

Implicación de las células inmunosupresoras mieloides en las neoplasias hematológicas

Lourdes Cordón, Ph.D.

Lab. Citometría de Flujo

Grupo de Investigación en Hematología

2 de mayo de 2022



Instituto de
Investigación
Sanitaria LaFe

LaFe
Hospital
Universitari
i Politécnic



HematoLaFe

ciberonc
Centro de Investigación Biomédica en Red
Cáncer

GCCV
Grupo de Citometría de la Comunidad Valenciana

GEOFH
Grupo Español de Citometría
de Flujo Hematológica



Índice

- Células supresoras de origen mieloides (MDSCs)
- Mecanismos de inmunosupresión mediados por MDSCs
- Caracterización por citometría de MDSCs
- MDSCs en neoplasias hematológicas

GCCV
Grupo de Citometría de la Comunidad Valenciana

Índice

- Células supresoras de origen mieloide (MDSCs)
- Mecanismos de inmunosupresión mediados por MDSCs
- Caracterización por citometría de MDSCs
- MDSCs en neoplasias hematológicas

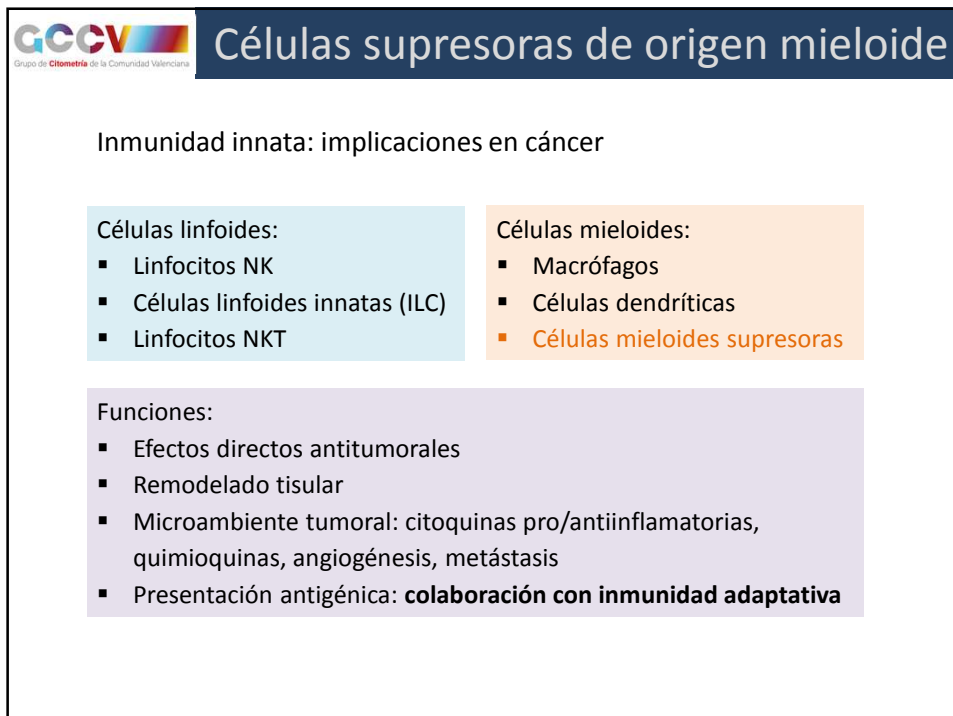
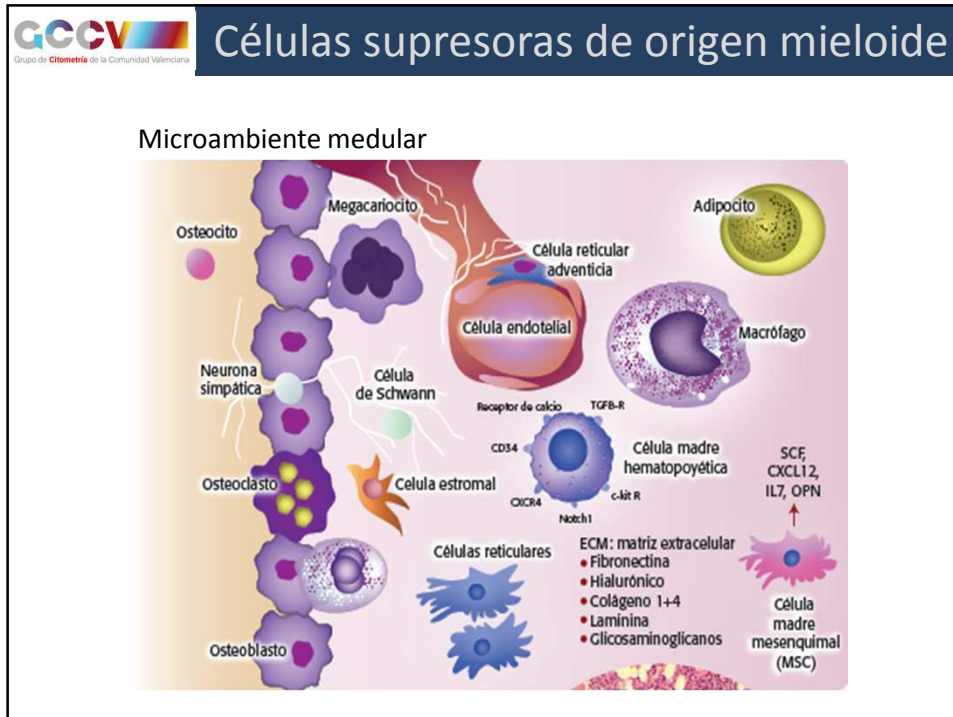
GCCV
Grupo de Citometría de la Comunidad Valenciana

