina (KIR – *killer-cell immunoglobulin-like receptor*). Os KIR podem atuar como receptores ativadores ou receptores inibitórios. Como inibidores, possuem um domínio transmembrana com cauda citoplasmática longa. Já como ativadores, têm caudas citoplasmáticas mais curtas e ativam células NK por associação com moléculas adaptadoras. Outros receptores importantes de receptores de células NK envolvidos na sinalização incluem a proteína 2A do grupo NK (NKG2A) e o transcrito do tipo imunoglobulina 2 (ILT-2).^(94,97)



Fonte: Adaptado de Carotta S. Targeting NK cells for anticancer immunotherapy: clinical and preclinical approaches. *Front Immunol.* 2016;7:152. Figure 1. Clinical and preclinical therapies augmenting NK cells function; p. 4.⁽⁹⁷⁾

Figura 2. Marcadores moleculares das células NK e das células tumorais envolvidas no reconhecimento e *killing*

As células NK podem induzir a apoptose da célula tumoral através de duas vias principais. A primeira via envolve a liberação de perforinas e granzimas, que levam à apoptose por rompimento da membrana celular da célula-alvo. Quando as células NK se tornam ativadas, há uma segunda via de morte, dependente de CD16 e citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC – *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) em células tumorais alvo, com subsequente indução de apoptose através da

via FAS/Fas-L. Outros componentes da apoptose mediada por células NK incluem a liberação dos ligantes do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α – *tumor necrosis factor-alpha*), ou Apo2-ligand [ligante indutor de apoptose relacionado a TNF (TRAIL – *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) /Apo2L] que, por sua vez, são capazes de ativar alvos que contêm domínios de morte. O TRAIL foi especificamente implicado no controle do crescimento de células tumorais e metástases.^(94,98)

O processo de apoptose envolve uma complexa rede de sinalização celular que se inicia com um estímulo de morte e culmina com um fenótipo clássico de empacotamento celular e subsequente remoção dos corpos apoptóticos. Todo este processo é mediado por caspases, proteínas capazes de clivar seus substratos, classificadas como iniciadoras ou efetoras. Há duas vias de ativação deste processo de morte: via extrínseca, quando dependente de receptores de morte e sinalização externa, ou intrínseca, quando dependente de sinais intracelulares.⁽⁹⁹⁾

A via extrínseca é iniciada após a interação dos ligantes de morte, tais como o TNF- α , o Fas/CD95-Ligante (FasL/CD95L) e o TRAIL, com os seus respectivos receptores. Uma vez ativados, recrutam adaptadores intracelulares como *Fas-associated protein with death domain* (FADD) e *tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain* (TRADD) e caspases iniciadoras -8 e -10, formando um complexo proteico chamado *death-inducing signaling complex* (DISC), que por sua vez leva à ativação das caspases efetoras, como a Caspase-3, gerando o fenótipo deste tipo de morte, mencionado anteriormente.⁽⁹⁹⁻¹⁰²⁾

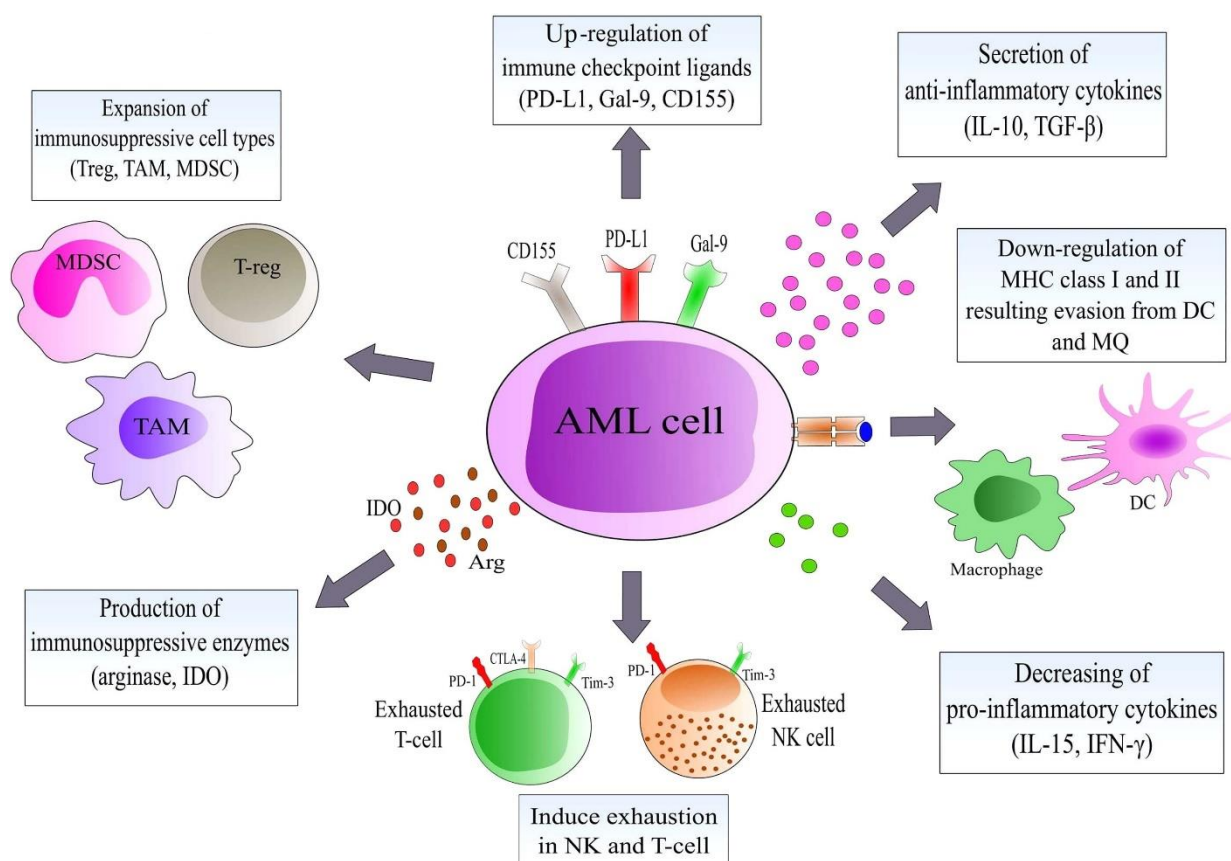
Já pela via intrínseca, a participação de ligantes de morte é dispensável, visto que uma gama de sinais intracelulares, denominados de “sinais de estresse”, tais como dano ao DNA, desestruturação do citoesqueleto, perda de adesão celular, carência de fatores de crescimento, hipóxia, inibição de síntese proteica ou de ácidos nucleicos, estresse de retículo endoplasmático, entre outros são suficientes para ativar este processo, a partir da ativação de *BH3 interacting domain death agonist* (Bid) e liberação de citocromo c mitocondrial, reconhecido como o principal gatilho desta via de apoptose.⁽⁹⁹⁻¹⁰¹⁾

A liberação de citocromo c depende da abertura de poros na membrana mitocondrial externa, que é um processo regulado por proteínas da família *B cell Lymphoma-2* (Bcl-2) através da interação de membros pró e anti-apoptóticos. *BCL-associated X* (Bax) e *BCL2 antagonist/killer* (Bak) são dois membros pró-apoptóticos implicados na formação dos poros que permitem a liberação do citocromo c. Estes poros

se mantêm fechados devido à interação de membros anti-apoptóticos, tais como Bcl-2 e *B-cell lymphoma-extra large* (Bcl-XL), sendo este o cenário molecular de uma célula saudável, porém, com uma sinalização apoptótica, este cenário é modificado. O aumento da permeabilidade da membrana permite a liberação do citocromo c para o citoplasma e consequentemente formação do apoptossomo, um complexo proteico composto por caspase-9, *apoptotic peptidase activating factor 1* (APAF-1), adenosina trifosfato (ATP) e citocromo c, que por sua vez cliva as caspases executoras -3, -6 e -7, levando à conclusão da via de apoptose com o mesmo fenótipo já descrito, apesar da via de ativação completamente diferente.^(100,103)

1.4 Mecanismo de escape imunológico pelas células leucêmicas e interações MDSC-microambiente

Nos últimos anos foram identificadas as estratégias usadas pelas células leucêmicas para driblar o ataque do sistema imunológico. Os mecanismos de vigilância imunológica que compreendem sistemas imunológicos adaptativos e inatos são naturalmente projetados para eliminar o desenvolvimento da LMA. No entanto, as células leucêmicas aplicam vários mecanismos de evasão imunológica para desviar as respostas imunes do hospedeiro, resultando na progressão da doença.^(42,104) Estes mecanismos incluem a expansão de células imunossupressoras como os linfócitos T reguladores, macrófagos associados ao tumor (TAM – *tumor-associated macrophage*) e as MDSC; superexpressão de ligantes de *checkpoint* imunológicos; secreção de citocinas anti-inflamatórias; regulação de MHC-I e MHC-II para fugir de células dendríticas e macrófagos; produção de enzimas imunossupressoras; redução da secreção de citocinas pró-inflamatórias; e indução de exaustão nas células NK e linfócitos T (Figura 3).⁽⁴²⁾



Fonte: Taghiloo S, Asgarian-Omran H. Immune evasion mechanisms in acute myeloid leukemia: a focus on immune checkpoint pathways. Crit Rev Oncol Hematol. 2021;157:103164. Fig. 2. Immune escape mechanisms of AML from immunosurveillance; p. 3.⁽⁴²⁾

Figura 3. Mecanismos de escape imunológico pelas células leucêmicas

O aumento do conhecimento do TME e dos mecanismos de regulação imunológica resultou no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para pacientes com LMA. Combinações diversas de tratamentos vem sendo estudados evidenciando que “atacar” o câncer de mais de uma frente pode ser mais eficaz a fim de aumentar a sobrevida do paciente. Acreditamos que as imunoterapias, em especial aquelas mediadas por células NK, são alternativas cada vez mais eficazes no tratamento dos pacientes e cura da LMA. Contudo, é evidente que subpopulações das células neoplásicas possuem estratégias para resistirem e sobreviverem, ocasionando recidivas da doença. Há evidências emergentes de que as células-tronco leucêmicas (CTL) da LMA podem remodelar o nicho da MO em um microambiente permissivo à leucemia, suprimindo assim a hematopoiese normal. A interação complexa entre CTL e seu microambiente, incluindo moléculas de adesão, quimiocinas e citocinas, contribuem para a sobrevivência das CTL, resistência terapêutica e recaída da doença. Compreender essas interações é crucial para o desenvolvimento de drogas eficazes para superar a resistência a medicamentos.^(11,42,50,80,90,93,105,106) Além do desenvolvimento de terapias

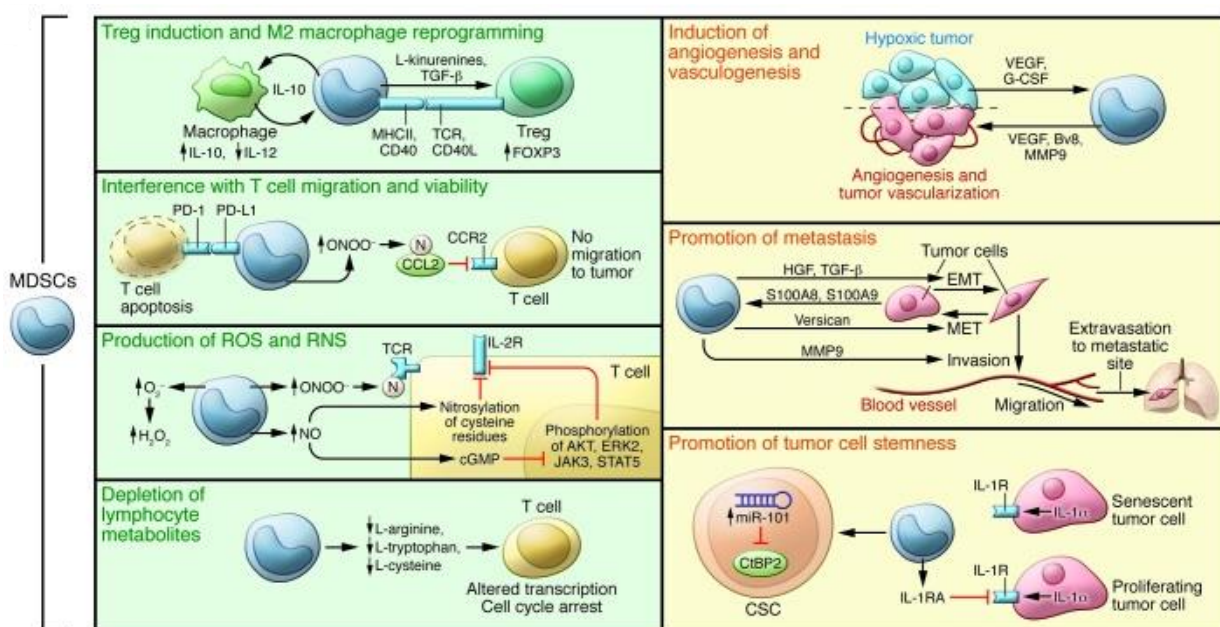
medicamentosas, o desenvolvimento de imunoterapias vem ganhando muito espaço, desde o desenvolvimento de inibidores de *checkpoint* imunológico por exemplo.^(42,90,107-110) No entanto, mais recentemente, o desenvolvimento de imunoterapias baseadas na modificação genética de células T para expressarem receptor antigênico quimérico (CAR – *chimeric antigen receptor*), e atualmente o desenvolvimento não só de células CAR-T mas também de células CAR-NK tem sido amplamente estudados e os dados atuais se mostram muito promissores.⁽¹¹¹⁻¹¹⁸⁾

É importante destacar que a MO é um microambiente altamente complexo e dinâmico. Esse ambiente formado por diversas células (inclusive as MDSC) e várias moléculas alocadas em nichos fornece importantes sinais regulatórios e controla estritamente as principais características do processo de hematopoese. Alterações e desregulações desse ambiente da MO favorecem o surgimento de doenças, como a LMA.^(11,119,120) A estratégia mais difundida e eficiente de escape imunológico provavelmente depende da capacidade da LMA em criar um ambiente tolerogênico amplo, alterando a hematopoese normal e promovendo a expansão de células mieloides através da liberação constante e progressiva de fatores derivados de tumor que incluem metabólitos, citocinas e quimiocinas.⁽³⁵⁾ Desvendar quais as funções das MDSC neste contexto seria de grande impacto para a sociedade.

Foi descrito que as MDSC suprimem as células T e regulam o microambiente inflamatório por múltiplos mecanismos. Dentre eles estão: indução de Treg e expansão de Th17, inibição da função das células NK, diminuição da ativação e proliferação de células T, comprometimento da migração da célula T e indução de tolerância antígeno-específica.^(18,37,121) Além de mecanismos utilizados por outros tipos de células imunorreguladoras (como citocinas e moléculas de superfície), as MDSC usam também como estratégia a ativação da ARG-1 e consequentemente produção de espécies reativas de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*), que têm papel imunossupressor quando produzidos em grandes quantidades.⁽¹⁸⁾ Adicionalmente, as MDSC modulam a produção de citocinas de macrófagos e promovem outras funções não imunes, como angiogênese tumoral e, eventualmente, metástase.⁽¹⁵⁾

A literatura descreve bem a interação de MDSC impulsionando a progressão tumoral. As MDSC inibem a resposta imune em camundongos portadores de tumor por quatro processos: I) MDSC dirigem a diferenciação de células imunes em direção a células reguladoras; II) MDSC interferem na migração e viabilidade de células T; III) MDSC alteram a aptidão das células T ativando a expressão intracelular de ARG-

1, óxido nítrico sintase 2 (NOS2) e NOX2 para produzir NO, ROS, e espécies reativas de nitrogênio (RNS – *reactive nitrogen species*); e IV) as MDSC esgotam metabólitos essenciais para a aptidão dos linfócitos T. As MDSC também podem promover angiogênese e vasculogênese tumoral via secreção de VEGF e MMP9. MDSC produzem níveis elevados de fator de transformação do crescimento beta (TGF- β – *transforming growth factor beta*) e fator de crescimento de hepatócitos (HGF- *hepatocyte growth fator*) em tumores primários, induzindo transição epitélio-mesenquimal (TEM), e secretam vesículas no nicho metastático, promovendo TEM. Finalmente, as MDSC mantêm o *stemness* das células tumorais tanto pela produção de IL-1RA como pela indução da regulação positiva do microRNA-101 nas células estaminais cancerígenas (Figura 4).⁽³⁵⁾



MDSC sustentam o crescimento, progressão e disseminação do tumor, promovendo disfunção imunológica (verde), mas também por mecanismos não-imunes (laranja). MDSC: células supressoras de linhagem mieloide.

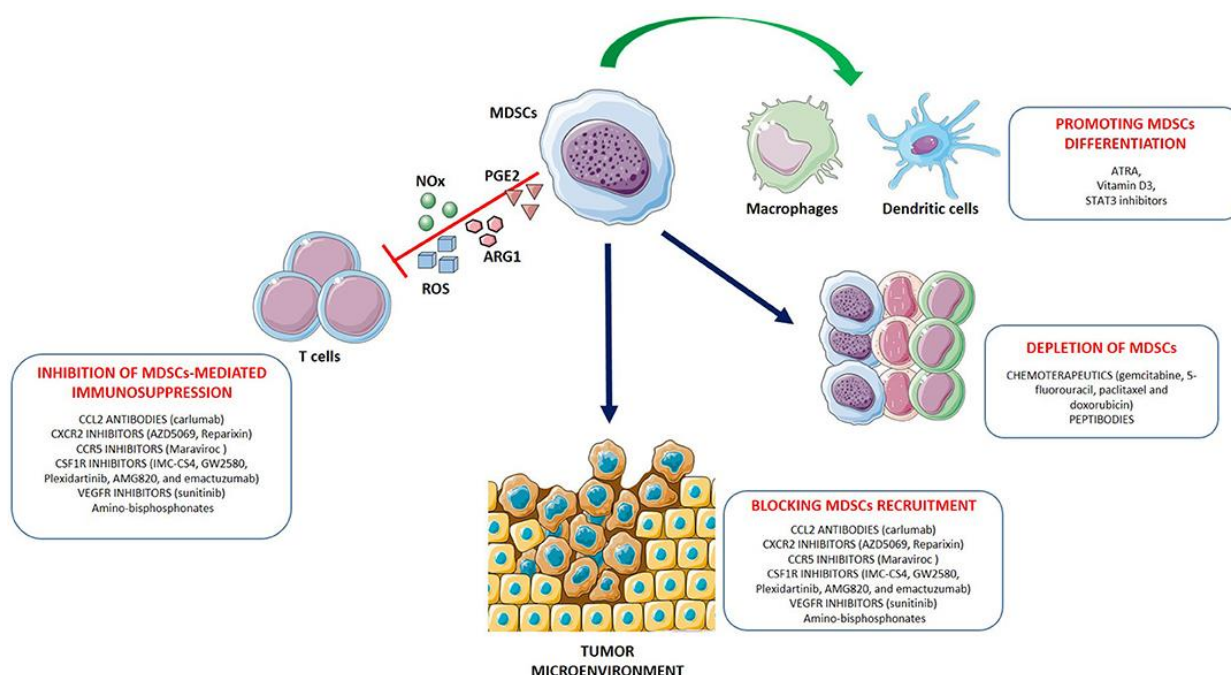
Fonte: Adaptado de Ugel S, De Sanctis F, Mandruzzato S, Bronte V. Tumor-induced myeloid deviation: when myeloid-derived suppressor cells meet tumor-associated macrophages. J Clin Invest. 2015;125(9):3365-76. Figure 3. TAM- and MDSC-dependent mechanisms driving tumor progression; p. 3369.⁽³⁵⁾

Figura 4. Mecanismos dependentes de MDSC que impulsionam a progressão tumoral

Outro mecanismo imunossupressor relacionado à função das MDSC é a expressão de moléculas de ponto de verificação imunológica negativa. Em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas, os MDSC interagem com a *T-cell immunoglobulin mucin 3* (TIM3) em células T através da expressão de Gal-9, que prejudica o efeito citotóxico das células CD8 T e está intimamente associado à resistência do paciente aos anticorpos monoclonais PD-1.⁽³⁹⁾

1.5 Terapias-alvo para MDSC

Uma vez que a MDSC faz parte do TME segundo achados da literatura para várias entidades tumorais, tem sido investigado o benefício de se abordar estas células supressoras como alvos terapêuticos.^(39,122-125) Inibir a diferenciação de MDSC no microambiente da MO, minimizar o recrutamento ou remover MDSC do microambiente podem ser abordagens eficazes no direcionamento de MDSC para o tratamento de doenças.^(39,122) No TME, as MDSC tornaram-se um dos principais obstáculos à imunoterapia, pois levam à resistência imunoterapêutica. Isto posto, as MDSC dentro do TME tornaram-se um dos principais alvos para melhorar a eficácia da imunoterapia tumoral, e estratégias terapêuticas tendo as MDSC como alvo foram desenvolvidas nos últimos anos^(122,126) e muitos estudos clínicos estão atualmente em curso a fim de investigar essas potenciais novas estratégias terapêuticas.^(126,127) As principais abordagens contra as MDSC incluem: (I) esgotar as populações de MDSC; (II) prevenir o recrutamento e migração de MDSC para o TME; (III) atenuar os mecanismos imunossupressores das MDSC pela regulação negativa da expressão de ARG-1, iNOS, *cyclooxygenase* (COX-2) e redução da geração de ROS; (IV) promover a diferenciação de MDSCs em células mieloides maduras não supressoras como macrófagos e células dendríticas.⁽¹²⁷⁾ A figura 5 abaixo traz alguns exemplos dessas estratégias terapêuticas.



Fonte: De Cicco P, Ercolano G, Ianaro A. The new era of cancer immunotherapy: targeting myeloid-derived suppressor cells to overcome immune evasion. *Front Immunol.* 2020;11:1680. Figure1. Strategies for myeloid-derived suppressor cells (MDSC) targeting; p. 4.⁽¹²⁷⁾

Figura 5. Estratégias para direcionamento de células supressoras mieloides

Alguns exemplos de tratamentos que afetam diretamente as MDSC são o uso de *Bisphosphonates*, que reduziu os números de MDSC e diminui sua capacidade de diferenciar-se em osteoblastos no MM.^(39,128) Também no MM, o uso de *Daratumumab* reduziu o número de MDSC CD38⁺.^(39,129) Já o *Ibrutinib* reduziu os números de MDSC e alterou a diferenciação de MDSC, induzindo células T *naïve* em células Th1 e longe das células Th2 na leucemia linfocítica crônica.^(39,130) Adicionalmente, o desenvolvimento de terapias celulares associadas à MDSC para a prevenção e tratamento da doença do enxerto contra hospedeiro (DECH – *graft versus host disease*) após o transplante de CTH é uma direção muito promissora.⁽³⁹⁾ Inclusive, Stokes et al.⁽¹³¹⁾ relataram o aprimoramento da função imunossupressor dos MDSC com o uso de *Bendamustine* no CTH, melhorando a imunossupressão em MDSC e reduzindo o DECH.^(39,131)

Além disso, o tratamento combinado com bloqueadores de *checkpoint* imunológico e MDSC direcionadas pode inibir efetivamente o desenvolvimento e a progressão do tumor. As terapias com bloqueadores de *checkpoint* imunológico e CAR-T proporcionaram mais vantagens para imunoterapia de câncer. Os inibidores de *checkpoint* imunológico têm como alvo moléculas de *checkpoint* imunológico, principalmente PD-1, ligante da proteína de morte celular programada (PD-L1) e CTLA-

4 para restaurar a função imune antitumoral. Embora algumas das proteínas de *checkpoint* (como PD-L1) sejam expressas nas superfícies do tumor e das MDSC e alguns pacientes com câncer apresentem bons efeitos clínicos de longa duração após o tratamento com bloqueadores de *checkpoint* imunológico, a resistência imunoterapêutica se desenvolve no estágio tardio da maioria dos tumores sólidos. As MDSC no TME induzidas por quimiocinas ou citocinas tornam-se o principal obstáculo para comprometer o efeito de bloqueadores de *checkpoint* imunológico.⁽¹²²⁾ A literatura relata que o tratamento único de imunoterapia no colangiocarcinoma maligno (CCA) não é eficaz devido ao TME complexo. Em um modelo de camundongos de CCA, o PD-L1 é encontrado principalmente derivado de TAM e MDSC, promovendo a progressão do tumor. A taxa de resposta para o tratamento anti-PD-1 é inferior a 10%. Uma das razões é que as populações de PMN-MDSC mediam a evasão imunológica, prejudicando a resposta das células T, e o bloqueio dos TAM sozinho não consegue retardar a progressão do tumor.⁽¹²²⁾ De fato, o tempo de sobrevivência em camundongos com CCA foi maior após o tratamento combinado de anticorpos específicos de PMN-MDSCs (ou seja, anticorpo anti-Ly6G, anticorpo anti-PD-1 e anticorpo anti-CSF1R), em comparação com o tratamento de anticorpos únicos.^(122,132) Estes e outros dados disponíveis apontam que combinar imunoterapias com terapias com MDSC como alvo são altamente promissoras.

Apesar da clara importância das MDSC no contexto do câncer e de outras patologias, há grandes limitações que dificultam sua investigação no âmbito experimental, por se tratar de populações raras, de difícil obtenção a partir de amostras de sangue periférico e de MO, caracterização complexa e difícil manutenção destas células em cultura. Sendo assim, é extremamente necessário que novas pesquisas viabilizem tais investigações com potenciais desdobramentos a favor do desfecho clínico dos pacientes. Este trabalho busca fornecer uma fonte alternativa de MDSC que pode ser obtida em laboratório a partir de uma linhagem celular imortalizada.

1.6 Linhagem celular THP1

A linhagem celular THP-1 consiste em células imaturas imortalizadas de linhagem celular monocítica humana derivada de um paciente com leucemia monocítica aguda. Essa célula tem uma característica de célula precursora que

possibilita sua ampla aplicação em pesquisas *in vitro* de monócitos e macrófagos, incluindo estudos sobre funções, mecanismos, vias de sinalização e transporte de drogas.⁽¹³³⁻¹³⁵⁾

As células THP-1 adquirem características fenotípicas e funcionais semelhantes aos macrófagos humanos primários após diferenciação usando forbol 12-miristato 13-acetato (PMA). Com estímulos para polarização em macrófagos M1 ou M2, que podem incluir lipopolissacarídeos (LPS), IL-4, IL-13 dentre outros, o fenótipo de maturação das células THP-1 diferenciadas pode ser caracterizado pela expressão de marcadores clássicos de macrófagos, aumento da adesão celular, aumento da fagocitose e liberação de mediadores inflamatórios.⁽¹³³⁻¹³⁷⁾ Essa característica precursora e plasticidade das células THP1 a tornam uma excelente candidata para o desenvolvimento de outros protocolos para gerar diferentes tipos celulares *in vitro*, como por exemplo as MDSC.

1.7 Objetivos

1. Desenvolver um protocolo de produção de células supressoras mieloides a partir da diferenciação da linhagem celular mieloide imatura THP-1;
2. Caracterizar imunofenotipicamente e funcionalmente as células supressoras mieloides derivadas da diferenciação de THP1;
3. Avaliar a capacidade das células supressoras mieloides derivadas da diferenciação de THP1 em contribuir para o escape imunológico de linhagens de leucemia mieloide aguda.

2 MÉTODOS

2.1 Aspectos éticos

Esse projeto é um estudo experimental registrado no Sistema Gerenciador de Projeto de Pesquisa (SGPP) com o número 3563-18 aprovado em 31 de outubro de 2018. Utilizamos linhagens celulares imortalizadas e também células isoladas de amostras de sangue obtidas após coleta de sangue de doadores voluntários. Foram incluídos voluntários apenas que concordaram em participar do estudo após explicação do projeto, tirar dúvidas e aplicação de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Este projeto é afiliado ao projeto SGPP: 3182-17 aprovado em 24 de outubro de 2017; CAAE: 78982417.0.0000.0071.

2.2 Linhagens celulares

Linhagens celulares humanas de LMA (THP-1 e HL60) foram utilizadas no projeto. As células foram mantidas em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute 16040* (RPMI-1640) com L-glutamina (RPMI 1640 contendo Glutamina, Phenol Red - Ref: 11875-093, Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SBF, Ref: 12657-029, Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA), antibióticos penicilina (100µ/mL) e estreptomicina (100µg/mL) (Ref: 15140-122, Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA) e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂, segundo a recomendação da *American Type Culture Collection* (ATCC).

2.3 Separação do PBMC a partir do sangue periférico

Foram coletados aproximadamente 50mL de sangue periférico de dois doadores saudáveis (10 tubos de EDTA de 4,9mL cada). O material a fresco foi processado por Ficoll, um reagente que faz a separação das células mononucleares por gradiente de densidade, para obtenção das células mononucleares do sangue periférico

(PBMC – *peripheral blood mononuclear cells*) de acordo com o protocolo do fabricante Sigma-Aldrich (USA).

Primeiramente foi realizada uma diluição do sangue periférico fresco com tampão fosfato-salina (PBS – *phosphate buffered saline*) na proporção 1:1. Em seguida adicionou-se 4mL de Ficoll em um outro tubo falcon, então o sangue foi colocado lentamente e suavemente no tubo contendo o Ficoll e submetido em seguida a centrifugação por 30min a 500rcf em temperatura ambiente (TA), sem desaceleração. O anel de PBMC foi coletado para um novo tubo, onde adicionou-se PBS para lavagem e centrifugado a 200rcf por 5 minutos em TA, fez-se a lavagem 2 vezes, ao final das lavagens foi ressuspensionado em meio de cultura RPMI-1640 e realizou-se contagem da quantidade de PBMC viável em Câmara de Neubauer (com *trypan blue*).

2.4 Isolamento das células NK

A separação das células NK foi realizada utilizando o sistema MACS e Human-CD56 MicroBeads (Miltenyi Biotec – Alemanha) de acordo com as recomendações e protocolo do fabricante. O PBMC isolado no item acima foi centrifugado por 10min a 300rcf. Então o sobrenadante (SN) foi descartado e as células foram ressuspensionadas em tampão PBS/EDTA na proporção de 1×10^7 células em 80μL de tampão. Após homogeneização das células, adicionou-se 20μL das *beads* CD56 (Miltenyi Biotec – Alemanha), as células foram homogeneizadas novamente e então incubadas por 15min em banho de gelo. Logo após a incubação, foi adicionado 1mL de tampão PBS/EDTA ao tubo o qual foi centrifugado durante 10min a 300rcf. O SN foi descartado e as células marcadas com as *beads* foram ressuspensionadas em 500μL do tampão PBS/EDTA. Realizamos a eluição da coluna MS (Miltenyi Biotec – Alemanha) que, resumidamente, consiste em passar 500μL de tampão duas vezes na coluna já previamente montada junto ao suporte magnético. Então, sem deixar a coluna de seleção positiva secar, foi adicionado o PBMC marcado com as *beads* na coluna. As células marcadas com as *beads* ficaram retidas magneticamente na coluna, enquanto as células não marcadas passam diretamente para um tubo para células depletadas. A coluna foi lavada novamente por 2 vezes com 500μL de tampão PBS/EDTA. Em seguida a coluna foi retirada do suporte magnético, e imediatamente encaixada em um tubo de coleta onde

foi realizado um *flush* com um embolo aplicado sobre a coluna com 1mL de tampão PBS/EDTA removendo da coluna apenas as células CD56+ purificadas do PBMC.

2.5 Diferenciação de células leucêmicas imortalizadas

Para desenvolvimento do protocolo de diferenciação, células THP1 foram incubadas com 50 ng/mL ou 100ng/mL de G-CSF (Filgrastim – Biosintética, Brasil) e 20ng/mL ou 40ng/mL de IL-4 (Sigma-Aldrich, SRP6172, USA). Foram utilizadas placas de 12 ou 24 poços. A densidade celular para o plaqueamento (dia 0) foi de 5×10^5 ou 1×10^6 células por poço. Foram avaliados diversos *timepoints*, incluindo os dias 3, 5, 6 e 7 de incubação, sendo que ao final do dia 3 as células foram repicadas (cada 1 poço foi transformado em 2, mantendo a proporção de volume final de meio que o tamanho do poço suporta) ou foi realizado a troca total do meio (centrifugação e ressuspensão do *pellet* de células em meio RPMI suplementado sem nova adição de estímulo para diferenciação). Ao final do protocolo e checagem da viabilidade celular por *trypan blue* em câmara de Neubauer as células foram coletadas para a realização das demais análises.

Para comparação entre as condições, os grupos foram denominados da seguinte forma: a) células THP1 não estimuladas/controle: THP1-WT; b) células THP1 estimuladas para diferenciação em perfil MDSC: THP1-MDSC-like.

2.6 Separação e purificação das células diferenciadas por *cell sorting*

Para avaliar a expressão gênica de células THP1-MDSC-like geradas em nosso protocolo de diferenciação, as células THP1 submetidas à estimulação para perfil MDSC-like foram coletadas da cultura e lavadas duas vezes com PBS. Então foram marcadas com anticorpos anti-CD11b, CD33 e CD16 todos da BD (Becton, Dickinson and Company, USA). Usando o citômetro MoFlo Astrios EQ Cell Sorter (Beckman Coulter, IN, USA), as células CD11b+/CD33+/CD16-/Lin1- foram coletadas e essa população foi denominada células THP1-MDSC-like, a população CD11b-/CD33-/CD16-/Lin1- foi coletada também para controle e denominada THP1-nCT.

2.7 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Com intuito de investigarmos a expressão de moléculas de superfície nas células leucêmicas, realizamos marcações para CD11b, CD33, CD45, CD34, CD11c, CD15, CD117, CD66b, CD16, CD56, CD206, CD80, CD163, CD274, Lin1, HLA-ABC, HLA-DR e CD14 (para informações sobre os anticorpos, clones diluições, e referências, consulte o quadro 1). Para tal avaliação, as células foram recolhidas da cultura e alocadas em seus tubos devidamente identificados, então foram lavadas duas vezes com PBS e centrifugadas por 300rcf durante 5min a 4°C. O SN foi descartado, as células foram homogeneizadas no PBS remanescente e a marcação foi realizada por 30min, no gelo e protegida da luz. Em seguida as células foram lavadas com PBS, centrifugadas por 5min a 200rcf e 4°C e ressuspensas em 300µL de PBS e então levadas para leitura no equipamento citômetro BD LSRFortessa™ X-20 *cell analyzer* (Becton, Dickinson and Company, USA). A estratégia de *gating* adotada foi: em FSC-A por SSC-A foi feito um *gate* selecionando todas as células leucêmicas e excluindo células mortas e *debris*, com posterior *gate* para exclusão de *dublets* em SSC-A por SSC-H, então deu-se seguimento a análise dos canais de cada marcação nos histogramas. Os resultados foram expressos através da representação dos histogramas e da intensidade média de fluorescência (MFI – *mean fluorescence intensity*) com as médias das amostras por grupo representadas nos gráficos.

Quadro 1. Informações sobre os anticorpos (diluições, clones, código de referência e empresa)

Marcador de Superfície (Anticorpo)	Diluição	Clones	Fluorocromo	Ref. #	Empresa
CD11b	1µL : 5x10 ⁵ cells	ICRF44	BB515	564517	BD
CD11c	1µL : 5x10 ⁵ cells	BM15	PE	337206	Biologend
CD14	2µL : 5x10 ⁵ cells	M5E2	PE	555398	BD
CD15	1µL : 5x10 ⁵ cells	HI98	BV650	564232	BD
CD16	1µL : 5x10 ⁵ cells	3G8	BV421	562878	BD
CD33	1µL : 5x10 ⁵ cells	WM53	BV711	563171	BD
CD34	2µL : 5x10 ⁵ cells	581	PE	555822	BD
CD45	1µL : 5x10 ⁵ cells	2D1	APC-H7	560178	BD
CD56	1µL : 5x10 ⁵ cells	NCAM16.2	PE-CF594	564849	BD
CD66b	1µL : 5x10 ⁵ cells	G10F5	AF-647	561645	BD
CD80	1µL : 5x10 ⁵ cells	L307.4	BV510	563084	BD
CD117	1µL : 5x10 ⁵ cells	104D2	APC	341096	BD
CD163	1µL : 5x10 ⁵ cells	GHI/61	BV421	562643	BD

continua...

...continuação

CD206	1 μ L : 5x10 ⁵ cells	19.2	BV480	746279	BD
CD274 (PD-L1)	1 μ L : 5x10 ⁵ cells	MIH1	BB515	564554	BD
HLA-DR	2 μ L : 5x10 ⁵ cells	G46-6	AF700	560743	BD
HLA-ABC	2 μ L : 5x10 ⁵ cells	G46-2.6	BV510	740172	BD
Lin1	2 μ L : 5x10 ⁵ cells	CD3= SK7; CD16= 3G8; CD19= SJ25C1; CD20= L27; CD14= MfP9; CD56= NCAM16.2	FITC	340546	BD
CD11b	5 μ L : 1x10 ⁶ cells	Bear1	PC5	IM3611	Beckman Coulter

AF: Alexa Fluor; APC: Allophycocyanin; BB: Brilliant Blue; BD: Becton, Dickinson and Company; BV: Brilliant Violet; FITC: Fluorescein isothiocyanate; Lin1: Anti-Human Lineage Cocktail 1; PC5: R-phycoerythrin-Cyanine 5; PE: phycoerythrin.

2.8 Análise da expressão gênica

2.8.1 Extração de RNA

A extração de RNA total foi realizada utilizando o trizol (Thermo Fisher Scientific, USA) de acordo com o protocolo do fabricante. Aproximadamente 1x10⁶ células foram lisadas com 1mL de trizol. Foi adicionado 200 μ L de clorofórmio (Sigma-Aldrich, USA), homogeneizou-se e deixou-se incubando por 3min em TA, em seguida foi realizada centrifugação 12000rcf durante 15min e a 4°C. Transferimos a fase aquosa que contém o RNA para um novo tubo devidamente identificado. Para a precipitação foi adicionado 500 μ L de isopropanol (Sigma-Aldrich, USA) à fase aquosa e homogeneizados, então as amostras ficaram incubando *overnight* no freezer -80°C. No dia seguinte as amostras foram descongeladas no gelo e foram centrifugadas a 12000rcf durante 10min e a 4°C. Descartamos o SN e deu-se seguimento a fase de lavagem adicionando 1mL de etanol 75% (Sigma-Aldrich, USA) seguida de homogeneização, esta etapa de lavagem foi realizada 2x. Após, para a fase de solubilização do RNA, ressuspendemos o *pellet* em 30 μ L de água livre de RNase e incubamos por 10min a 55°C. Imediatamente após incubação as amostras foram colocadas no gelo durante 5min para então dar-se seguimento a quantificação do RNA utilizando 1 μ L do mesmo no aparelho NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, USA) e o resultado foi expresso em μ g/ μ L. A qualidade do RNA foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 1% contendo formaldeído (Amersham Pharmacia Biotech, USA) como agente desnaturante.

2.8.2 Síntese de cDNA

Utilizando o kit Superscript III (Thermo Fisher Scientific, USA) e, seguindo as instruções do fabricante, submetemos 1µg de RNA livre de DNase à técnica de transcrição reversa para obtenção de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA). Adicionamos ao RNA 1µL de oligodT (50µM), 1µL de Anneling Buffer e água livre q.s.p 8µL. Após homogeneização no *vórtex* e *spin*, incubamos por 5min a 65°C no termociclador (Thermo Fisher Scientific, USA) e, imediatamente, colocamos no gelo durante 1min. Adicionamos 10µL do tampão First-Strand Reaction Mix e 2µL da enzima Super Script III/ RNase Out Enzyme Mix. Então as amostras foram homogeneizadas e incubadas no termociclador por 50min a 50°C, 5min a 85°C e então foram resfriadas a 4°C. Depois, as amostras de cDNA foram congeladas no *freezer* -20°C até o momento de realização da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

2.8.3 Reação de PCR quantitativo em tempo real

Para avaliação do nível de expressão dos RNAs mensageiros (RNAm) realizamos a técnica de PCR quantitativo em tempo real, que é um método baseado no acúmulo do produto da PCR monitorado pela fluorescência emitida pelo corante SYBR Green (Thermo Fisher Scientific, USA) que exibe uma alta fluorescência quando se liga a dupla fita de DNA. A fluorescência durante cada ciclo foi analisada quantitativamente através do QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA). A quantidade relativa de RNAm de cada amostra foi estimada usando-se um padrão de referência calculado a partir do Grupo Controle como a média do número de ciclos determinados pelo *threshold* de todas as amostras.^(138,139)

A sequência de todos os *primers* utilizados para os genes-alvo deste estudo encontram-se no quadro 2. Os *primers* foram desenhados utilizando o *software* Primer3⁽¹⁴⁰⁾ (Whitehead Institute for Biomedical Research, USA) seguidos de checagem no BLAST (National Library of Medicine, USA) e então foram adquiridos através da empresa Thermo Fisher Scientific (USA). Os resultados quantificados para os experimentos de cada grupo foram corrigidos pela expressão do controle endógeno gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Para cada amostra, os valores de *cycle threshold* (Ct) dos genes-alvo foram normalizados e o valor usado para demonstrar a

expressão relativa dos genes-alvo foi calculado utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t(141)}$ e foram expressos em unidades arbitrárias.