Células supresoras de origen mieloide

Microambiente medular

The diagram illustrates the bone marrow niche and the differentiation of hematopoietic stem cells. On the left, the **BONE MARROW NICHE** is shown, containing **Mesenchymal stromal cells**, **Endothelial cells**, **Megakaryocytes**, **Osteoclasts**, and **Osteoblasts**. These cells interact with **Hematopoietic stem cells** through **Homing** (SDF-1/CXCR4) and **Quiescence**. The stem cells are supported by **Stem cell factor**, **Angiopoietin**, **G-CSF**, **Notch Ligands**, **Osteopontin**, and **Thrombopoietin**. The stem cells undergo **Self-renewal/proliferation** and **Differentiation** into various blood cell lineages: **Platelets**, **Granulocytes**, **Red blood cells**, **Lymphocytes**, **Monocytes**, **Mast cell**, **Basophil**, **Neutrophil**, **Macrophage**, **Dendritic cell**, **B cell**, **T cell**, and **NK cell**.

On the right, a flowchart shows the differentiation of **Hematopoietic stem cells** into various lineages. The stem cells are characterized by **CD135⁺CD48⁺CD135⁺CD34⁺lin⁻KIT⁺SCA1⁺**. They differentiate into **ST-HSC** (CD135⁺CD48⁺CD135⁺CD34⁺lin⁻KIT⁺SCA1⁺) and **Multipotent Progenitor (MPP)** (CD135⁺CD48⁺CD135⁺CD34⁺lin⁻KIT⁺SCA1⁺). The MPP further differentiates into **CLP** (CD34⁺lin⁻KIT⁺SCA1⁺Flt3⁺) and **MEP** (CD34⁺lin⁻KIT⁺SCA1⁺FcγR⁺). The CLP lineage includes **erythrocyte**, **megakaryocyte**, **platelets**, **basophil**, **neutrophil**, **macrophage**, **dendritic cell**, **B cell**, **T cell**, and **NK cell**. The MEP lineage includes **erythrocyte**, **megakaryocyte**, **platelets**, **basophil**, **neutrophil**, **macrophage**, **dendritic cell**, **B cell**, **T cell**, and **NK cell**.