Quadro 2. Sequência de *primers*

Nome	Sequência*	Nome	Sequência*
GAPDH	F: AATCCCATCACCATCTTCCA R: TGGACTCCACGACGTA CTCA	ARG-1	F: TCCTTTCTCAAAGGGACAGC R: AATACTGTAGGGCCTTCTTCCA
TNF-α	F: TGCTTGTTCTCAGCCTCTT R: ATCACTCCAAAGTGCAGCAG	NOS2	F: CCAGTGACACAGGATGACCTT R: ATTCTGCTGCTTGCTGAGGT
TGF-β	F: CGACTACTACGCCAAGGAGGT R: GATTTCTGTTGTGGGTTTCCA	GAL-9	F: CCGAGGAGAGGAAGACACAC R: CAGGAAGCAGAGGTCAAAGG
IL-1β	F: GAGCTCGCCAGTGAAATGAT R: GGCCATCAGCTTCAAAGAAC	PD-L1 (CD274)	F: CATGACCTACTGGCATTGCT R: CCTTGGGAACCGTGACAGTA
IL-6	F: GGCTGAAAAAGATGGATGCT R: TTTCACCAGGCAAGTCTCCT	CD122 (IL2RB)	F: GGACTTCAAGCCCTTTGAGA R: GTGGACAACCTTGAGGGAGA
IL-8	F: GCTCTGTGTGAAGGTGCAGTT R: TGTGGTCCACTCTCAATCACTC	CD68	F: AGGCTGGCTGTGCTTTTCT R: TTTTGTGAGGACAGTCATTCC
IL-10	F: CTGGGGGAGAACCTGAAGA R: GGCCTTGCTCTTGTTTTTAC	CD206 (MRC1)	F: GGGCAGTGAAAGCTTATGGA R: TCTGGTAGGAAACGCTGGTC
CXCL10 (IP-10)	F: CCATTCTGATTTGCTGCCTTA R: TGATGCAGGTACAGCGTACAG	S100A8	F: GCTAGAGACCGAGTGTCTCTCA R: AGACGTCTGCACCCTTTTTTC
CCL18	F: CCCTCCTTGTCTCGTCTG R: CAACTTGTGCACAGGAGCAG	S100A9	F: AAAGAGCTGGTGCGAAAAGA R: GTCCAGGTCCTCCATGATGT
CCL22	F: GTGGCGCTTCAAGCAACT R: ACGCTGTCTTCCATGTTGG		

* Primers foram especificados no sentido 5' para 3'. F- forward primer (left primer); R- reverse primer (right primer); GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; TGF- β : fator de transformação do crescimento beta; IL-1 β : interleucina 1 beta; IL-6: interleucina 6; IL-8: interleucina 8; IL-10: interleucina 10; CXCL10: *C-X-C motif chemokine ligand 10*, também conhecido como proteína induzível por interferon-gama (IP-10); CCL18: *C-C motif chemokine ligand 18*; CCL22: *C-C motif chemokine ligand 22*; ARG-1: arginase 1; NOS2: óxido nítrico sintase 2; GAL-9: galectina 9; PD-L1 (CD122): proteína de morte celular programada 1; CD122 (IL2RB): subunidade beta do receptor de interleucina 2; CD68: *cluster* de diferenciação 68; CD206 (MRC1): receptor de manose C-tipo 1; S100A8: proteína A8 de ligação ao cálcio S100; S100A9: proteína A9 de ligação ao cálcio S100.

2.9 Dosagem de citocinas e quimiocinas produzidas pelas células leucêmicas

Foi utilizado o kit *LEGENDplex Human Macrophage/Microglia Panel 13-plex* (BioLegend, USA) para quantificação de múltiplos alvos de citocinas simultaneamente em SNs de cultura.

Ao término do protocolo de diferenciação, as células foram centrifugadas em 300rcf por 5min a TA, então o SN de cultura foi recolhido e armazenado em *freezer* -80°C. No dia da dosagem das citocinas, o SN foi centrifugado por 10min em 1000rcf a 4°C. Adicionou-se 25µL de cada SN na placa 96-wells fundo U juntamente com 25µL de tampão (*Assay Buffer* do kit) e 25µL de *beads*. A placa com as amostras foi alocada no *shaker* a 800rpm durante 2h e TA. Em seguida, a mesma foi centrifugada por 250rcf durante 5min a 4°C, o SN foi descartado e os poços foram lavados com 200µL de tampão de lavagem (*Wash Buffer* do kit), então centrifugou-se novamente por 250rcf durante 5min. O SN foi descartado e adicionamos 25µL de anticorpo de detecção (biotinilado), colocamos a placa no agitador a 800rpm por 1h em TA. Sem lavar, adicionou-se 25µL de estreptavidina conjugada com ficoeritrina (SA-PE), e incubou-se por 30min em TA no agitador a 800rpm. Após esta incubação lavamos os poços com 200µL de tampão de lavagem e centrifugamos por 5min a 250rcf, descartamos o SN, adicionamos 200µL de tampão de lavagem e a placa foi lida no equipamento BD FACSCalibur™ (Becton, Dickinson and Company, USA). Todo o protocolo foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante. Os dados foram analisados com o *software* da empresa fabricante do kit (LEGENDplex™ – Data Analysis Software; BioLegend, USA) e os resultados foram expressos em concentração pg/mL.

2.10 Ensaio de proliferação de linfócitos

2.10.1 Preparo e marcação das amostras para ensaio de proliferação

Após a obtenção das PBMC do sangue periférico de um doador saudável (descrito no item 2.3), o preparo das Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28 (Thermo Fisher Scientific, USA), e os volumes a serem utilizados seguiram as instruções do fabricante. Foi utilizada a proporção de 1:1 *beads*:células.

Após preparação das Dynabeads, foi realizada a marcação do PBMC com CFSE (CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit - Thermo Fischer Scientific, USA) na proporção de 5mM de CFSE para cada 1×10^6 células de PBMC diluídas em PBS, seguindo as instruções do fabricante. A solução PBMC-PBS-CFSE foi incubada a 37°C em banho-maria por 15 minutos no escuro. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas e ressuspensas em meio de cultura RPMI suplementado com SBF 10%, L-glutamina 1mM e antibióticos penicilina/estreptomicina e garamicina, seguindo protocolo de ensaio de proliferação de linfócitos.

2.10.2 Ensaio de proliferação

As células previamente marcadas com CFSE foram plaqueadas 1×10^5 células/poço em uma placa de 96 poços com 150µL do volume parcial, considerando IL2 (30U/mL), Dynabeads CD3/CD28 em 1:1 proporção (*beads* por célula) e meio de cultura suplementado, e então incubados em estufa por 20min. Após o período de incubação, os SNs de interesse foram adicionados, completando o volume total do poço para 200µL. Usamos sempre as seguintes proporções: SN 25% do volume total, ou seja, 50µL de meio de cultura suplementado para condição controle, 50µL de SN de células THP1-WT e 50µL de SN THP1-MDSC-like. O restante do volume do poço consiste em meio com PBMC marcado com CFSE e com as Dynabeads CD3/CD28. A proliferação foi avaliada pela análise CFSE por citometria de fluxo no citômetro BD LSRFortessa™ X-20 *cell analyzer* (Becton, Dickinson and Company, USA) no dia 0 e após 5 dias de cultura de acordo com as instruções do fabricante.

2.11 Ensaio de *killing* células leucêmicas versus NK

Células leucêmicas foram cocultivadas com células NK CD56⁺ provenientes da separação por beads na proporção 2 células NK para cada 1 célula leucêmica por 16 horas, na presença ou não do SN de células THP1-MDSC-like.

2.11.1 Avaliação da apoptose

A avaliação da apoptose foi realizada utilizando-se o *kit Annexin V/Dead Cell Apoptosis* (Thermo Fisher Scientific, USA). Após o período de incubação do experimento, as células foram lavadas em PBS gelado, centrifugadas a 300rcf durante 5min. O SN foi descartado e as células foram ressuspensas em 100µL de tampão [1x] de anexina fornecido no *kit (Annexin Binding Buffer)*. Após essa etapa, foram adicionados 5µL de anexina V/Alexa Fluor 488 para cada 100µL de suspensão de células. As amostras foram incubadas protegidas da luz durante 15min, em seguida foram adicionados 400µL de tampão de anexina e homogeneizou-se as amostras gentilmente. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo utilizando o citômetro de fluxo Attune™ NXT (Life Technologies – Thermo Fisher Scientific, USA). Após estratégia de *gating* em todas as células leucêmicas, excluindo células NK em FSC-A por SSC-A, com posterior *gate* para exclusão de *dublets* em FSC-A por FSC-H, foi realizado um *gate* no histograma de acordo com a marcação realizada para anexina V para selecionar a população positiva para anexina V. Os resultados foram expressos em % de anexina V⁺.

2.12 Análise estatística

Os dados foram descritos por meio de medidas de tendência central e dispersão, e foi estabelecido um erro $\alpha=5\%$, ou seja, os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p<0,05$. Para comparação entre 2 grupos realizamos teste *t* de Student, e quando foram 3 grupos ou mais, foi utilizada análise de variância (ANOVA) para a comparação das médias entre os grupos e o teste de comparações múltiplas de Tukey para comparar todos os grupos entre si utilizando o *software* GraphPad Prism 6.0®.

3 RESULTADOS

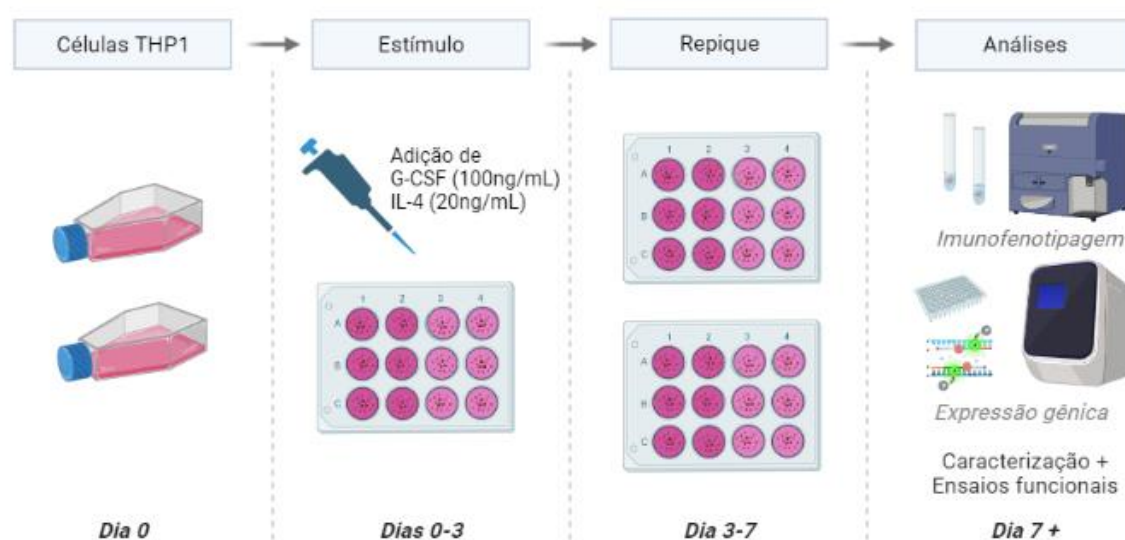
3.1 Protocolo de diferenciação

Para alcançar um perfil de células mieloides supressoras a partir do precursor THP1, foram testadas diferentes combinações de dose de citocinas, tempo de incubação e quantidade de células.

Quadro 3. Resumo da fase de padronização do protocolo de diferenciação

Densidade Celular THP1 [células/mL]	G-CSF [ng/mL]	IL-4 [ng/mL]	Tempo de estímulo	Tamanho da Placa	Resultados observados
1x10 ⁶	100	20	3 + 3 dias	24 poços	Muitas células mortas no 3º dia. Interrupção do teste no 3º dia.
1x10 ⁶	200	40	3 + 3 dias	24 poços	Muitas células mortas no 3º dia. Interrupção do teste no 3º dia.
5x10 ⁵	100	20	3 + 2 dias	12 e 24 poços	Viabilidade celular baixa no 3º dia nas placas de 24 poços. Tentou-se centrifugar para manter em cultura só as células viáveis mas elas apresentaram viabilidade ainda baixa ao final de 5 dias
5x10 ⁵	200	40	3 + 2 dias	12 e 24 poços	Viabilidade celular muito baixa no 3º dia nas placas de 12 e de 24 poços. Interrupção do teste no 3º dia.
5x10 ⁵	100	20	3 + 3 dias	12 poços	Observamos que ao centrifugar completamente as células no 3º dia e trocar o meio de cultura em sua totalidade sem adicionar mais estímulos e mantendo em cultura por mais 3 dias, o processo de diferenciação era interrompido e afetávamos também a viabilidade destas células.
5x10 ⁵	100	20	3 + 4 dias	12 poços	Com realização de um repique no 3º dia de forma que as células não são centrifugadas, mas apenas o volume de meio com as células em diferenciação é dividido em 2 poços, adicionando então a este poço agora com aproximadamente 500uL mais 500uL meio de cultura suplementado para completar o volume total de 1mL de meio sem adição de mais estímulos apresentou resultados satisfatórios de viabilidade e de imunofenotipagem.

Após os testes acima relatados para padronização em relação a quantidade de células THP1 utilizadas no plaqueamento, concentração de G-CSF e IL-4, e tempo de incubação, o protocolo final (Figura 6) desenvolvido e padronizado contempla o plaqueamento de 5×10^5 células THP1 por poço (placas de 12 poços), a estimulação por 3 dias com G-CSF (100ng/mL) e IL-4 (20ng/mL) em um volume total de 1mL meio de cultura, seguida de repique e cultivo por 4 dias adicionais (nos 500uL de meio “consumido” com as células, foram adicionados mais 500ul meio RPMI suplementado com SBF e Antibiótico, mas sem adição de mais estímulos para evitar que a alta confluência de células leve a privação de nutrientes) Após este período, as células foram recuperadas e analisadas.

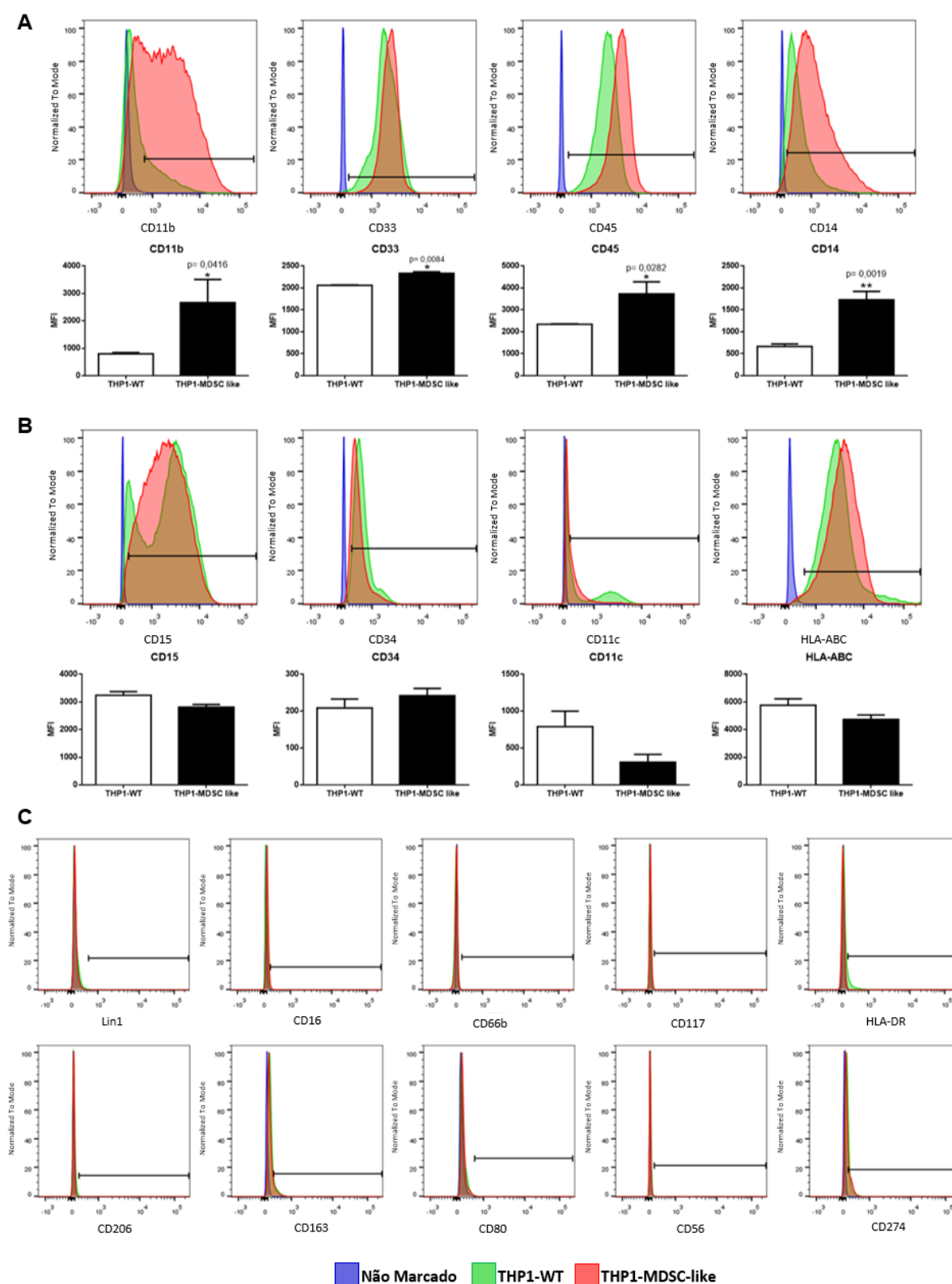


Elaborada com a ferramenta BioRender. Available from: <https://biorender.com/>

Figura 6. Protocolo padronizado da diferenciação das células THP1 em células supressoras mieloides

3.2 Imunofenotipagem das células THP1 estimuladas e não estimuladas

Observou-se que as células THP1-MDSC-like apresentaram expressão significativamente aumentada dos marcadores de superfície CD11b, CD33, CD14 e CD45 (Figura 7A). As células THP1-WT e as células THP1-MDSC-like apresentaram perfil semelhante de expressão dos marcadores CD15, CD34, CD11c e HLA-ABC (Figura 7B). Os marcadores de superfície Lin1, CD56, CD66b, CD117, HLA-DR, CD206, CD163, CD80, CD56 e CD274, não foram expressos nas populações, estão representados na figura 7C.



A: marcadores de superfície que apresentaram aumento de expressão representados pelos histogramas na primeira linha e abaixo os gráficos em *mean fluorescent intensity* (MFI). B: marcadores de superfície que não apresentaram alteração na expressão. C: histogramas dos marcadores de superfície que não foram expressos em ambos os grupos. Histogramas: THP1 não marcadas/controle negativo (azul), THP1-WT (verde) e THP1-MDSC *like* (vermelho). Gráficos de MFI: Células THP1 não tratadas (THP1-WT: branca) e células THP1 estimuladas para diferenciação (THP1-MDSC *like*: preto). Este experimento é representativo de cinco experimentos independentes e com três réplicas biológicas ($n=3$) para cada grupo; Teste estatístico: Teste t de Student.

Figura 7. Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Em nossa abordagem para avaliação dos marcadores imunofenotípicos procuramos contemplar todos os marcadores que a literatura aponta estarem relacionados ao perfil de células MDSC, bem como das próprias THP1 e podemos observar de forma comparativa no quadro 4 abaixo que nossas THP1-MDSC-like apresentam perfil compatível com a literatura. Adicionalmente, avaliamos outros marcadores de superfície para nos certificar que a diferenciação não se desviou para um perfil macrofágico do tipo M1 (CD80 e HLA-DR), ou M2 (CD163 e CD206), ou até mesmo um perfil de células dendríticas (CD11c e HLA-DR).