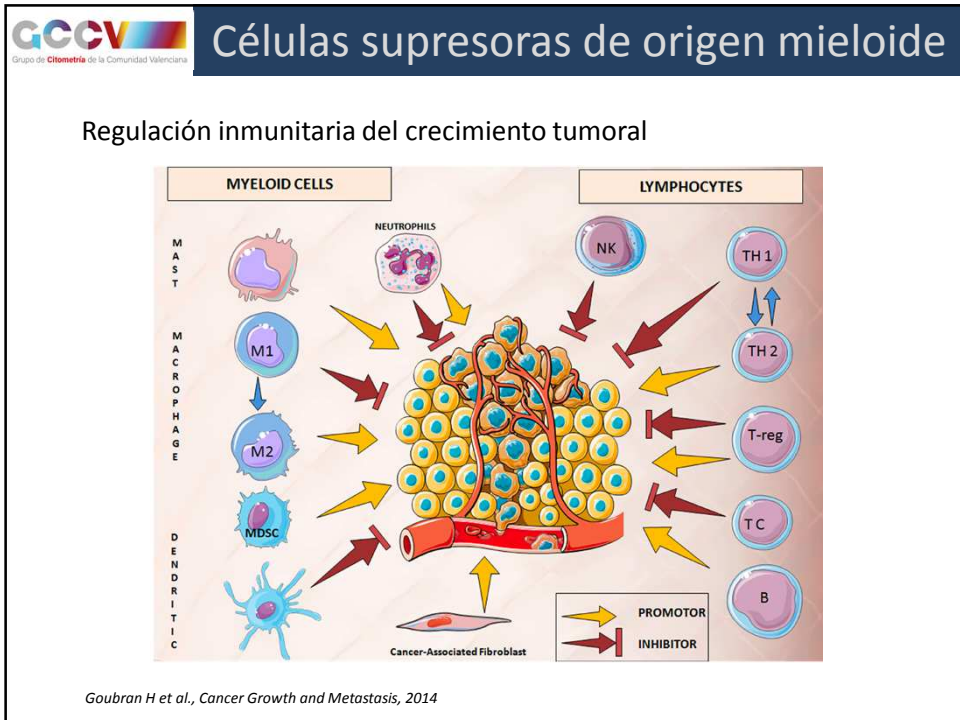


Table 1 Immunophenotyping used for identification of different subtypes of MDSC in human cancers