Quadro 4. Caracterização das células supressoras de linhagem mieloide de acordo com a literatura

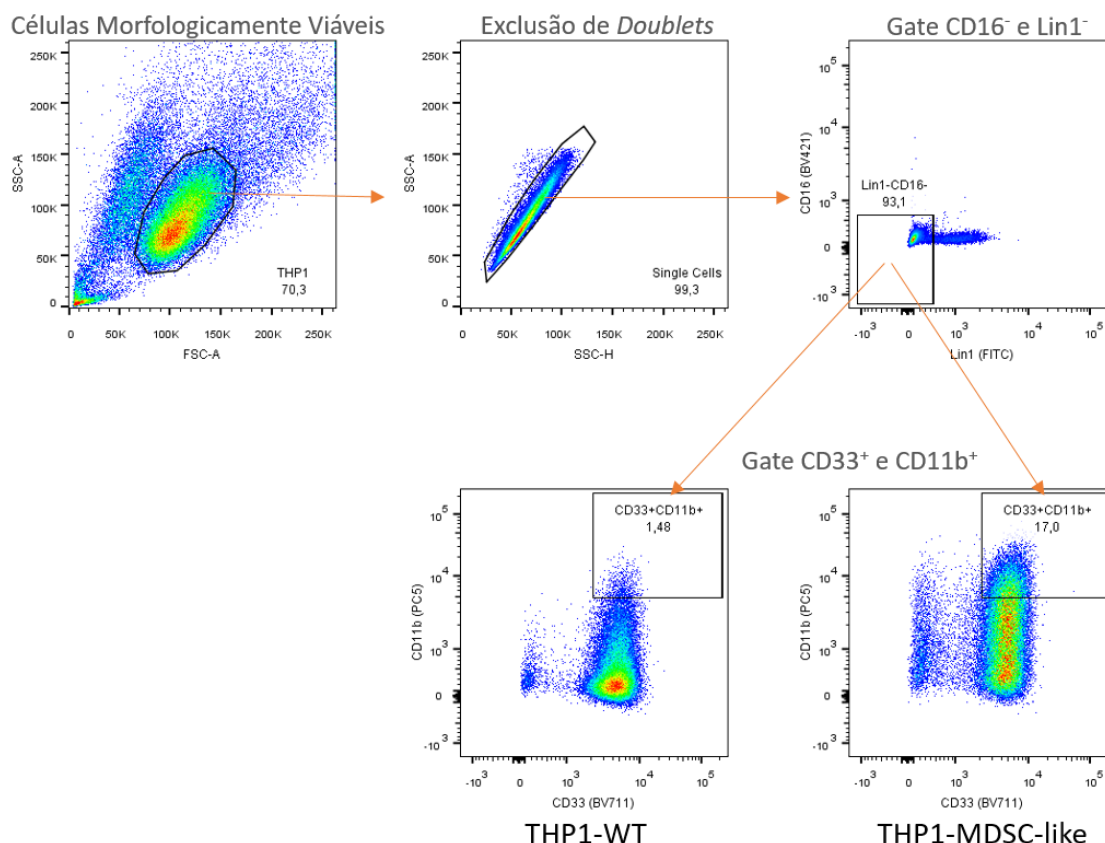
Marcadores de superfície	Fenótipo das MDSC descrito na literatura				THP1-MDSC-like versus THP1-WT	CL	Referências
	MO-MDSC ou M-MDSC	PMN-MDSC ou G-MDSC	i-MDSC ou e-MDSC	MDSC			
CD11b	(+)	(+)	(+)	(+)	(+) aumentadas	✓	(6,7,16,17,35,43,142-145)
CD11c					(-) inalteradas	!	
CD14	(+)	(-)			(+) aumentadas	✓	(6,7,16,17,35,142-147)
CD15	(-)	(+)			(+) inalteradas	✓	(6,7,17,35,142-147)
CD16			(-)	(-)	(-) negativas	✓	(148,149)
CD33	(+)	(+) ou <i>high</i>	(+)	(+)	(+) aumentadas	✓	(6,7,13,16,17,35,43,142,144,146)
CD34			(+)		(+) inalteradas	✓	(35)
CD45		(+)	(+)		(+) aumentadas	✓	(35)
CD56				(-)	(-) negativas	✓	(147)
CD66b		(+)			(-) negativas	✗	(16,35,143-145)
CD80					(-) negativas	!	
CD117			(+)		(-) negativas	✗	(35)
CD163					(-) negativas	!	
CD206					(-) negativas	!	
CD274					(-) negativas	!	
HLA-DR	(-) ou <i>low</i>	(-) ou <i>low</i>	(-)		(-) negativas	✓	(6,7,16,17,35,43,142-147)
HLA-ABC					(+) inalteradas	!	
Lin1	(-)	(-)	(-)		(-) negativas	✓	(7,16,35,145,146)

CL: comparação com a literatura; (+) aumentadas representam os marcadores que tiveram sua expressão aumentada nas THP1-MDSC-like em comparação com THP1-WT (-) inalteradas representam os marcadores que mantiveram suas expressões em THP1-MDSC-like em comparação com THP1-WT; (-) negativos representam os marcadores que foram negativos para ambas THP1-WT e THP1-MDSC-like; símbolo em verde que apresenta um sinal de certo (✓) representa os marcadores encontrados corroborando a literatura; símbolo em vermelho que apresentam um sinal de errado (✗) representa os marcadores encontrados discrepando da literatura; e os símbolos em amarelo que apresentam um sinal de exclamação (!) representam os marcadores que não foram descritos na literatura com relação à imunofenotipagem de MDSC.

3.3 Seleção da população THP1-MDSC-like (*sorting*)

Além dos marcadores proteicos de superfície, a literatura descreve uma série de genes relacionados ao perfil MDSC, e sua funcionalidade imunorreguladora, além destes, levamos em consideração também, alguns genes relacionados a outros perfis celulares como o perfil macrófágico e o dendrítico. Para realizarmos tal avaliação da expressão gênica das células submetidas ao nosso protocolo de diferenciação, realizamos antes uma purificação dessa população através da seleção por citometria de fluxo (*sorting*).

A partir destes dados de imunofenotipagem, deu-se seguimento ao processamento das células para *sorting* por citometria a fim de purificar as células que apresentaram um fenótipo semelhante ao das MDSC descrito na literatura. Para o *sorting*, foi considerado como THP1-MDSC-like a população de células negativas para CD16 e Lin1 e positivas pra CD11b e CD33, uma vez que estes marcadores refletem a população de interesse (Figura 8). Foram coletadas duas populações de células, as que foram CD11b⁺CD33⁺CD16⁻Lin1⁻ chamadas de THP1-MDSC-like que representam a população que apresentaram diferença em seus marcadores de forma consistente com o que há descrito na literatura para as células MDSC. Utilizando essa estratégia de seleção, obtivemos um rendimento médio de aproximadamente 20% de células THP1 com imunofenotipagem semelhante às MDSC e com um grau de pureza de 95%. E as células CD11b^{-/low}CD33^{-/low}CD16⁻Lin1⁻ chamadas de THP1-CT-n como controle de células THP1 que foram estimuladas, porém não se diferenciaram em um fenótipo de MDSC (Figura 8).



Seleção das células vivas seguida de exclusão de *dublets*, aplicação de *gate* nas células duplo negativas para CD16 (BV421) e LIN1 (FITC) e seleção da população duplo positivo pra CD33 (BV711) e CD11b (PC5). Este experimento é representativo de três experimentos independentes.

Figura 8. Estratégia de *sorting* utilizada para selecionar as células THP1-MDSC-like

Estas duas populações purificadas foram em seguida colocadas no Trizol para extração de RNA e posterior construção de cDNA e amplificação em RT-qPCR para avaliação da expressão gênica.

3.4 Avaliação da expressão gênica das populações purificadas

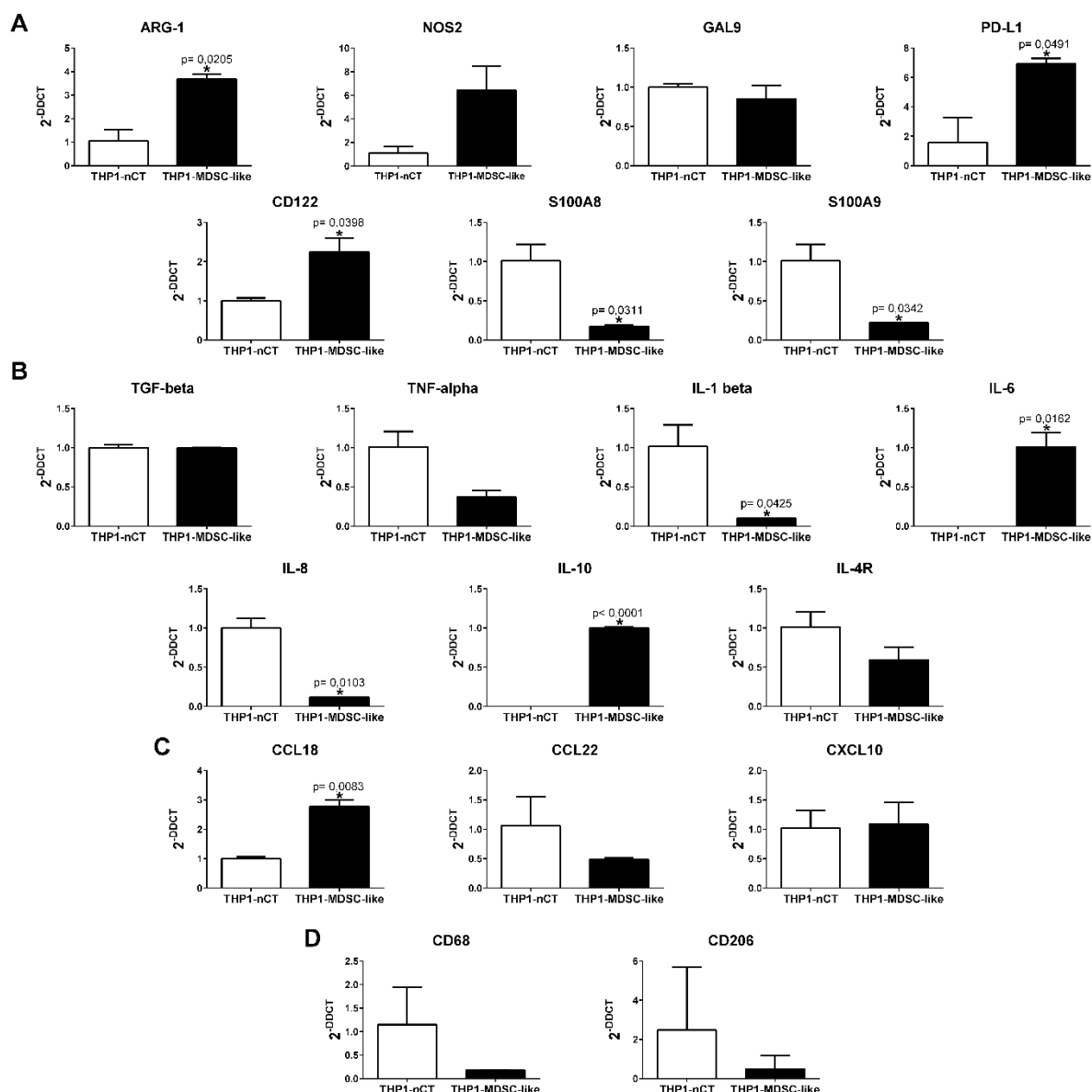
Em relação aos genes relacionados ao perfil de MDSC, as células THP1-MDSC-like sorteadas apresentaram um aumento significativo na expressão gênica de ARG-1, enquanto a NOS2 permaneceu inalterada e a S100A8 e S100A9 foram diminuídas em comparação com as células THP1-nCT (Figura 9A).

Analizamos a expressão gênica de citocinas e quimiocinas mais comumente relacionadas ao perfil mieloide supressor, observamos aumento na expressão de IL-6, IL-10 e CCL18 nas células THP1-MDSC-like enquanto a expressão

de IL-1 beta e IL-8 foram diminuídas nas mesmas. Não foram observadas diferenças entre THP1-nCT e THP1-MDSC-*like* quanto à expressão gênica de TGF- β , TNF- α , CXCL10 e CCL22 (Figura 9B).

Adicionalmente, avaliamos a expressão de três importantes genes imunomoduladores e observamos um aumento na expressão gênica de PD-L1 e CD122 nas células THP1-MDSC-*like*, enquanto a expressão gênica de galectina 9 (GAL-9) não alterou em relação a THP1-nCT (Figura 9C).

Novamente nos preocupamos com a possibilidade de desvio da diferenciação das células THP1 do perfil mieloide supressor para o perfil macrofágico e pudemos observar que não houve alteração na expressão gênica de CD68 e CD206 (Figura 9D).



A: marcadores funcionais das MDSC. B: citocinas e quimiocinas imunoreguladoras. C: genes imunomoduladores D: marcadores de macrófagos M1 e M2. Gráficos: colunas brancas representam as células THP1 sorteadas que não foram positivas para CD11b e CD33 (THP1-CT-negativo) e as colunas pretas representam as células THP1 sorteadas que foram positivas para CD11b e CD33 (THP1-MDSC-like). Este experimento é representativo de três experimentos independentes e com duas réplicas biológicas (n=2) para cada grupo; Teste estatístico: Teste t de Student.

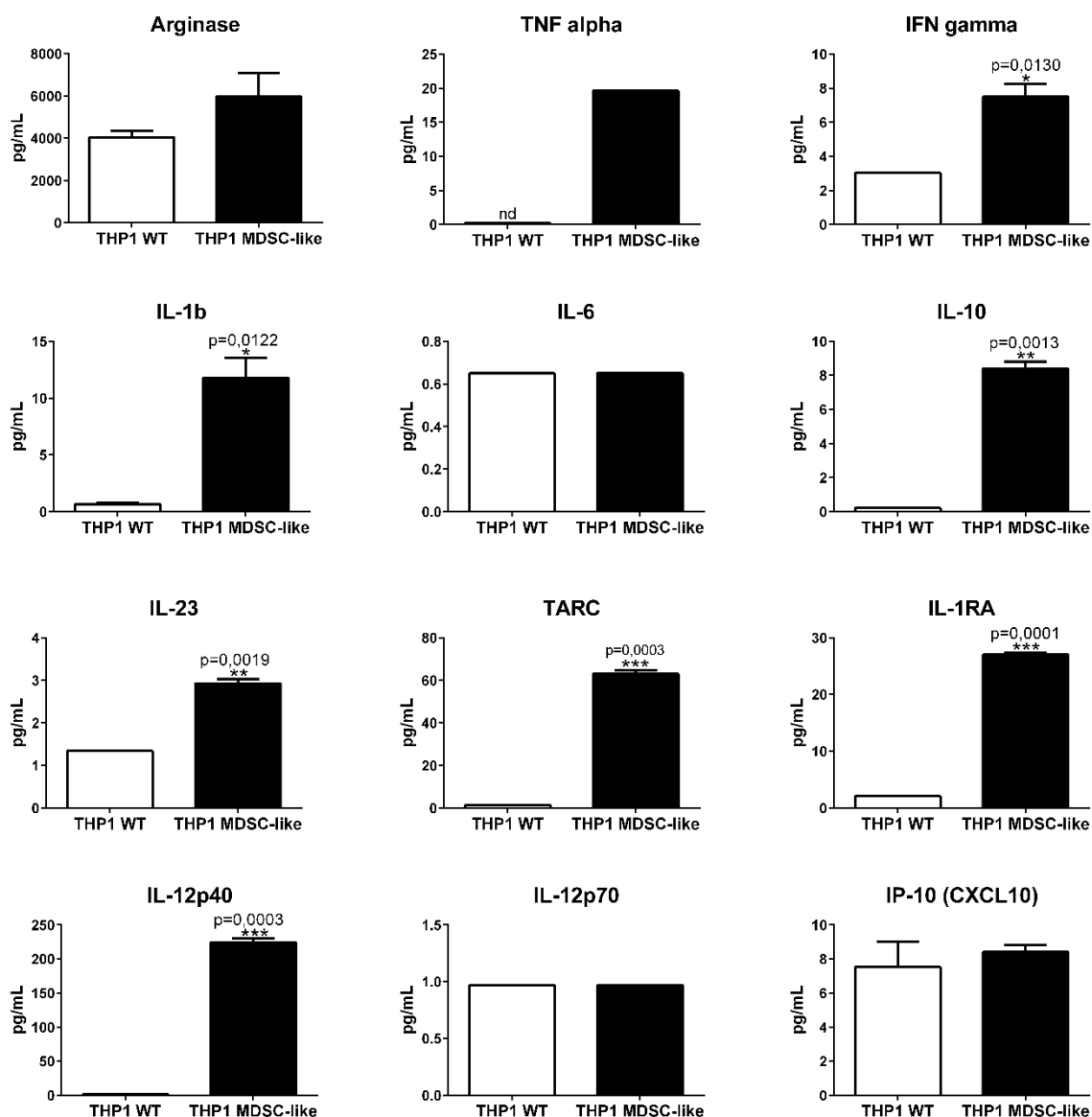
Figura 9. Expressão gênica das células THP1-nCT e THP1-MDSC-like após o *sorting*

Estes resultados de expressão gênica corroboram nossos achados imunofenotípicos que em conjunto confirmam o sucesso do nosso protocolo de diferenciação.

3.5 Avaliação da secreção de citocinas e quimiocinas imunrregularórias

A literatura descreve que MDSC funcionais secretam citocinas e quimiocinas para imunorregular o microambiente, sendo assim, investigamos tal capacidade em nossas células diferenciadas.

As células secretam citocinas para o SN de cultura celular e através da dosagem deste SN observamos um aumento na secreção de TNF- α , IFN- γ , TARC, IL-1b, IL-10, IL-23, IL-1R α e IL-12p40 pelas células THP1-MDSC-*like*, como demonstrado na figura 8. E não houve diferença entre as células THP1-WT e as THP1-MDSC-*like* na secreção de ARG, IL-6, IL-12p70 e IP-10 (Figura 10).



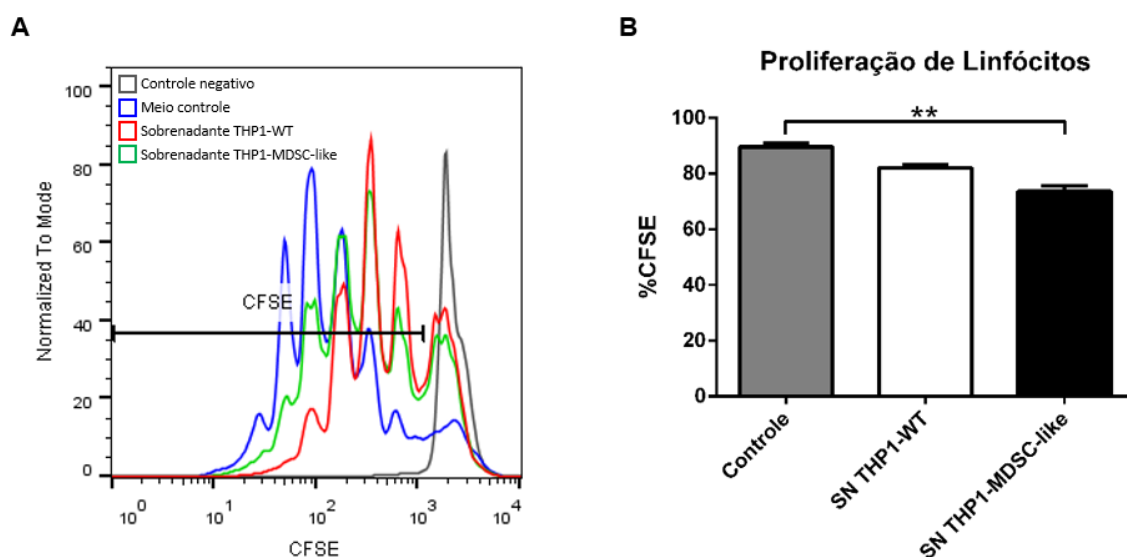
Células THP1 não estimuladas (THP1-WT: preto) e células THP1 estimuladas para diferenciação (THP1-MDSC-like: branco). Este experimento é representativo de três experimentos independentes e com duas repetições biológicas (n=2) para cada grupo; Teste estatístico: Teste t de Student; nd= não detectado.

Figura 10. Citocinas e quimiocinas imunoregulatórias detectadas no sobrenadante de cultura celular após protocolo de diferenciação

3.6 Avaliação do efeito do SN de THP1-MDSC-like sob a proliferação de linfócitos

Através de mecanismos parácrinos as MDSC são capazes de modular a proliferação linfocitária no TME. Para avaliar a capacidade de nossas MDSC em exercer tal papel nós realizamos ensaios de proliferação linfocitária na presença ou não de SN da cultura de nossas THP1-MDSC-like. Como podemos observar na figura 11, de fato nossas THP1-MDSC-like secretam fatores solúveis capazes de inibir a

proliferação de linfócitos estimulados pelo complexo CD3/CD28 o que reafirma o comportamento imunossupressor das células derivadas do nosso protocolo.



A: cocultura de células NK *versus* HL60. B: cocultura de células NK *versus* THP1. Gráficos das populações, com os histogramas abaixo representando a população de células positivas para anexina V (Alexa Fluor 488) com gráfico representativo da porcentagem de *killing*. Este experimento é representativo de dois experimentos independentes e com quatro réplicas biológicas cada (n=4) para os grupos SN-WT e SN MDSC-like e três réplicas biológicas (n=3) para o grupo controle; Teste estatístico: One-Way ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey; ** p<0,05. SN = sobrenadante.

Figura 11. Ensaio de proliferação linfocitária

3.7 Avaliação do efeito do do SN de THP1-MDSC-like sob as células NK e células leucêmicas (ensaio do *killing*)

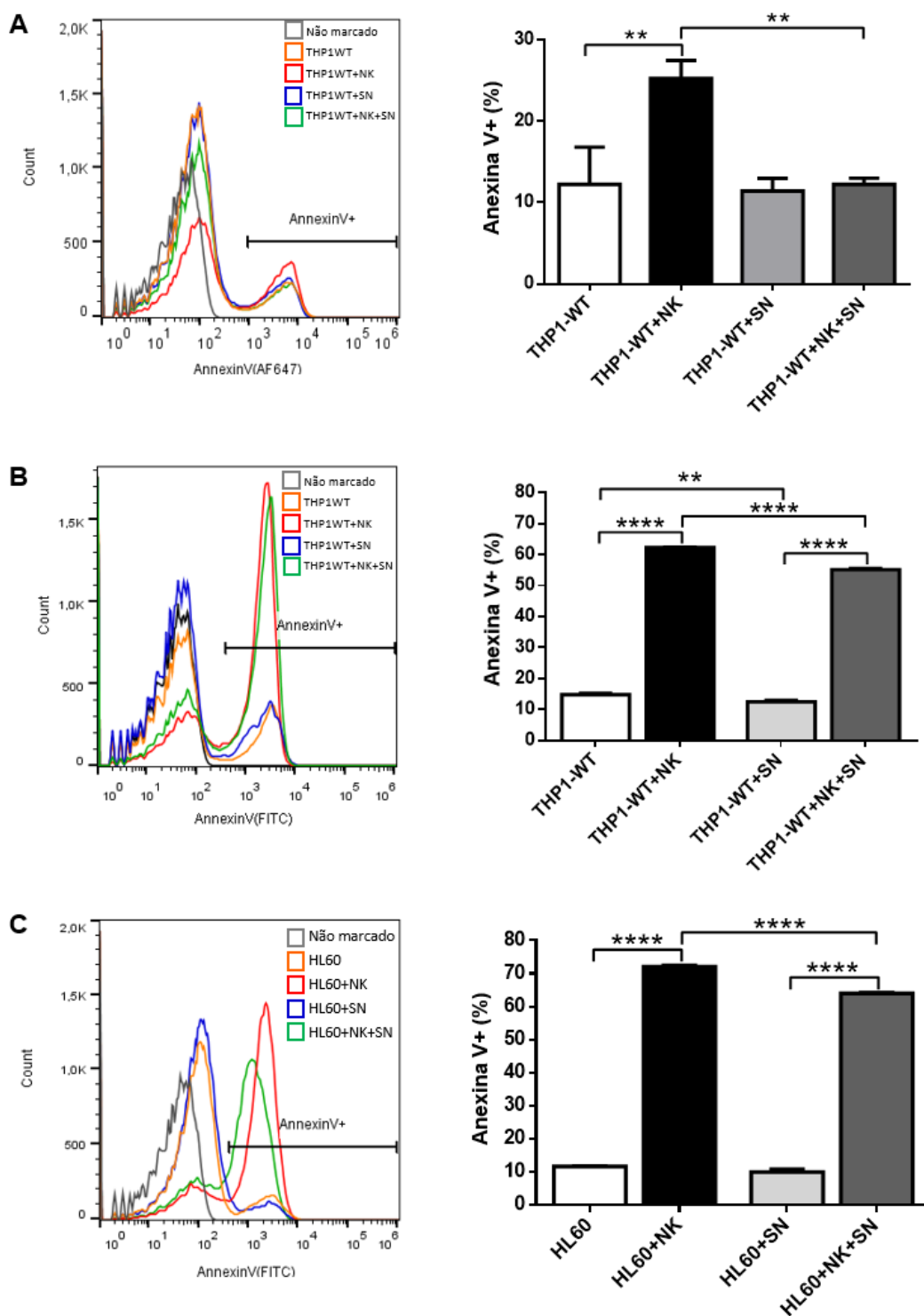
Finalmente, espera-se que MDSC funcionais sejam capazes de modular negativamente o *killing* executado por células NK. Especialmente no contexto de nosso projeto, no qual NK são células efectoras importantes na eliminação de células leucêmicas e tem também relações com as células MDSC no contexto da LMA. Para completar essa descrição funcional dessas MDSC derivadas do nosso protocolo de diferenciação, investigamos a capacidade das THP1-MDSC-like em inibir o *killing* das células NK.

As células NK foram obtidas através do isolamento das células PBMC como descrito no item 2.3 da metodologia. O PBMC são as células mononucleares do sangue periférico, onde estão os linfócitos e monócitos. Através da marcação com anticorpo anti-CD56, um marcador específico de células NK, foi possível separar estas

células através do *cell sorting*. Após purificação, as células NK CD56⁺ (que apresentaram um grau de pureza de 99%) foram colocadas em cultura para o experimento de *killing*.

Células leucêmicas imortalizadas THP1 foram cocultivadas com células NK CD56⁺ na proporção de 2 NK para 1 THP1 e mantidas em condições apropriadas em cultura. A taxa de apoptose das células leucêmicas foi avaliada após 16h de cocultura, através da exposição de fosfatidil serina por anexina V⁺, analisada por citometria de fluxo. Estas mesmas padronizações foram mantidas no experimento de *killing* de células NK com células leucêmicas HL60, que são um outro tipo de linhagem leucêmica (leucemia promielocítica aguda), a fim de averiguar o efeito do SN de THP1-MDSC-like sobre outro tipo de leucemia além da THP1 (leucemia mielomonocítica aguda).

As células NK foram capazes de induzir a apoptose das células THP1 e HL60, porém na presença do SN de THP1-MDSC-like a apoptose induzida pelas células NK foi significativa e consistentemente reduzida conforme mostrado na figura 12.



A: histogramas representando a porcentagem de anexina V positiva (esquerda) e gráfico com a porcentagem média de anexina V positiva em células THP1 entre os grupos do experimento I com NK do doador α (direita); B: histogramas (esquerda) e gráfico (direita) da anexina V positiva em células THP1 do experimento II com NK do doador β ; C: histogramas (esquerda) e gráfico (direita) de anexina V positiva em células HL60 do experimento III com NK do doador β . Histogramas (esquerda): cinza: não marcados (controle negativo); laranja: controle THP1-WT; vermelho: THP1-WT com células NK; azul: THP1-WT com sobrenadante de células THP1-MDSC-like; verde: THP1-WT com sobrenadante de células THP1-MDSC-like e com células NK. Gráficos (direita): barras brancas: controle THP1-WT; barras pretas: THP1-WT com células NK; barras cinza claras: THP1-WT com sobrenadante de células THP1-MDSC-like; barras cinza escuras: THP1-WT com sobrenadante de células THP1-MDSC-like e com células NK. Cada experimento independente foi realizado com três réplicas biológicas ($n=3$) para cada grupo. Teste estatístico: One-Way ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey. SN: sobrenadante.

Figura 12. Ensaio de *killing* com células NK versus células leucêmicas

Estes dados funcionais em conjunto (dosagem de citocinas no SN, ensaio de proliferação linfocitária e ensaio de *killing* com células NK) indicam mais uma vez o sucesso do nosso protocolo de diferenciação em gerar células THP1-MDSC-*like* capazes de desenvolver suas atividades supressoras.

No quadro 5 apresentamos um resumo de todos os dados obtidos neste estudo em comparação com a literatura.

Quadro 5. Resumo dos marcadores fenotípicos e funcionais das MDSC na literatura comparados com os obtidos nesse estudo

		Fenótipo	Expressão gênica detectada	Marcadores funcionais	Referências
Dados descritos na literatura	M-MDSC	CD11b ⁺ , CD14 ⁺ , CD15 ⁻ , CD33 ⁺ , HLA-DR ^{-/low}	ARG1, NOS2, NO, S100A8/9, PGE2, IL-4R (CD124), TGFβ.	Proteínas expressas: S100A9+, Arg-1, iNOS, IL10, IL-13, TGF-β, CCR2, CXCR4	(2,6,7,10,12,13,15-18,35,43,142-150)
	PMN-MDSC	CD11b ⁺ , CD14 ⁻ , CD15 ⁺ , CD33 ^{hi/+} , CD45 ⁺ , CD66b ⁺ , HLA-DR ^{-/low} , Lin1 ⁻	ARG1, S100A8/9, NOS2, ROS.	Proteínas expressas: S100A9+, Arg-1, ROS, CCR2, CXCR4, IL-10, TGF-β,	
	i-MDSC	CD11b ⁺ , CD16 ⁻ , CD33 ⁺ , CD45 ⁺ , CD117 ⁺ , HLA-DR ⁻ , Lin1 ⁻			
	MDSC (geral)	CD11b ⁺ , CD16 ⁻ , CD33 ⁺ , CD34 ⁺ , CD40 ⁻ , CD56 ⁻ , CD80 ⁺ , HLA-DR ^{-/low}	S100A8, S100A9, VEGF, PD-L1, TGF-β, IFN-γ, IL-1, IL-6, IL-10, ARG1, IDO.	Inibição da proliferação de células T; ensaios de liberação de citocinas; avaliação da atividade de Arg-1, IDO, NOS2; aumento de ROS, nitratação/nitrosilação; expressão de inibidores <i>checkpoint</i> ; e indução de células T regulatórias.	
Dados gerados nesse estudo	THP1-MDSC-like	CD11b ^{hi} , CD11c ^{low} , CD14 ⁺ , CD15 ^{low} , CD16 ⁻ , CD33 ^{hi} , CD34 ⁻ , CD45 ^{hi} , CD56 ⁻ , CD66b ⁻ , CD80 ⁻ , CD117 ⁻ , CD163 ⁻ , CD206 ⁻ , CD274 ⁻ , HLA-DR ⁻ , Lin1 ⁻	Aumento na expressão de: ARG-1, IL-6, IL-10 e CCL18, PD-L1, CD122. Expressão basal ou inalterada de: TGF-β, TNF-α, CXCL10, CCL22, GAL-9, NOS2, CD68 e CD206. Diminuição da expressão de: IL1-β, IL-8, S100A8 e S100A9.	Citocinas no SN: secreção aumentada de TNF-α, IFN-γ, TARC, IL-1β, IL-10, IL-23, IL-1Rα e IL-12p40; secreção basal de arginase, IL-6, IL-12p70 e IP-10. Inibição da proliferação de linfócitos ativados por <i>beads</i> CD3/CD28. Inibição da atividade citotóxica de células NK.	
Comparação*		✓	✓	✓	

*Comparação geral dos achados do presente estudo com a literatura; SN: sobrenadante.

4 DISCUSSÃO

Nosso trabalho tem um potencial importante de contribuição para a ciência, por se tratar de uma solução para as principais dificuldades do estudo das MDSC, sendo elas a dificuldade de seleção, isolamento, expansão e manutenção em cultura destas células, além da complicada caracterização fenotípica e funcional. A partir deste protocolo desenvolvido por nós acreditamos que essas células possam ser utilizadas e aplicadas em diferentes campos de estudo *in vitro* e *in vivo* de diversas patologias desde os variados tipos de tumores sólidos, neoplasias hematológicas, doenças infecciosas, inflamatórias e doenças autoimunes.

A caracterização dos subtipos de MDSC em diferentes doenças, modelos e espécies (estas células foram descritas em camundongos, seres humanos e primatas) gerou uma quantidade considerável de dados sobre marcadores para seu isolamento, caracterização e métodos para estudar sua função, bem como sobre como distinguir subconjuntos patológicos de MDSC de outras células mieloides. Infelizmente, devido às diferenças na seleção de marcadores e modelos, as informações disponíveis na literatura, mesmo dentro de uma espécie, são altamente heterogêneas e frequentemente observações conflitantes são relatadas.^(12,150) Apesar de sua relevância, surpreendentemente pouca atenção tem sido dada ao desenvolvimento cuidadoso de metodologias de caracterização, isolamento e padronização de testes funcionais para MDSC.⁽¹²⁾ Um levantamento de literatura feita por Bruger et al.⁽¹⁵⁰⁾ revelou que a maioria dos estudos publicados em modelos de camundongos e humanos empregou ensaios funcionais para caracterizar MDSC de forma selecionada de acordo com os respectivos cenários experimentais. No entanto, ainda encontra-se artigos sendo publicados que usam o termo MDSC sem relatar a caracterização funcional dessas células.⁽¹⁵⁰⁾

Quando se trata de isolar as MDSC a partir de tecidos, estabelecer protocolos robustos de desagregação que são reprodutíveis entre laboratórios é desafiador, uma vez que as MDSC têm sido isoladas de diversos tecidos e diferentes modelos de doenças, o método de isolamento muitas vezes dependendo do tipo de tecido. O baço é processado principalmente por interrupção mecânica, enquanto o tecido pulmonar e, muitas vezes, tumores sólidos são geralmente submetidos à digestão enzimática baseada em enzimas.⁽¹⁵⁰⁾ A maioria dos protocolos depende do uso de colagenase, que está disponível em muitos formatos diferentes, exibindo atividades de

substrato altamente variáveis. Alguns produtos, no entanto, oferecem misturas padronizadas de collagenase purificadas com pouca variação de lote e níveis reduzidos de endotoxinas. Qualquer alteração nessa etapa pode impactar diretamente a eficiência do protocolo de isolamento e caracterização das MDSC.⁽¹²⁾ A digestão tecidual pode afetar a viabilidade das células e, além disso, pode modular os epítomos da superfície. Além disso, tais procedimentos podem ativar células mieloides, por exemplo, a regulação de enzimas no caso de alarmes ou sinais moleculares associados ao patógeno estarem presentes, particularmente no tempo de processamento estendido. Tais fatores podem afetar o fenótipo, bem como as características funcionais das MDSC murinas e humanas.⁽¹⁵⁰⁾

A busca por protocolos de diferenciação de MDSC para diferentes aplicações já ocorre desde 2005 quando estas células começaram a ser descritas na literatura em modelos animais e em amostras de pacientes, mesmo sendo apenas em 2007 que o termo MDSC foi cunhado, a descrição destas populações de células supressoras já emergia com a necessidade de estudá-las *ex vivo*, *in vitro* e *in vivo*.⁽¹⁾ A fenotipagem e isolamento de MDSC é muito mais complexa e desafiadora em humanos do que em camundongos. Em primeiro lugar, as amostras de pacientes são mais difíceis de obter e, muitas vezes, fornecem apenas poucas células (menos de dez mil) dificultando o desempenho dos ensaios fenotípicos e funcionais. Na maioria dos casos, as MDSC são isoladas do sangue periférico de pacientes com câncer. Raramente amostras de ascites cancerosas, aspirados de MO ou esplenócitos são utilizadas para obter MDSC e muito menos para geração *in vitro* desta população.⁽¹⁵⁰⁾ Estas células passaram a ser mais estudadas a partir da obtenção de PBMC após purificação por *ficoll* do sangue periférico de seres humanos, no entanto, cada autor utilizava um painel de seleção para estas células, o que dificulta a comparação entre estes estudos. Inicialmente estas células foram identificadas em amostras de PBMC de pacientes com carcinoma de células renais,⁽¹⁵¹⁾ outro estudo isolou estas células de baços de camundongos com tumores, em um modelo de sarcoma,⁽¹⁵²⁾ também foram identificadas e isoladas de amostras de ascites, células esplênicas e MO de camundongos com carcinoma ovariano.⁽¹⁵³⁾ Em 2012, Gabrilovich et al.⁽¹⁶⁾ propuseram um painel com uma definição fenotípica útil para separação de diferentes populações mieloides, incluindo as MDSC tanto em murinos como em seres humanos.⁽¹⁶⁾ Importante destacar que os estudos neste período não mantinham estas células em cultura, nem conseguiam obter estas células em larga escala. Em 2016, Bronte et al.⁽⁷⁾ propuseram estratégias para

caracterizar subpopulações definidas fenotipicamente como MDSC e determinar sua atividade supressora em ensaios funcionais. Eles definiram PMN-MDSC como CD11b⁺CD14⁻HLA-DR⁻CD15⁺ e M-MDSC como CD11b⁺CD14⁺CD15⁻HLA-DR^{-/low}. Sendo que o CD15 pode ser substituído por CD66b. CD33 pode substituir o CD11b, considerando que M-MDSC expressa altos níveis de CD33, enquanto PMN-MDSC são CD33^{dim}. E sugerem que o mínimo de avaliação funcional a ser realizada é a investigação da capacidade de suprimir a proliferação de células T ativadas.⁽⁷⁾

Cassetta et al.⁽¹²⁾ relatam que as M-MDSC podem ser isoladas a partir do sangue periférico de seres humanos, após processamento deste mesmo para separação de monócitos através da elutriação, separação por *beads* magnéticas ou centrifugação gradiente e caracterização. Então as M-MDSC que estão presentes na mesma fração de densidade que os monócitos, mas diferem dos monócitos por baixa ou pela ausência de expressão HLA-DR caracterizam-se ainda como células negativas para marcadores de linhagem de linfócitos com o seguinte fenótipo CD11b⁺(ou CD33) HLA-DR⁻CD14⁺CD15⁻. Já as PMN-MDSC podem ser isoladas a partir da fração de neutrófilos do sangue periférico. Os autores alertam que é necessário que o processamento de isolamento seja feito dentro de 1 hora após a coleta do sangue feita contendo anticoagulante no tubo de coleta (EDTA ou citrato de sódio). Estas PMN-MDSC são caracterizadas como CD66b⁺CD15⁺CD14^{-/dim}CD33^{dim}HLA-DR⁻ e o gradiente de densidade que é usado para separar componentes sanguíneos inteiros é necessário para distinguir PMN-MDSC de baixa densidade de neutrófilos de alta densidade.^(12,150)

No entanto, as práticas de isolamento mais descritas na literatura são menos uniformes e mais simplistas. Existem três métodos básicos de isolamento: (I) separação por *beads* magnéticas, (II) enriquecimento por *beads* magnéticas seguido de separação por citometria de fluxo (*cell sorting*), e (III) separação por citometria de fluxo (*cell sorting*).⁽¹⁵⁰⁾ A separação por *beads* magnéticas é o método menos complexo e é usada em protocolos de uma ou duas etapas, focando apenas em um máximo de dois marcadores, enquanto os métodos de isolamento da citometria de fluxo permitem uma classificação multiparamétrica mais complexa. Os protocolos de isolamento por *beads* magnéticas de passo único são favorecidos por estudos que usam MDSC derivado *in vitro* e se concentram na seleção positiva do CD33 ou no esgotamento do CD11b após geração *in vitro* de PBMC ou MO por 4-7 dias.^(148,154)

O protocolo mais descrito na literatura, Solito et al.⁽¹⁴⁹⁾ e Pinton et al.⁽¹⁴⁸⁾ para geração de MDSC derivadas da MO *in vitro*, consiste na coleta de aspirado

de MO de indivíduos saudáveis, seguida de lise com uma solução hipotônica de amônia para remoção dos glóbulos vermelhos, então estas células foram separadas por citometria de fluxo (*cell sorting*) através da exclusão de linfócitos CD3⁺ e selecionadas as células CD11b^{low}/CD16⁻, ou pela exclusão de linfócitos pela separação com *beads* para depleção de CD3⁺/CD19⁺/CD56⁺. Estas células foram plaqueadas em placa de cultura de tecido de 24 poços na concentração de 2x10⁶ em IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) suplementado. As células foram cultivadas com 40ng/mL de G-CSF e GM-CSF por 4 dias obtendo assim BM-MDSC. Após 4 dias, BM-MDSCs foram esgotados de células CD11b⁺ com *beads* magnéticas, a fim de isolar células CD11b^{low}/⁻CD16⁻ (i-BM-MDSCs) e CD11b⁺/CD16⁺ (m-BM-MDSCs).^(148,149,155)