MDSC subtype	Phenotype	Nuclear morphology	Suppressive activity	Tumor entity	References
GM-MDSC	CD15 ⁺	Poly	Yes	Pancreas, colon and breast cancer	[11]
	CD14 ^{low} CD15 ⁺	ND	Yes	Renal carcinoma	[43]
	CD11b ⁺ CD15 ⁺	ND	Yes	Uveal melanoma	[50]
	CD11b ⁺ CD15 ⁺ CD33 ^{low}	Poly	Yes	Bladder carcinoma	[51]
	CD11b ⁺ CD14 ^{low} CD15 ⁺	Poly	Yes	Renal carcinoma	[46]
	CD11b ⁺ CD33 ⁺ CD15 ⁺	Poly + mono	Yes	NSCLC	[48]
	CD11b ⁺ CD33 ⁺ CD15 ⁺	Poly	ND	Pancreatic adenocarcinoma	[47]
	CD11b ⁺ CD33 ⁺ CD14 ^{low} CD15 ⁺	Poly	Yes	NSCLC	[49]
	CD11b ⁺ CD33 ⁺ CD66 ⁺ VEGFR1 ⁺ CD14 ^{low} CD15 ⁺	Poly	Yes	Renal carcinoma	[10]
	CD11b ⁺ CD33 ⁺ HLA-DR ^{low} CD14 ^{low} CD66 ⁺ CD15 ⁺	ND	Yes	Glioblastoma	[52]
	CD11b ⁺ CD33 ⁺ HLA-DR ^{low} CD14 ^{low} CD66 ⁺ CD15 ⁺	Poly	Yes	Glioblastoma	[53]
	CD33 ⁺ HLA-DR ^{low} CD66 ⁺	Precursor	Yes	HNSCC, urologic and lung cancer	[54]
	CD33 ⁺ HLA ^{low} CD11b ⁺ CD15 ⁺	ND	ND	Gastrointestinal cancer	[44]
	CD14 ⁺ HLA-DR ^{high}	ND	Yes	Melanoma	[37]
	CD14 ⁺ HLA-DR ^{high}	ND	Yes	Hepatocellular carcinoma	[39]
CD14 ⁺ HLA-DR ^{high}	ND	ND	Renal carcinoma	[40]	
CD14 ⁺ HLA-DR ^{high}	ND	Yes	Prostate cancer	[41]	
CD14 ⁺ HLA-DR ^{high}	ND	ND	Multiple myeloma	[42]	
CD14 ⁺ HLA-DR ^{high}	ND	Yes	Bladder carcinoma	[43]	
CD14 ⁺ HLA-DR ^{high} CD33 ⁺	ND	ND	Gastrointestinal cancer	[44]	
CD14 ⁺ HLA-DR ^{high} CD80 ⁺ CD83 ⁺ DC-SIGN ⁺	ND	Yes	Melanoma	[38]	
CD14 ⁺ H-Ra ⁺	ND	Yes	Melanoma, colon carcinoma	[65]	
Lin ^{low} HLA-DR ^{low} CD14 ^{low} CD15 ^{low}	Precursor	Yes	HNSCC, NSCLC, breast cancer	[8]	
ImMc (non-MoMDSC non-GM-MDSC)	Lin ^{low} HLA-DR ^{low} CD33 ⁺ CD11b ⁺ CD14 ^{low} CD16 ^{low}	ND	ND	Glioblastoma	[56]
	Lin ^{low} HLA-DR ^{low} CD33 ⁺ CD11b ⁺ CD14 ^{low} CD16 ^{low}	ND	ND	Gastrointestinal cancer (pancreatic)	[55]
	Lin ^{low} HLA-DR ^{low} CD33 ⁺ CD11b ⁺ CD14 ^{low} CD16 ^{low}	Precursor	Yes	Colorectal cancer	[57]
	HLA-DR ^{low} CD33 ⁺ CD14 ^{low} CD15 ^{low}	ND	Yes	Glioblastoma	[52]
	Lin ^{low} HLA-DR ^{low} CD33 ⁺ CD14 ^{low}	Mixed	Yes	Metastatic renal cell carcinoma	[61]
CD14 ^{low} (non-MoMDSC)	Lin ^{low} HLA-DR ^{low} CD33 ⁺ CD14 ^{low}	ND	ND	Metastatic renal cell carcinoma	[62]
	Lin ^{low} HLA-DR ^{low} CD33 ⁺ CD14 ^{low}	ND	ND	Metastatic renal cell carcinoma	[59]
	Lin ^{low} HLA-DR ^{low} CD33 ⁺ CD11b ⁺ CD14 ^{low}	ND	Yes	Breast cancer	[60]
	CD14 ^{low} CD11b ⁺ CD33 ⁺	ND	Peripheral: no Intratumoral:	HNSCC	[58]
			yes		

Dumitru C et al., *Cancer Immunology and Immunotherapy*, 2012

GCCV Grupo de Citometría de la Comunidad Valenciana

Células supresoras de origen mieloide

MDSCs: células mieloides con capacidad inmunosupresora que presentan un programa de activación patológico diferente al de las células mieloides maduras y diferenciadas de forma terminal

Condiciones patológicas

↓

Mielopoyesis de emergencia

↓

Eliminación de amenazas potenciales

↓

Resolución

SI

↓

Restauración del equilibrio
(sin consecuencias negativas)

NO

↓

Acumulación de IMCs

Regulación inmunitaria en:

- Inflamación crónica
- Cáncer
- Infecciones
- Enfermedades autoinmunes
- Trauma
- EICH (trasplante)

GCCV Grupo de Citometría de la Comunidad Valenciana

Células supresoras de origen mieloide

Origen MDSCs

a Bone marrow

GM-CSF, M-CSF, SCF, IL-3 and FLT3

Factores solubles, TK, moléculas expresadas por células

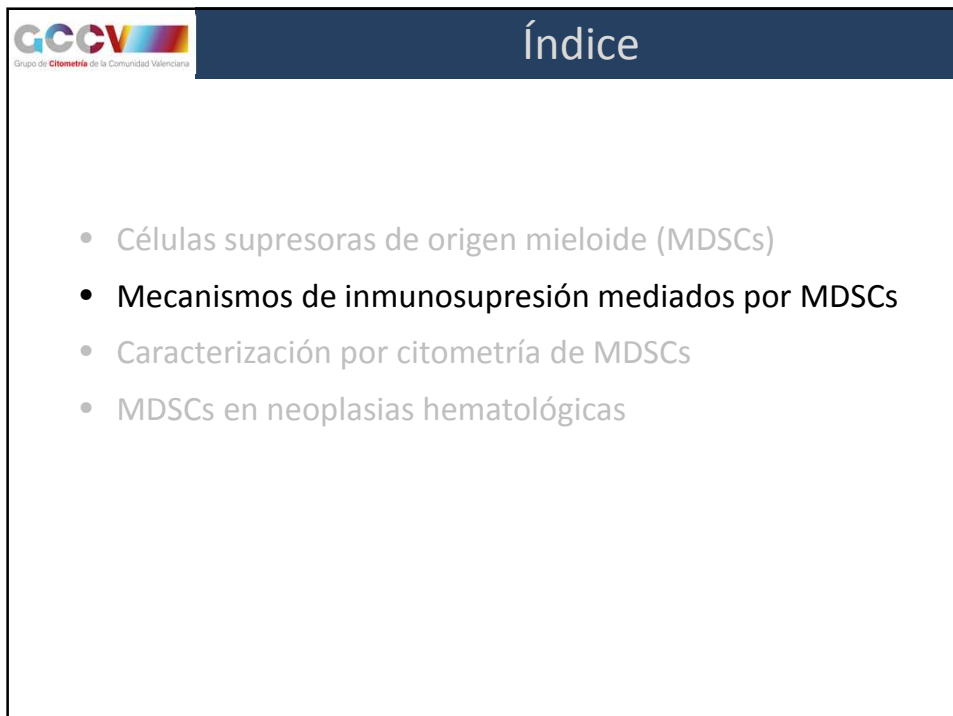
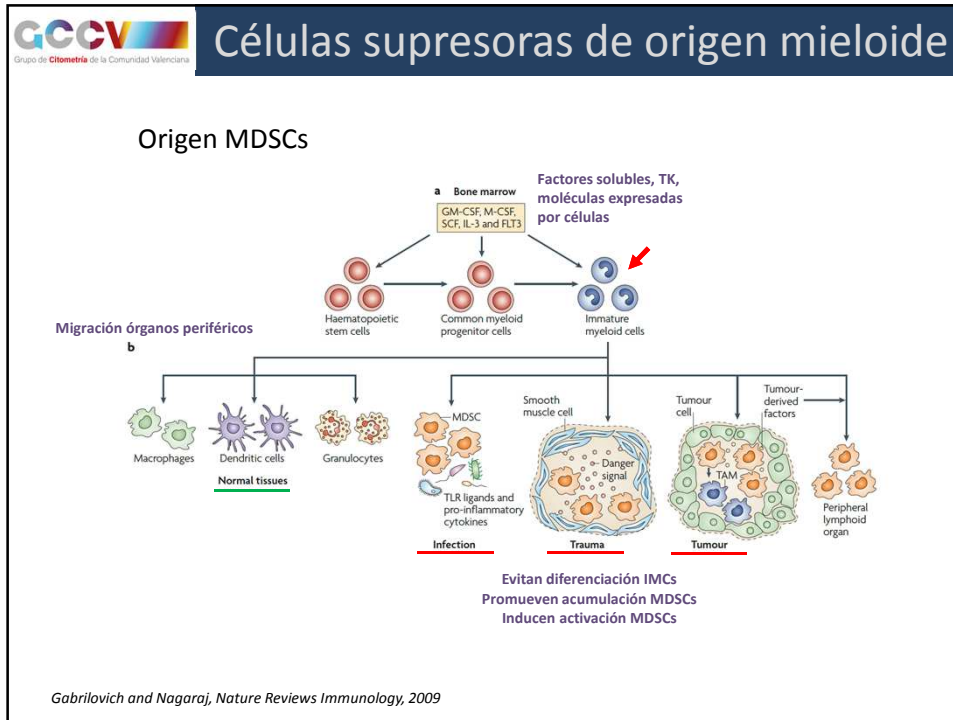
Haematopoietic stem cells Common myeloid progenitor cells Immature myeloid cells