Este protocolo estabelecido e descrito por este grupo foi o único que encontramos com descrição ampla da metodologia,⁽¹⁴⁸⁾ porém os próprios estudos do grupo mostram uma variabilidade de rendimento de 10 a 70%.⁽¹⁴⁹⁾ Em nosso trabalho, não há etapa de coleta, isolamento e purificação de componentes celulares de amostra de sangue ou aspirado de MO de pacientes, a metodologia de diferenciação é mais simples, barata e possibilita aplicação em larga escala. Em relação às citocinas utilizadas G-CSF e GM-CSF, usamos apenas o G-CSF em uma dosagem maior 100ng/mL juntamente com 20ng/mL de IL-4. O tempo de incubação total do nosso protocolo é de 7 dias, o deles varia de 4 a 8 dias (Figura 6). Nosso rendimento é mais consistente, ficando entre 15 e 20% (Figura 8), no entanto pelo ponto de partida se tratar de uma linhagem imortalizada, é mais fácil escalonar para maiores quantidades de células obtidas no final. Nosso painel de caracterização (Figura 7, Quadros 4 e 5) é maior que o utilizado por Pinton et al.⁽¹⁴⁸⁾ ou Solito et al.⁽¹⁴⁹⁾

Solito et al.⁽¹⁴⁹⁾ utilizaram um painel avaliando apenas a marcação de CD3, CD11b e CD16 em células Lin⁻ e avaliou também a proliferação do PBMC com CFSE. Já Pinton et al.⁽¹⁴⁸⁾ para análise funcional destas células i-BM-MDSC, avaliou a proliferação de linfócitos T ativados por CD3/CD28, a expressão de p-STAT3 e a expressão de PD-L1, ARG-1 e IDO. Eles observaram que as i-BM-MDSC aumentam a expressão pSTAT3 e expressaram PD-L1, ARG-1 e IDO após contato com linfócitos T ativados. Observaram também que essas i-BM-MDSC diminuem a proliferação de linfócitos T ativados e induz parcialmente a apoptose nestas células, mas que de forma mais relevante que a apoptose, as células T ativadas que entraram em contato com as i-BM-MDSC aumentam a expressão de PD-1 e *lymphocyte-activation gene 3* (LAG-3)

indicando exaustão dessas células. Por fim, sugerem que a imunossupressão mediada pelas i-BM-MDSC depende da ativação de STAT-3 e da expressão de ARG e IDO.⁽¹⁴⁸⁾

Em relação a estes dados nosso estudo mostra de forma bem objetiva que as células THP1-MDSC-*like* que geramos apresentam expressão gênica de ARG-1 elevada (Figura 9) e que também são capazes de secretar ARG-1 para o SN (Figura 10). Elas também apresentaram aumento da expressão gênica de IL-10 (Figura 9) bem como secretam altos níveis de IL-10 para o SN (Figura 10). Nosso estudo não se restringiu a avaliação de ARG-1 e IL-10, avaliamos outros genes e proteínas importantes para a função imunossupressora das MDSC (Figuras 9 e 10). Avaliamos também PD-L1 a nível gênico bem como de CD122 e Gal-9 (Figura 9C). Observamos que o SN das nossas THP1-MDSC-*like* possuem a capacidade de suprimir a proliferação de linfócitos T ativados por CD3/CD28. Adicionalmente, avaliamos a capacidade destas células em modular o *killing* das células NK frente a células leucêmicas, observamos que o SN inibiu o *killing* das células NK, protegendo assim as células leucêmicas da apoptose induzida por células NK, mais uma vez contribuindo para a confirmação de que as THP1-MDSC-*like* geradas possuem atividades imunossupressoras. Nossos dados em conjunto sugerem que mesmo não estando em um cenário de ativação por contato direto com células do sistema imune, nossas THP1-MDSC-*like* são capazes de desenvolver plenamente suas funções imunossupressoras.

Importante destacar que ao longo do nosso estudo notamos que não apenas grandes mudanças em relação a citocinas utilizadas no estímulo e célula a ser utilizada, mas também pequenas alterações no protocolo como a densidade celular, a viabilidade ao longo da diferenciação, mas principalmente no momento do plaqueamento, a troca de meio ao longo dos dias de diferenciação e o tipo de placa utilizada são elementos que influenciam diretamente a eficácia e rendimento da diferenciação e são informações escassas na literatura.

Comparando nossos dados de imunofenotipagem com a estratégia de caracterização proposta por Bronte et al.⁽⁷⁾ classificando as PMN-MDSC como CD11b⁺CD14⁻HLA-DR⁻CD15⁺ ou CD66b⁺ e M-MDSC como CD11b⁺CD14⁺CD15⁻HLA-DR^{-/low},⁽⁷⁾ o painel utilizado por nós é mais amplo e robusto, pois não nos preocupamos apenas com a classificação em relação ao subtipo de MDSC geradas mas nos preocupamos também que estas células não se desviassem ao longo da diferenciação para um perfil macrófágico e de fato, nenhum outro trabalho na literatura teve essa cautela. Se formos avaliar a caracterização proposta por outros autores como

Gabrilovich et al.⁽¹⁶⁾ as MDSC de tumores humanos são classificadas no geral como Lin⁻CD11b⁺HLA-DR⁻CD33⁺, enquanto as subpopulações PMN-MDSC são classificadas como Lin⁻CD11b⁺HLA-DR⁺CD33⁺CD15⁺ e/ou CD66b⁺ e as M-MDSC como CD33⁺CD14⁺HLA-DR^{-/low}.⁽¹⁶⁾ Levando em conta estas caracterizações e outras descritas na literatura (resumidas nos Quadros 4 e 5), nossas THP1-MDSC-like apresentam características consistentes com a população M-MDSC e i-MDSC ou MDSC no geral. Ou seja, apresentam características monocíticas consistentes com sua linhagem de origem THP1 e consistentes com as M-MDSC, no entanto, não apresentam marcadores de macrófagos M1 ou M2 pois são negativas para CD80, CD163 e CD206 (Figura 7 e Quadro 4). Além disso, também não há a identificação do perfil de células dendríticas por não apresentarem alteração de CD11c e HLA-DR negativo. Isto posto, nossas MDSC podem ser caracterizadas como CD11b^{hi}CD14⁺CD15^{low}CD16⁻CD33^{hi}CD45^{hi}CD66b⁻HLA-DR⁻Lin1⁻ além de serem também CD11c⁻CD34^{low}CD56⁻CD80⁻CD117⁻CD163⁻CD206⁻CD274⁻HLA-ABC^{low}. Adicionalmente nossas THP1-MDSC-like expressam genes e secretam proteínas consistentes com os perfis imunossupressores descritos das MDSC (Figuras 9, 10 e Quadro 5).

Bruger et al.⁽¹⁵⁰⁾ recomendam que a atividade imunossupressora das MDSC *in vitro* seja avaliada a partir da mensuração da proliferação de células T; ensaios de liberação de citocinas (IFN- γ , TGF- β , IL-10, IL-2); avaliação da Arg-1, IDO, NOS2, ROS, inibidores de ponte de verificação (*checkpoint*) e células T regulatórias.⁽¹⁵⁰⁾ Em relação a estes ensaios, realizamos a grande maioria deles e obtivemos resultados satisfatórios e consistentes com a literatura, como resumidos no quadro 5. Mostramos que as THP1-MDSC-like liberam citocinas imunorreguladoras como o TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-10, IL-23, e IL-12p40 (Figura 10) e que o SN destas células são capazes de inibir a proliferação de células T (Figura 11). Adicionalmente, mostramos dados que não haviam sido descritos diretamente com relação as células MDSC levando a uma diminuição da apoptose de células leucêmicas induzida pelas células NK (Figura 12).

Bronte et al.⁽⁷⁾ propuseram uma espécie de algoritmo experimental a ser seguido para identificar e classificar as MDSC. A primeira etapa consiste na identificação do fenótipo típico de PMN-MDSC ou M-MDSC e a segunda etapa é a avaliação da atividade imunossupressora. Se uma população atender a estes critérios pode ser considerada uma MDSC, no entanto ainda pode haver uma terceira etapa, caso as células não correspondam a segunda etapa, que é a investigação dos marcadores bioquímicos e moleculares de MDSC, sendo assim mesmo que a população não

apresente atividade imunossupressora mas apresente os demais critérios, pode ser considerada uma célula semelhante as MDSC.⁽⁷⁾ Levando em consideração este algoritmo experimental propostos por Bronte et al.⁽⁷⁾ podemos então, mais uma vez, considerar que nossas células THP1-MDSC-*like* realmente apresentam fenótipo e função de MDSC.

Nos últimos anos, grandes avanços vêm sendo feitos referentes ao desenvolvimento de imunoterapias, dentro deste contexto, as MDSC necessitam de atenção especial, pois sua presença no TME pode influenciar a eficácia de abordagens imunoterápicas através de sua importante função imunossupressora.^(9,18,121,127,156)

Referente as imunoterapias mais atuais, vale destacar que o surgimento da terapia celular com células T modificadas geneticamente para expressarem CAR ganhou grande evidência, pois é uma abordagem altamente promissora com o objetivo de manipular geneticamente as células T do próprio paciente para identificar e eliminar células malignas através do reconhecimento de antígeno específico do tumor.^(111,112,114,115) Atualmente existem 5 terapias CAR-T aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA para malignidades hematológicas. No Brasil, foi recentemente aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (publicado no Diário Oficial da União de 27 de julho de 2021), o uso do *Kymriah*® (tisagenlecleucel da empresa Novartis Biociências S.A.) que é indicado para o tratamento de pacientes pediátricos e adultos jovens (até 25 anos de idade) com leucemia linfoblástica aguda (LLA) de células B, refratária ou a partir da segunda recidiva. O tratamento está igualmente indicado para pacientes adultos com linfoma difuso de grandes células B recidivado, após duas ou mais linhas de terapia sistêmica. Alguns dos principais obstáculos para a imunoterapia do CAR em tumores sólidos incluem o processo de fabricação de células CAR-T, falta de antígenos específicos para tumores, tráfico e infiltração ineficiente de células CAR-T em locais tumorais, TME imunossupressor, toxicidade associada à terapia e fuga de antígenos. No geral, os estudos com CAR-T têm mostrado potenciais resultados em alguns tipos de cânceres hematológicos como por exemplo a leucemia linfocítica aguda de células B, linfoma não Hodgkin, e leucemia linfocítica crônica.^(106,111,112,114,116,118,157-162) No entanto, os resultados em pacientes com LMA ainda têm sido limitados, uma vez que a heterogeneidade antigênica da LMA resulta em uma ampla lista de potenciais alvos para os quais as células CAR-T poderiam ser direcionadas, cada uma com vantagens e desvantagens. Levando em conta que o tratamento com células CAR-T pode ocasionar

complicações e que os riscos/efeitos adversos observados com a terapia com células CAR-T mais documentadas são a síndrome de liberação de citocinas e neurotoxicidade; e que a terapêutica com células CAR-T tem algumas limitações – logisticamente é complicado gerar um produto autólogo específico para cada paciente, o que tornou o processamento caro e paciente específico; e que além disso, a elaboração de doses clinicamente relevantes de células CAR-T pode ser inviável a partir de pacientes linfopênicos pré-tratados, muitos estudos mais recentes vêm desenvolvendo uma terapia alternativa com células NK, os CAR-NK. As células NK oferecem uma alternativa atraente às células T para a engenharia de CAR por uma série de razões: podem ser obtidas de fontes variadas: sangue periférico, MO, células-tronco embrionárias humanas, células-tronco pluripotentes induzidas, e cordão umbilical ou linhagens celulares NK facilmente disponíveis como NK92; células NK alogênicas não apresentam risco de doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH); e podem matar células cancerígenas através de vias dependentes de CAR e também independentes de CAR. Atualmente existem mais de 10 estudos clínicos em andamento estudando a aplicação de CAR-NK em diversos cânceres, incluindo a LMA.^(111,113,114,158,163-169)

De fato, as MDSC estão sendo estudadas no contexto das imunoterapias e foram até associadas à falha da terapia CAR-T no linfoma de grandes células B por Jain et al.⁽¹⁷⁰⁾ que mostraram que a desregulação imunológica em linfoma de grandes células B recidivado ou refratário promove resistência à terapia com células CAR-T (*axicabtagene ciloleucel*) por meio de vários mecanismos: expansão insuficiente de *axicabtagene ciloleucel* associada à sinalização M-MDSC circulante e IFN tumoral, que também dá origem à expressão de ligantes de *checkpoint* imunológico.⁽¹⁷⁰⁾

Recentemente, Parihar et al.⁽¹⁷¹⁾ desenvolveram células NK modificadas com um receptor quimérico no qual o receptor ativador NKG2D é fundido à cadeia citotóxica ζ do receptor de células T (NKG2D. ζ). Essas células NKG2D. ζ -NK tiveram como alvo as MDSC, que superexpressam ligantes NKG2D dentro do TME. Eles mostraram que as células NKG2D. ζ -NK são citotóxicas contra MDSC, mas poupam os tecidos normais que expressam ligantes NKG2D. Células NKG2D. ζ -NK, mas não células NK não modificadas, secretam citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas em resposta às MDSC no local do tumor e melhoram a infiltração e atividade antitumoral de células CAR-T no contexto do neuroblastoma e propõem que uma terapia combinada para tumores sólidos que inclui tanto células NKG2D. ζ -NK quanto células CAR-T pode melhorar as respostas sobre terapias baseadas apenas em células CAR-T.⁽¹⁷¹⁾

Além dos CAR-T e CAR-NK, os CAR-*macrophages* (CAR-M) vêm ganhando espaço a fim de superar alguns dos principais obstáculos associados à terapia CAR-T e NK, especialmente em tumores sólidos. Macrófagos podem se infiltrar eficientemente em tumores, são grandes reguladores imunológicos e abundantemente presentes no TME. Macrófagos e outras células da linhagem mieloide poderiam potencialmente superar as barreiras ao tratamento de tumores sólidos que têm dificultado o CAR-T até agora. No câncer, os macrófagos (TAM) frequentemente adotam um fenótipo anti-inflamatório ou "alternativamente ativado" (referidos como M2). Os esforços atuais para projetar o CAR-M descobriram que os princípios básicos de *design* de CAR do campo de células T se aplicam também para a biologia do macrófago. Estudos revelam que as terapias com CAR-M são capazes de "limpar" células tumorais *in vitro* e em modelos *in vivo* pré-clínicos. CAR-M exibem citotoxicidade específica de antígeno *in vitro*, prolongam a sobrevivência; preveem metástase; recrutam células T CD3 e diminuem as células PD-L1 no local do tumor, confirmando que os macrófagos projetados em si não são o único condutor da resposta antitumoral; também aumentam os níveis de citocinas pró-inflamatórias IL1- β , IL-6 e TNF- α no soro, indicativo de uma resposta imune sistêmica. A plasticidade fenotípica do macrófago, quando combinada com a biologia sintética, apresenta uma nova plataforma excitante para aplicações terapêuticas para avançar na engenharia celular e fornecer imunoterápicos eficazes. Atualmente existe um estudo clínico em andamento com o produto principal da *Carisma Therapeutic* CT-0508 para tratar tumores sólidos de superexpressão HER2 (ClinicalTrials.gov: NCT04660929). O CAR-M apesar de promissor, ainda está em fase inicial, com apenas um ensaio clínico iniciado e nenhum resultado relatado ainda. Portanto, muitas das limitações ainda não foram desdobradas.^(111,118,172-180) No entanto, estes grandes avanços inovadores na área terapêutica do câncer com CAR-T, CAR-NK e CAR-M também revelam a importância de dar continuidade nos estudos do TME em busca de potenciais alvos terapêuticos ou mesmo de potenciais células suscetíveis a engenharia de modificação genética de CAR e também da relação das MDSC dentro destes cenários, uma vez que estas células são componentes importantes do TME. Acreditamos que nosso trabalho possibilitará a utilização destas células THP1-MDSC-*like* para estudar a relação destas células com as imunoterapias baseadas em CAR e suas interações com o TME em diversos tipos de cânceres.

Traçando um paralelo com os cenários da terapia celular e da medicina regenerativa, em que células-tronco mesenquimais (CTM) são infundidas no

microambiente de diversas doenças como por exemplo: doença renal,^(181,182) hipertensão renovascular,^(183,184) doenças cardíacas,⁽¹⁸⁵⁾ diabetes,⁽¹⁸⁶⁾ LES,⁽¹⁸⁷⁾ osteoporose,⁽¹⁸⁸⁾ artrite reumatoide,⁽¹⁸⁹⁾ com a possibilidade de gerar e expandir *in vitro* as MDSC, os estudos futuros podem caminhar não só no sentido de aprofundar o conhecimento acerca dos mecanismos das doenças, ou da busca por possíveis novos alvos terapêuticos mas também no sentido de usar estas mesmas células como terapias. De fato, alguns autores já apontaram as MDSC como alvos terapêuticos possíveis para modular o TME relacionado por exemplo ao câncer de mama, carcinoma de células renais, melanoma^(122,126,127) e nas doenças autoimunes como lúpus, hepatite autoimune, esclerose múltipla e diabetes.^(19,27) Será que os próximos estudos apontarão as MDSC como possíveis terapias celulares ou mesmo que compostos obtidos a partir das MDSC sejam utilizados como terapias? Pois, além do uso direto (infusão) das próprias CTM como terapêutica regenerativa, imunomodulatória e protetora de tecidos, outra estratégia terapêutica foi desenvolvida a partir destas células, o uso do meio condicionado que, de forma paralela à terapia celular, é uma terapia livre de células baseada em fatores bioativos secretados pelas CTM que ficam acondicionados no meio de cultura. As CTM secretam uma variedade de mediadores proteicos, peptídeos, RNA, microRNA, e lipídios que podem ser concentrados, congelados ou até mesmo liofilizados sem perda de atividade, o que lhes dá uma certa vantagem sobre produtos celulares que requerem armazenamento de nitrogênio líquido e infraestrutura para reviver células congeladas.⁽¹⁹⁰⁾ Da mesma forma das CTM, grande parte das funções das MDSC também acontecem de forma parácrina, ou seja, devido a fatores secretados pela célula para microambiente que podem ser obtidos no SN da cultura celular, concentrados, purificados e armazenados para uso como estratégia terapêutica. Diante disto, a partir do protocolo que geramos seria possível cultivar e diferenciar as MDSC em biorreatores e estudar os efeitos do meio condicionado destas células no TME, ou nas outras doenças relacionadas às MDSC ou em contextos em que uma abordagem de imunossupressão seja vantajosa. De fato, nossos dados mostram que o SN destas THP1-MDSC-like são capazes de agir de forma imunossupressora, uma vez que o SN, mesmo na proporção (concentração) de apenas 25% foi capaz de diminuir a proliferação de linfócitos (Figura 11) e o *killing* de células NK (Figura 12), possivelmente pelas citocinas presentes neste SN (Figura 10).

Muitos modelos atualmente utilizados para estudar doenças, como o câncer por exemplo, são baseados na inoculação de células humanas em animais, os

chamados modelos xenogênicos. Alguns exemplos desta metodologia de estudo são: modelo xenogênico utilizando células de linhagem celular imortalizada, como a THP1, em camundongos *BALB/c nude*;⁽¹⁹¹⁾ e modelos de xenoenxerto utilizando células neoplásicas/leucemias derivadas do paciente representando uma estratégia de escolha para estudos pré-clínicos de LMA.⁽¹⁹²⁾ Sendo assim, outra vertente que nosso estudo possibilita é o estabelecimento de modelos xenogênicos com a inoculação de células THP1-MDSC-*like* em animais.

Cada vez mais a bioimpressão 3D tem sido usada para simular microambientes fisiológicos onde biomateriais são somados a células vivas, são fabricados de forma controlada camada a camada respeitando uma arquitetura tecidual conhecida permitindo, por sua vez, a análise da interação entre as células, fatores de crescimento e citocinas presentes em um modelo de estudos alternativo e muitas vezes mais apropriado em relação a cultura 2D e arcabouços convencionais.⁽¹⁹³⁻¹⁹⁵⁾ Nos últimos anos, ocorreram muitos avanços na pesquisa empregando a bioimpressão a fim de produzir análogos de tecidos, incluindo pele, válvulas cardíacas, vasos sanguíneos, ossos, cartilagem, estruturas da córnea, fígado, tireoide, músculo e tecido cardíaco.^(192,196-198) Porém, células raras dificilmente estão contempladas nesses estudos porque os pesquisadores não conseguem isolar um número adequado e suficiente de células, ou não conseguem manter em cultura de forma viável, ou expandir essas células *ex vivo*, impossibilitando assim a adição dessas populações nesses modelos bioimpressos e com isso esses tecidos artificiais carecem de certos componentes celulares que talvez sejam muito importantes. Com este protocolo estabelecido por nosso grupo, será possível adicionar as MDSC aos estudos do TME ou de outras doenças aliados à tecnologia da bioimpressão 3D.

Considerando que demonstramos que é possível diferenciar células THP1 em células MDSC-*like*, é plausível pensar que no TME leucêmico um blasto mieloide poderia se diferenciar em MDSC-*like* devido as citocinas presentes nesse TME e colaborar de forma importante para a evolução da doença. Esta capacidade de diferenciação de blastos já foi evidenciada na literatura, como por exemplo nos estudos que mostraram que o uso de ATRA ou de dimetilsulfóxido (DMSO) induz a linhagem HL60 à maturação e um perfil de granulócitos-*like*,⁽¹⁹⁹⁻²⁰²⁾ ou mesmo as próprias THP1 que na presença de PMA se diferenciam em macrófago e que utilizando determinadas citocinas são polarizadas para M1 ou M2.⁽¹³⁴⁻¹³⁶⁾ Sendo assim, este trabalho pode

proporcionar um caminho alternativo e se tornar uma ferramenta para estudos sobre a interação entre TME/blastos/MDSC.

A diferenciação de THP-1 (como já mencionado, uma linha celular de blastos de leucemia mieloide aguda) em células MDSC-*like* abriu uma janela para considerar o fenômeno do microambiente tumoral leucêmico induzindo a diferenciação de blastos LMA em células de leucemia MDSC-like (LMA-MDSC-*like*). Esta população poderia contribuir de forma importante para a evolução da neoplasia devido à inibição de NK e vigilância imune mediada por linfócitos.

Nosso trabalho oferece à comunidade científica um protocolo robusto para gerar MDSC em laboratório e aprimorar a investigação de aspectos desconhecidos dessas células. Além disso, fornece evidências dos efeitos de citocinas derivadas de MDSC na regulação negativa do sistema imunológico contra LMA. E também sugere a possível existência de uma população LMA-MDSC-*like* no microambiente da leucemia que pode estar associada à biologia da LMA.

5 CONCLUSÕES

1. Desenvolvemos um protocolo eficaz para produção de células supressoras mieloides em larga escala a partir da diferenciação da linhagem celular mieloide imatura THP-1 induzida por G-CSF (100ng/mL) e IL-4 (20ng/mL);

2. As células supressoras mieloides geradas (THP1-MDSC-*like*) foram caracterizadas imunofenotipicamente e funcionalmente de forma robusta e consistente com a literatura;

3. Além disso, demonstramos que as células supressoras de linhagem mieloide derivadas da diferenciação de THP1 (THP1-MDSC-*like*) são capazes de contribuir para o escape imunológico de linhagens de leucemia mieloide aguda.

6 REFERÊNCIAS

1. Gabrilovich DI, Bronte V, Chen SH, Colombo MP, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, et al. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 2007;67(1):425.
2. Veglia F, Perego M, Gabrilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat Immunol.* 2018;19(2):108–19.
3. Pak AS, Wright MA, Matthews JP, Collins SL, Petruzzelli GJ, Young MR. Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: presence of CD34(+) cells which suppress immune functions within cancers that secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res.* 1995;1(1):95-103.
4. Damuzzo V, Pinton L, Desantis G, Solito S, Marigo I, Bronte V, et al. Complexity and challenges in defining myeloid-derived suppressor cells. *Cytometry B Clin Cytom.* 2015;88(2):77–91.
5. Talmadge JE, Gabrilovich DI. History of myeloid-derived suppressor cells. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(10):739–52.
6. Solito S, Marigo I, Pinton L, Damuzzo V, Mandruzzato S, Bronte V. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity in human cancers. *Ann N Y Acad Sci.* 2014;1319(1):47–65.
7. Bronte V, Brandau S, Chen SH, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun.* 2016;7(1):12150.
8. Wei WC, Lin SY, Lan CW, Huang YC, Lin CY, Hsiao PW, et al. Inhibiting MDSC differentiation from bone marrow with phytochemical polyacetylenes drastically impairs tumor metastasis. *Sci Rep.* 2016;6(1):36663.
9. Ibáñez-Vea M, Zuazo M, Gato M, Arasanz H, Fernández-Hinojal G, Escors D, et al. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: current knowledge and future perspectives. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2018;66(2):113–23.
10. Ma T, Renz BW, Ilmer M, Koch D, Yang Y, Werner J, et al. Myeloid-derived suppressor cells in solid tumors. *Cells.* 2022;11(2):310.
11. Pimenta DB, Varela VA, Datoguia TS, Caraciolo VB, Lopes GH, Pereira WO. The bone marrow microenvironment mechanisms in acute myeloid leukemia. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:764698.
12. Cassetta L, Bruderek K, Skrzeczynska-Moncznik J, Osiecka O, Hu X, Rundgren IM, et al. Differential expansion of circulating human MDSC subsets in patients with cancer, infection and inflammation. *J Immunother Cancer.* 2020;8(2):e001223.
13. Heine A, Held SA, Schulte-Schrepping J, Wolff JF, Klee K, Ulas T, et al. Generation and functional characterization of MDSC-like cells. *Oncol Immunology.* 2017;6(4):e1295203.
14. Kumar V, Patel S, Tcyganov E, Gabrilovich DI. The Nature of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *Trends Immunol.* 2016;37(3):208–20.
15. Millrud CR, Bergenfelz C, Leandersson K. On the origin of myeloid-derived suppressor cells. *Oncotarget.* 2017;8(2):3649–65.

16. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(4):253–68.
17. Poschke I, Kiessling R. On the armament and appearances of human myeloid-derived suppressor cells. *Clin Immunol*. 2012;144(3):250–68.
18. Kong YY, Fuchsberger M, Xiang SD, Apostolopoulos V, Plebanski M. Myeloid derived suppressor cells and their role in diseases. *Curr Med Chem*. 2013;20(11):1437–44.
19. Nourbakhsh E, Mohammadi A, Salemizadeh Parizi M, Mansouri A, Ebrahimzadeh F. Role of myeloid-derived suppressor cell (MDSC) in autoimmunity and its potential as a therapeutic target. *Inflammopharmacology*. 2021;29(5):1307–15.
20. Condamine T, Gabrilovich DI. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends Immunol*. 2011;32(1):19–25.
21. Dolcetti L, Peranzoni E, Ugel S, Marigo I, Fernandez Gomez A, Mesa C, et al. Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *Eur J Immunol*. 2010;40(1):22–35.
22. Umansky V, Sevko A. Tumor microenvironment and myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Microenviron*. 2013;6(2):169–77.
23. Yan D, Yang Q, Shi M, Zhong L, Wu C, Meng T, et al. Polyunsaturated fatty acids promote the expansion of myeloid-derived suppressor cells by activating the JAK/STAT3 pathway. *Eur J Immunol*. 2013;43(11):2943–55.
24. Bronte V, Chappell DB, Apolloni E, Cabrelle A, Wang M, Hwu P, et al. Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. *J Immunol*. 1999;162(10):5728–37.
25. Condamine T, Mastio J, Gabrilovich DI. Transcriptional regulation of myeloid-derived suppressor cells. *J Leukoc Biol*. 2015;98(6):913–22.
26. Haverkamp JM, Smith AM, Weinlich R, Dillon CP, Qualls JE, Neale G, et al. Myeloid-derived suppressor activity is mediated by monocytic lineages maintained by continuous inhibition of extrinsic and intrinsic death pathways. *Immunity*. 2014;41(6):947–59.
27. Boros P, Ochando J, Zeher M. Myeloid derived suppressor cells and autoimmunity. *Hum Immunol*. 2016;77(8):631–6.
28. Ji J, Xu J, Zhao S, Liu F, Qi J, Song Y, et al. Myeloid-derived suppressor cells contribute to systemic lupus erythematosis by regulating differentiation of Th17 cells and tregs. *Clin Sci (Lond)*. 2016;130(16):1453–67.
29. Wu H, Zhen Y, Ma Z, Li H, Yu J, Xu ZG, et al. Arginase-1-dependent promotion of TH17 differentiation and disease progression by MDSCs in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med*. 2016;8(331):331ra40.
30. Jiao Z, Hua S, Wang W, Wang H, Gao J, Wang X. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlated negatively with Th17 cells in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*. 2013;42(2):85-90.
31. Li M, Zhu D, Wang T, Xia X, Tian J, Wang S. Roles of Myeloid-Derived Suppressor Cell Subpopulations in Autoimmune Arthritis. *Front Immunol*. 2018;9:2849.

32. Malavika M, Sanju S, Poorna MR, Vishnu Priya V, Sidharthan N, Varma P, et al. Role of myeloid derived suppressor cells in sepsis. *Int Immunopharmacol.* 2022;104:108452.
33. Hollen MK, Stortz JA, Darden D, Dirain ML, Nacionales DC, Hawkins RB, et al. Myeloid-derived suppressor cell function and epigenetic expression evolves over time after surgical sepsis. *Crit Care.* 2019;23(1):355.
34. Ruan WS, Feng MX, Xu J, Xu YG, Song CY, Lin LY, et al. Early activation of myeloid-derived suppressor cells participate in sepsis-induced immune suppression via PD-L1/PD-1 axis. *Front Immunol.* 2020;11:1299.
35. Ugel S, De Sanctis F, Mandruzzato S, Bronte V. Tumor-induced myeloid deviation: when myeloid-derived suppressor cells meet tumor-associated macrophages. *J Clin Invest.* 2015;125(9):3365–76.
36. Yaseen MM, Abuharfeil NM, Darmani H, Daoud A. Mechanisms of immune suppression by myeloid-derived suppressor cells: the role of interleukin-10 as a key immunoregulatory cytokine. *Open Biol.* 2020;10(9):200111.
37. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(3):162–74.
38. Brimnes MK, Vangsted AJ, Knudsen LM, Gimsing P, Gang AO, Johnsen HE, et al. Increased level of both CD4+FOXP3+ regulatory T cells and CD14+HLA-DR⁻/low myeloid-derived suppressor cells and decreased level of dendritic cells in patients with multiple myeloma. *Scand J Immunol.* 2010;72(6):540–7.
39. Yu S, Ren X, Li L. Myeloid-derived suppressor cells in hematologic malignancies: two sides of the same coin. *Exp Hematol Oncol.* 2022;11(1):43.
40. Wang Z, Zhang L, Wang H, Xiong S, Li Y, Tao Q, et al. Tumor-induced CD14+HLA-DR⁻ (low) myeloid-derived suppressor cells correlate with tumor progression and outcome of therapy in multiple myeloma patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2015;64(3):389–99.
41. Pyzer AR, Stroopinsky D, Rajabi H, Washington A, Tagde A, Coll M, et al. MUC1-mediated induction of myeloid-derived suppressor cells in patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2017;129(13):1791–801.
42. Taghiloo S, Asgarian-Omran H. Immune evasion mechanisms in acute myeloid leukemia: a focus on immune checkpoint pathways. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2021;157:103164.
43. Sun H, Li Y, Zhang ZF, Ju Y, Li L, Zhang BC, et al. Increase in myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) associated with minimal residual disease (MRD) detection in adult acute myeloid leukemia. *Int J Hematol.* 2015;102(5):579–86.
44. Lv J, Zhao Y, Zong H, Ma G, Wei X, Zhao Y. Increased levels of circulating monocytic- and early-stage myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in acute myeloid leukemia. *Clin Lab.* 2021;67(3).
45. Wang H, Tao Q, Wang Z, Zhang Q, Xiao H, Zhou M, et al. Circulating monocytic myeloid-derived suppressor cells are elevated and associated with poor prognosis in acute myeloid leukemia. *J Immunol Res.* 2020;2020:7363084.
46. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.

47. Kantarjian H. Acute myeloid leukemia—major progress over four decades and glimpses into the future. *Am J Hematol*. 2016;91(1):131–45.
48. Acheampong DO, Adokoh CK, Asante DB, Asiamah EA, Barnie PA, Bonsu DO, et al. Immunotherapy for acute myeloid leukemia (AML): a potent alternative therapy. *Biomed Pharmacother*. 2018;97:225–32.
49. Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2013 update on risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2013;88(4):318–27.
50. Carter JL, Hege K, Yang J, Kalpage HA, Su Y, Edwards H, et al. Targeting multiple signaling pathways: the new approach to acute myeloid leukemia therapy. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):288.
51. Groth C, Hu X, Weber R, Fleming V, Altevogt P, Utikal J, et al. Immunosuppression mediated by myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) during tumour progression. *Br J Cancer*. 2019;120(1):16–25.
52. Tumino N, Di Pace AL, Besi F, Quatrini L, Vacca P, Moretta L. Interaction between MDSC and NK cells in solid and hematological malignancies: impact on HSCT. *Front Immunol*. 2021;12:638841.
53. Kampen KR. The discovery and early understanding of leukemia. *Leuk Res*. 2012;36(1):6–13.
54. Hwang SM. Classification of acute myeloid leukemia. *Blood Res*. 2020;55(Suppl 1):S1–4.
55. Vosberg S, Greif PA. Clonal evolution of acute myeloid leukemia from diagnosis to relapse. *Genes Chromosomes Cancer*. 2019;58(12):839–49.
56. Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer*. 2006;107(9):2099–107.
57. Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, Robertson A, et al.; Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(22):2059–74.
58. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2015;373(12):1136–52.
59. Uribesalgo I, Di Croce L. Dynamics of epigenetic modifications in leukemia. *Brief Funct Genomics*. 2011;10(1):18–29.
60. Narayanan D, Weinberg OK. How I investigate acute myeloid leukemia. *Int J Lab Hematol*. 2020;42(1):3–15.
61. Weinberg OK, Pozdnyakova O, Campigotto F, DeAngelo DJ, Stone RM, Neuberg D, et al. Reproducibility and prognostic significance of morphologic dysplasia in de novo acute myeloid leukemia. *Mod Pathol*. 2015;28(7):965–76.
62. Bar M, Othus M, Park HM, Sandhu V, Chen X, Wood BL, et al. Elevated lymphocyte count at time of acute myeloid leukemia diagnosis is associated with shorter remission. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(11):3109–15.
63. Jongen-Lavrencic M, Grob T, Hanekamp D, Kavelaars FG, Al Hinai A, Zeilemaker A, et al. Molecular minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(13):1189–99.

64. Weinberg OK, Hasserjian RP, Baraban E, Ok CY, Geyer JT, Philip JK, et al. Clinical, immunophenotypic, and genomic findings of acute undifferentiated leukemia and comparison to acute myeloid leukemia with minimal differentiation: a study from the bone marrow pathology group. *Mod Pathol*. 2019;32(9):1373–85.
65. Franchini M, Frattini F, Crestani S, Bonfanti C. Bleeding complications in patients with hematologic malignancies. *Semin Thromb Hemost*. 2013;39(1):94–100.
66. Naymagon L, Mascarenhas J. Hemorrhage in acute promyelocytic leukemia: can it be predicted and prevented? *Leuk Res*. 2020;94:106356.
67. Stahl M, Shallis RM, Wei W, Montesinos P, Lengline E, Neukirchen J, et al. Management of hyperleukocytosis and impact of leukapheresis among patients with acute myeloid leukemia (AML) on short- and long-term clinical outcomes: a large, retrospective, multicenter, international study. *Leukemia*. 2020;34(12):3149–60.
68. Rose-Inman H, Kuehl D. Acute leukemia. *Emerg Med Clin North Am*. 2014;32(3):579–96.
69. Liersch R, Müller-Tidow C, Berdel WE, Krug U. Prognostic factors for acute myeloid leukaemia in adults—biological significance and clinical use. *Br J Haematol*. 2014;165(1):17–38.
70. Short NJ, Tallman MS, Pollyea DA, Ravandi F, Kantarjian H. Optimizing risk stratification in acute myeloid leukemia: dynamic models for a dynamic therapeutic landscape. *J Clin Oncol*. 2021;39(23):2535–8.
71. Helman R, Santos FP, Simões B, Atta EH, Callera F, Dobbin JA, et al. Acute myeloid leukemia: update in diagnosis and treatment in Brazil. *einstein (Sao Paulo)*. 2011;9(2):179–83.
72. DiNardo CD, Cortes JE. Mutations in AML: prognostic and therapeutic implications. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2016;2016(1):348–55.
73. Martelli MP, Sportoletti P, Tiacci E, Martelli MF, Falini B. Mutational landscape of AML with normal cytogenetics: biological and clinical implications. *Blood Rev*. 2013;27(1):13–22.
74. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374(23):2209–21.
75. Short NJ, Rytting ME, Cortes JE. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*. 2018;392(10147):593–606.
76. Eisfeld AK, Kohlschmidt J, Mims A, Nicolet D, Walker CJ, Blachly JS, et al. Additional gene mutations may refine the 2017 European LeukemiaNet classification in adult patients with de novo acute myeloid leukemia aged <60 years. *Leukemia*. 2020;34(12):3215–27.
77. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976;33(4):451–8.
78. El Achi H, Kanagal-Shamanna R. Biomarkers in acute myeloid leukemia: leveraging next generation sequencing data for optimal therapeutic strategies. *Front Oncol*. 2021;11:748250.
79. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: myeloid and histiocytic/dendritic neoplasms. *Leukemia*. 2022;36(7):1703-19.

80. van Gils N, Denkers F, Smit L. Escape from treatment; the different faces of leukemic stem cells and therapy resistance in acute myeloid leukemia. *Front Oncol.* 2021;11:659253.
81. Burnett AK, Russell NH, Hills RK, Bowen D, Kell J, Knapper S, et al.; UK National Cancer Research Institute Acute Myeloid Leukaemia Working Group. Arsenic trioxide and all-trans retinoic acid treatment for acute promyelocytic leukaemia in all risk groups (AML17): results of a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(13):1295–305.
82. Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood.* 2008;111(5):2505–15.
83. Webster JA, Luznik L, Gojo I. Treatment of AML relapse after allo-HCT. *Front Oncol.* 2021;11:812207.
84. Koreth J, Schlenk R, Kopecky KJ, Honda S, Sierra J, Djulbegovic BJ, et al. Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *JAMA.* 2009;301(22):2349–61.
85. Tyner JW, Tognon CE, Bottomly D, Wilmot B, Kurtz SE, Savage SL, et al. Functional genomic landscape of acute myeloid leukaemia. *Nature.* 2018;562(7728):526–31.
86. Warner JK, Wang JC, Hope KJ, Jin L, Dick JE. Concepts of human leukemic development. *Oncogene.* 2004;23(43):7164–77.
87. Mohamed AM, Balsat M, Thenoz M, Koering C, Payen-Gay L, Cheok M, et al. Oncogene- and drug resistance-associated alternative exon usage in acute myeloid leukemia (AML). *Oncotarget.* 2016;7(3):2889–909.
88. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57–70.
89. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74.
90. Geiger TL, Rubnitz JE. New approaches for the immunotherapy of acute myeloid leukemia. *Discov Med.* 2015;19(105):275–84.
91. Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discov.* 2022;12(1):31–46.
92. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology.* 2007;121(1):1–14.
93. Guillerey C, Huntington ND, Smyth MJ. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nat Immunol.* 2016;17(9):1025–36.
94. Davis CT, Rizzieri D. Immunotherapeutic applications of NK cells. *Pharmaceuticals (Basel).* 2015;8(2):250–6.
95. Leung W. Infusions of allogeneic natural killer cells as cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2014;20(13):3390–400.
96. Raulet DH, Held W. Natural killer cell receptors: the offs and ons of NK cell recognition. *Cell.* 1995;82(5):697–700.
97. Carotta S. Targeting NK cells for anticancer immunotherapy: clinical and preclinical approaches. *Front Immunol.* 2016;7:152.
98. Wallace ME, Smyth MJ. The role of natural killer cells in tumor control—effectors and regulators of adaptive immunity. *Springer Semin Immunopathol.* 2005;27(1):49–64.

99. Pop C, Salvesen GS. Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem.* 2009;284(33):21777–81.
100. Creagh EM, Conroy H, Martin SJ. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol Rev.* 2003;193(1):10–21.
101. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 1998;94(4):481–90.
102. Wilson NS, Dixit V, Ashkenazi A. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat Immunol.* 2009;10(4):348–55.
103. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science.* 2001;292(5517):727–30.
104. Barrett AJ, Le Blanc K. Immunotherapy prospects for acute myeloid leukaemia. *Clin Exp Immunol.* 2010;161(2):223–32.
105. Chambers AM, Lupo KB, Matosevic S. Tumor microenvironment-induced immunometabolic reprogramming of natural killer cells. *Front Immunol.* 2018;9:2517.
106. Hansrivijit P, Gale RP, Barrett J, Ciurea SO. Cellular therapy for acute myeloid leukemia - current status and future prospects. *Blood Rev.* 2019;37:100578.
107. Zaghi E, Calvi M, Marcenaro E, Mavilio D, Di Vito C. Targeting NKG2A to elucidate natural killer cell ontogenesis and to develop novel immune-therapeutic strategies in cancer therapy. *J Leukoc Biol.* 2019;105(6):1243–51.
108. Stahl M, Goldberg AD. Immune checkpoint inhibitors in acute myeloid leukemia: novel combinations and therapeutic targets. *Curr Oncol Rep.* 2019;21(4):37.
109. Giannopoulos K. targeting immune signaling checkpoints in acute myeloid leukemia. *J Clin Med.* 2019;8(2):E236.
110. Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science.* 2018;359(6382):1350–5.
111. Pan K, Farrukh H, Chittepu VC, Xu H, Pan CX, Zhu Z. CAR race to cancer immunotherapy: from CAR T, CAR NK to CAR macrophage therapy. *J Exp Clin Cancer Res.* 2022;41(1):119.
112. Fiorenza S, Turtle CJ. CAR-T Cell therapy for acute myeloid leukemia: preclinical rationale, current clinical progress, and barriers to success. *BioDrugs.* 2021;35(3):281–302.
113. Gurney M, O'Dwyer M. Realizing innate potential: CAR-NK cell therapies for acute myeloid leukemia. *Cancers (Basel).* 2021;13(7):1568.
114. Dana H, Chalbatani GM, Jalali SA, Mirzaei HR, Grupp SA, Suarez ER, et al. CAR-T cells: early successes in blood cancer and challenges in solid tumors. *Acta Pharm Sin B.* 2021;11(5):1129–47.
115. Rafei H, Daher M, Rezvani K. Chimeric antigen receptor (CAR) natural killer (NK)-cell therapy: leveraging the power of innate immunity. *Br J Haematol.* 2021;193(2):216–30.
116. Mardiana S, Gill S. CAR T cells for acute myeloid leukemia: state of the art and future directions. *Front Oncol.* 2020;10:697.

117. Xie G, Dong H, Liang Y, Ham JD, Rizwan R, Chen J. CAR-NK cells: a promising cellular immunotherapy for cancer. *EBioMedicine*. 2020;59:102975.
118. Daniyan AF, Brentjens RJ. CARs of the future. *Am J Hematol*. 2019;94(Suppl 1):S55–8.
119. Shafat MS, Gnaneswaran B, Bowles KM, Rushworth SA. The bone marrow microenvironment - home of the leukemic blasts. *Blood Rev*. 2017;31(5):277–86.
120. Gulati GL, Ashton JK, Hyun BH. Structure and function of the bone marrow and hematopoiesis. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1988;2(4):495–511.
121. Parker KH, Beury DW, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells: critical cells driving immune suppression in the tumor microenvironment. *Adv Cancer Res*. 2015;128:95–139.
122. Sui H, Dongye S, Liu X, Xu X, Wang L, Jin CQ, et al. Immunotherapy of targeting MDSCs in tumor microenvironment. *Front Immunol*. 2022;13:990463.
123. Krishnamoorthy M, Gerhardt L, Maleki Vareki S. Immunosuppressive effects of myeloid-derived suppressor cells in cancer and immunotherapy. *Cells*. 2021;10(5):1170.
124. Lv M, Wang K, Huang XJ. Myeloid-derived suppressor cells in hematological malignancies: friends or foes. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):105.
125. Haas L, Obenauf AC. Allies or enemies-the multifaceted role of myeloid cells in the tumor microenvironment. *Front Immunol*. 2019;10:2746.
126. Gao X, Sui H, Zhao S, Gao X, Su Y, Qu P. Immunotherapy targeting myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in tumor microenvironment. *Front Immunol*. 2021;11:585214.
127. De Cicco P, Ercolano G, Ianaro A. The new era of cancer immunotherapy: targeting myeloid-derived suppressor cells to overcome immune evasion. *Front Immunol*. 2020;11:1680.
128. Zhuang J, Zhang J, Lwin ST, Edwards JR, Edwards CM, Mundy GR, et al. Osteoclasts in multiple myeloma are derived from Gr-1+CD11b+myeloid-derived suppressor cells. *PLoS One*. 2012;7(11):e48871.
129. van de Donk NW, Usmani SZ. CD38 Antibodies in multiple myeloma: mechanisms of action and modes of resistance. *Front Immunol*. 2018;9:2134.
130. Ferrer G, Jung B, Chiu PY, Aslam R, Palacios F, Mazzarello AN, et al. Myeloid-derived suppressor cell subtypes differentially influence T-cell function, T-helper subset differentiation, and clinical course in CLL. *Leukemia*. 2021;35(11):3163–75.
131. Stokes J, Molina MS, Hoffman EA, Simpson RJ, Katsanis E. Immunomodulatory effects of bendamustine in hematopoietic cell transplantation. *Cancers (Basel)*. 2021;13(7):1702.
132. Loeuillard E, Yang J, Buckarma E, Wang J, Liu Y, Conboy C, et al. Targeting tumor-associated macrophages and granulocytic myeloid-derived suppressor cells augments PD-1 blockade in cholangiocarcinoma. *J Clin Invest*. 2020;130(10):5380–96.
133. Auwerx J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia*. 1991;47(1):22-31.
134. Schwende H, Fitzke E, Ambs P, Dieter P. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Leukoc Biol*. 1996;59(4):555–61.

135. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol*. 2014;23(1):37–45.
136. Genin M, Clement F, Fattaccioli A, Raes M, Michiels C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer*. 2015;15(1):577.
137. Aldo PB, Craveiro V, Guller S, Mor G. Effect of culture conditions on the phenotype of THP-1 monocyte cell line. *Am J Reprod Immunol*. 2013;70(1):80-6.
138. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6(10):986-94.
139. Green MR, Sambrook J. Quantification of RNA by Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *Cold Spring Harb Protoc*. 2018;2018(10).
140. Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*. 2007;23(10):1289-91.
141. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*. 2013;3(3):71-85.
142. de Haas N, de Koning C, Spilgies L, de Vries IJ, Hato SV. Improving cancer immunotherapy by targeting the STATE of MDSCs. *Oncolimmunology*. 2016;5(7):e1196312.
143. Bruno A, Mortara L, Baci D, Noonan DM, Albini A. Myeloid derived suppressor cells interactions with natural killer cells and pro-angiogenic activities: roles in tumor progression. *Front Immunol*. 2019;10:771.
144. Goedegebuure P, Mitchem JB, Porembka MR, Tan MC, Belt BA, Wang-Gillam A, et al. Myeloid-derived suppressor cells: general characteristics and relevance to clinical management of pancreatic cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2011;11(6):734–51.
145. Weber R, Groth C, Lasser S, Arkhypov I, Petrova V, Altevogt P, et al. IL-6 as a major regulator of MDSC activity and possible target for cancer immunotherapy. *Cell Immunol*. 2021;359:104254.
146. Umansky V, Blattner C, Gebhardt C, Utikal J. The role of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in cancer progression. *Vaccines (Basel)*. 2016;4(4):E36.
147. Ilkovitch D, Ferris LK. Myeloid-derived suppressor cells are elevated in patients with psoriasis and produce various molecules. *Mol Med Rep*. 2016;14(4):3935–40.
148. Pinton L, Solito S, Damuzzo V, Francescato S, Pozzuoli A, Berizzi A, et al. Activated T cells sustain myeloid-derived suppressor cell-mediated immune suppression. *Oncotarget*. 2016;7(2):1168–84.
149. Solito S, Falisi E, Diaz-Montero CM, Doni A, Pinton L, Rosato A, et al. A human promyelocytic-like population is responsible for the immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells. *Blood*. 2011;118(8):2254–65.
150. Bruger AM, Dorhoi A, Esendagli G, Barczyk-Kahlert K, van der Bruggen P, Lipoldova M, et al. How to measure the immunosuppressive activity of MDSC: assays, problems and potential solutions. *Cancer Immunol Immunother*. 2019;68(4):631–44.

151. Zea AH, Rodriguez PC, Atkins MB, Hernandez C, Signoretti S, Zabaleta J, et al. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res.* 2005;65(8):3044–8.
152. Nefedova Y, Nagaraj S, Rosenbauer A, Muro-Cacho C, Sebt SM, Gabrilovich DI. Regulation of dendritic cell differentiation and antitumor immune response in cancer by pharmacologic-selective inhibition of the janus-activated kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Cancer Res.* 2005;65(20):9525–35.
153. Yang R, Cai Z, Zhang Y, Yutzy WH 4th, Roby KF, Roden RB. CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1+CD11b+ myeloid cells. *Cancer Res.* 2006;66(13):6807–15.
154. Lechner MG, Liebertz DJ, Epstein AL. Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol.* 2010;185(4):2273–84.
155. Marigo I, Bosio E, Solito S, Mesa C, Fernandez A, Dolcetti L, et al. Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBPbeta transcription factor. *Immunity.* 2010;32(6):790–802.
156. Law AM, Valdes-Mora F, Gallego-Ortega D. Myeloid-derived suppressor cells as a therapeutic target for cancer. *Cells.* 2020;9(3):E561.
157. Neelapu SS, Tummala S, Kebriaei P, Wierda W, Gutierrez C, Locke FL, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy - assessment and management of toxicities. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(1):47–62.
158. Mehta RS, Rezvani K. Chimeric antigen receptor expressing natural killer cells for the immunotherapy of cancer. *Front Immunol.* 2018;9:283.
159. Thudium Mueller K, Grupp SA, Maude SL, Levine JE, Pulsipher MA, Boyer MW, et al. Tisagenlecleucel immunogenicity in relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia and diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Adv.* 2021;5(23):4980–91.
160. McNeer JL, Rau RE, Gupta S, Maude SL, O'Brien MM. Cutting to the front of the line: immunotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2020;40:1–12.
161. Inaba H, Pui CH. Immunotherapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Metastasis Rev.* 2019;38(4):595–610.
162. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2018;378(5):439–48.
163. Liu E, Marin D, Banerjee P, Macapinlac HA, Thompson P, Basar R, et al. Use of CAR-transduced natural killer cells in CD19-positive lymphoid tumors. *N Engl J Med.* 2020;382(6):545–53.
164. Yilmaz A, Cui H, Caligiuri MA, Yu J. Chimeric antigen receptor-engineered natural killer cells for cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol.* 2020;13(1):168.
165. Davies JO, Stringaris K, Barrett AJ, Rezvani K. Opportunities and limitations of natural killer cells as adoptive therapy for malignant disease. *Cytotherapy.* 2014;16(11):1453–66.

166. Olson JA, Leveson-Gower DB, Gill S, Baker J, Beilhack A, Negrin RS. NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects. *Blood*. 2010;115(21):4293–301.
167. Kerbaux LN, Marin ND, Kaplan M, Banerjee PP, Berrien-Elliott MM, Becker-Hapak M, et al. Combining AFM13, a bispecific CD30/CD16 antibody, with cytokine-activated blood and cord blood-derived NK cells facilitates CAR-like responses against CD30⁺ malignancies. *Clin Cancer Res*. 2021;27(13):3744–56.
168. Knorr DA, Ni Z, Hermanson D, Hexum MK, Bendzick L, Cooper LJ, et al. Clinical-scale derivation of natural killer cells from human pluripotent stem cells for cancer therapy. *Stem Cells Transl Med*. 2013;2(4):274–83.
169. Christodoulou I, Ho WJ, Marple A, Ravich JW, Tam A, Rahnama R, et al. Engineering CAR-NK cells to secrete IL-15 sustains their anti-AML functionality but is associated with systemic toxicities. *J Immunother Cancer*. 2021;9(12):e003894.
170. Jain MD, Zhao H, Wang X, Atkins R, Menges M, Reid K, et al. Tumor interferon signaling and suppressive myeloid cells are associated with CAR T-cell failure in large B-cell lymphoma. *Blood*. 2021;137(19):2621–33.
171. Parihar R, Rivas C, Huynh M, Omer B, Lapteva N, Metelitsa LS, et al. NK cells expressing a chimeric activating receptor eliminate MDSCs and rescue impaired CAR-T cell activity against solid tumors. *Cancer Immunol Res*. 2019;7(3):363–75.
172. Sloas C, Gill S, Klichinsky M. Engineered CAR-macrophages as adoptive immunotherapies for solid tumors. *Front Immunol*. 2021;12:783305.
173. Anderson NR, Minutolo NG, Gill S, Klichinsky M. Macrophage-based approaches for cancer immunotherapy. *Cancer Res*. 2021;81(5):1201–8.
174. Klichinsky M, Ruella M, Shestova O, Lu XM, Best A, Zeeman M, et al. Human chimeric antigen receptor macrophages for cancer immunotherapy. *Nat Biotechnol*. 2020;38(8):947–53.
175. Morrissey MA, Williamson AP, Steinbach AM, Roberts EW, Kern N, Headley MB, et al. Chimeric antigen receptors that trigger phagocytosis. *eLife*. 2018;7:7.
176. Franklin RA, Liao W, Sarkar A, Kim MV, Bivona MR, Liu K, et al. The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science*. 2014;344(6186):921–5.
177. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res*. 2006;66(2):605–12.
178. Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today*. 1992;13(7):265–70.
179. Pio R, Ajona D, Ortiz-Espinosa S, Mantovani A, Lambris JD. Complementing the cancer-immunity cycle. *Front Immunol*. 2019;10:774.
180. Isidori A, Cerchione C, Daver N, DiNardo C, Garcia-Manero G, Konopleva M, et al. Immunotherapy in acute myeloid leukemia: where we stand. *Front Oncol*. 2021;11:656218.
181. Humphreys BD, Bonventre JV. Mesenchymal stem cells in acute kidney injury. *Annu Rev Med*. 2008;59(1):311–25.
182. Reis LA, Borges FT, Simões MJ, Borges AA, Sinigaglia-Coimbra R, Schor N. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells repaired but did not prevent gentamicin-induced acute kidney injury through paracrine effects in rats. *PLoS One*. 2012;7(9):e44092.

183. Varela VA, Oliveira-Sales EB, Maquigussa E, Borges FT, Gattai PP, Novaes AD, et al. Treatment with mesenchymal stem cells improves renovascular hypertension and preserves the ability of the contralateral kidney to excrete sodium. *Kidney Blood Press Res.* 2019;44(6):1404–15.
184. Oliveira-Sales EB, Varela VA, Maquigussa E, Borges FT, Shimoura CG, Gomes G, et al. Renovascular hypertension: effects of mesenchymal stem cells in the contralateral hypertensive kidney in rats. *Clin Exp Hypertens.* 2016;38(7):586–93.
185. Singh A, Singh A, Sen D. Mesenchymal stem cells in cardiac regeneration: a detailed progress report of the last 6 years (2010-2015). *Stem Cell Res Ther.* 2016;7(1):82.
186. Izadi M, Sadr Hashemi Nejad A, Moazenchi M, Masoumi S, Rabbani A, Kompani F, et al. Mesenchymal stem cell transplantation in newly diagnosed type-1 diabetes patients: a phase I/II randomized placebo-controlled clinical trial. *Stem Cell Res Ther.* 2022;13(1):264.
187. Li A, Guo F, Pan Q, Chen S, Chen J, Liu HF, et al. Mesenchymal stem cell therapy: hope for patients with systemic lupus erythematosus. *Front Immunol.* 2021;12:728190.
188. Jiang Y, Zhang P, Zhang X, Lv L, Zhou Y. Advances in mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of osteoporosis. *Cell Prolif.* 2021;54(1):e12956.
189. Sarsenova M, Issabekova A, Abisheva S, Ruts kaya-Moroshan K, Ogay V, Saparov A. Mesenchymal stem cell-based therapy for rheumatoid arthritis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21):11592.
190. Bogatcheva NV, Coleman ME. Conditioned medium of mesenchymal stromal cells: a new class of therapeutics. *Biochemistry (Mosc).* 2019;84(11):1375–89.
191. Kohnken R, Porcu P, Mishra A. Overview of the use of murine models in leukemia and lymphoma research. *Front Oncol.* 2017;7:22.
192. Maiullari F, Costantini M, Milan M, Pace V, Chirivì M, Maiullari S, et al. A multi-cellular 3D bioprinting approach for vascularized heart tissue engineering based on HUVECs and iPSC-derived cardiomyocytes. *Sci Rep.* 2018;8(1):13532.
193. Zhang J, Wehrle E, Rubert M, Müller R. 3D Bioprinting of human tissues: biofabrication, bioinks, and bioreactors. *Int J Mol Sci.* 2021;22(8):3971.
194. Groll J, Burdick JA, Cho DW, Derby B, Gelinsky M, Heilshorn SC, et al. A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. *Biofabrication.* 2018;11(1):013001.
195. Habanjar O, Diab-Assaf M, Caldefie-Chezet F, Delort L. 3D cell culture systems: tumor application, advantages, and disadvantages. *Int J Mol Sci.* 2021;22(22):12200.
196. Kang HW, Lee SJ, Ko IK, Kengla C, Yoo JJ, Atala A. A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. *Nat Biotechnol.* 2016;34(3):312–9.
197. Cubo N, Garcia M, Del Cañizo JF, Velasco D, Jorcano JL. 3D bioprinting of functional human skin: production and in vivo analysis. *Biofabrication.* 2016;9(1):015006.
198. Kim JH, Seol YJ, Ko IK, Kang HW, Lee YK, Yoo JJ, et al. 3D bioprinted human skeletal muscle constructs for muscle function restoration. *Sci Rep.* 2018;8(1):12307.
199. Manda-Handzlik A, Bystrzycka W, Wachowska M, Sieczkowska S, Stelmaszczyk-Emmel A, Demkow U, et al. The influence of agents differentiating HL-60 cells toward granulocyte-like cells on their ability to release neutrophil extracellular traps. *Immunol Cell Biol.* 2018;96(4):413–25.

200. Guo Y, Gao F, Wang Q, Wang K, Pan S, Pan Z, et al. Differentiation of HL-60 cells in serum-free hematopoietic cell media enhances the production of neutrophil extracellular traps. *Exp Ther Med*. 2021;21(4):353.
201. Barber N, Belov L, Christopherson RI. All-trans retinoic acid induces different immunophenotypic changes on human HL60 and NB4 myeloid leukaemias. *Leuk Res*. 2008;32(2):315–22.
202. Ahmed N, Williams JF, Weidemann MJ. Glycolytic, glutaminolytic and pentose-phosphate pathways in promyelocytic HL60 and DMSO-differentiated HL60 cells. *Biochem Mol Biol Int*. 1993;29(6):1055–67.

Abstract

Introduction: Myeloid-derived suppressor cells are a heterogeneous population of immature myeloid cells with a potent suppressor profile that negatively regulates immune responses. These cells are one of the main components of the microenvironment of several diseases, including solid and hematologic tumors, autoimmune diseases, and chronic inflammation. However, their wide use in studies is difficult and limited because they are a rare population, difficult to isolate, expand, differentiate, and maintain in culture, and complicated phenotypic and functional characterization. **Purpose:** To develop a protocol for the generation of myeloid suppressor cells from the differentiation of the immature leukemic lineage THP-1 with phenotypic and functional characterization consistent with the literature and whose cells generated are capable of contributing to the immune escape of AML lines. **Methods:** We stimulated THP1 immature leukemic cells with G-CSF (100ng/mL) and IL-4 (20ng/mL) for seven days to differentiate into the MDSC-like profile. At the end of the protocol, we evaluated immunophenotyping and gene expression for phenotypic characterization and performed assays for cytokine release, lymphocyte proliferation, and killing with NK cells for functional characterization. **Results:** We differentiate THP1 cells in an MDSC-like population, named THP1-MDSC-like, which presented immunophenotyping and gene expression profiles compatible with that described in the literature. These THP1-MDSC-like cells secreted several immunoregulatory cytokines into the microenvironment, consistent with the suppressor profile related to MDSC described in the literature. In addition, the supernatant of these cells was able to decrease the proliferation of activated lymphocytes and protect the leukemic cells (THP1 and HL60) from apoptosis induced by NK cells. Furthermore, we verified that this phenotypic and functional differentiation did not deviate to a macrophage-like profile and observed that our THP1-MDSC-like cells did not show characteristics of M1 or M2 macrophages. The final product of this work, THP1-MDSC-like cells, has the potential to solve one of the foremost current challenges in the scientific community regarding MDSC, which is the generation of MDSC-like cells on a large scale, thus being able to impact the course of several studies and models in contexts, such as cancers, immunodeficiencies, autoimmunity, and chronic inflammation. **Conclusions:** We developed an effective protocol for large-scale myeloid-derived suppressor cell production from the differentiation of the immature myeloid cell line THP-1 induced by G-

CSF and IL-4 that were actively immunophenotypically and functionally characterized robustly and consistently with the literature. Furthermore, we demonstrated that THP1-MDSC-like suppressor cells can contribute to the immune escape of AML cell lines.

Keywords: Myeloid-derived suppressor cells; Leukemia, myeloid, acute; Tumor microenvironment; Cell differentiation