b Migración órganos periféricos

Macrophages Dendritic cells Granulocytes

Normal tissues

Gabrilovich and Nagaraj, Nature Reviews Immunology, 2009



GCCV
Grupo de **Citometría** de la Comunidad Valenciana

Mecanismos de inmunosupresión

Mecanismos de inmunosupresión mediados por MDSCs

a Induction of immunosuppressive cells

- Secreción de IL-10 e IFN- γ
- Generación de macrófagos M2 (inmunosupresores)
- Generación de células T reguladoras

Groth C et al., *British Journal Cancer* 2019

GCCV
Grupo de **Citometría** de la Comunidad Valenciana

Mecanismos de inmunosupresión

Mecanismos de inmunosupresión mediados por MDSCs

b Impaired lymphocyte homing

- Alteración de adhesión linfocitaria a las células endoteliales
- Extravasación por *downregulation* mediada por NO de CD162 y CD44
- Escisión de CD62L en células T por la enzima convertidora del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α)

Groth C et al., *British Journal Cancer* 2019

GCCV
Grupo de **Citometría** de la Comunidad Valenciana

Mecanismos de inmunosupresión

Mecanismos de inmunosupresión mediados por MDSCs

c Free radical production

- Producción especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) a través de NADPH oxidasa y óxido nítrico sintasa
- Aumento de actividad cicloxigenasa-2 (Cox-2), el factor (HIF-1α) hipoxia inducible, la expresión de ARG-1
- Reducción de la expresión de TCR

Groth C et al., British Journal Cancer 2019

GCCV
Grupo de **Citometría** de la Comunidad Valenciana

Mecanismos de inmunosupresión

Mecanismos de inmunosupresión mediados por MDSCs

d Metabolic depletion

- Depleción y degradación intracelular de los aminoácidos L-arginina y cisteína a través del aumento de la captación vía CAT2B y SLC7A11, respectivamente

Groth C et al., British Journal Cancer 2019

GCCV
Grupo de Citometría de la Comunidad Valenciana

Mecanismos de inmunosupresión

Mecanismos de inmunosupresión mediados por MDSCs

e Ectoenzymes regulating adenosine production

The diagram illustrates the mechanism of immunosuppression mediated by MDSCs through adenosine production. On the MDSC side, TGF-β and Hypoxia activate HIF-1, which in turn upregulates mTOR. mTOR also upregulates HIF-1. HIF-1 then upregulates CD73 and CD39. CD73 and CD39 are ectoenzymes that convert ATP to AMP and adenosine. Adenosine is then released and binds to CD73 on the T-cell. This interaction leads to decreased phosphorylation of Zap70, ERK, and Akt, and reduced expression of CD95L, perforin, IFN-γ, TNF-α, and CD25 on the T-cell.

- Inducción de los ectoenzimas CD39 y CD73 vía HIF-1 a través de la transformación de TGFβ
- Hipoxia que conducen a la producción de adenosina y reducción de la fosforilación extracelular de la kinasa ERK, Akt y Zap70, reducción de la expresión de CD95L, perforina, IFNγ y TNFα en células T

Groth C et al., British Journal Cancer 2019

GCCV
Grupo de Citometría de la Comunidad Valenciana

Mecanismos de inmunosupresión

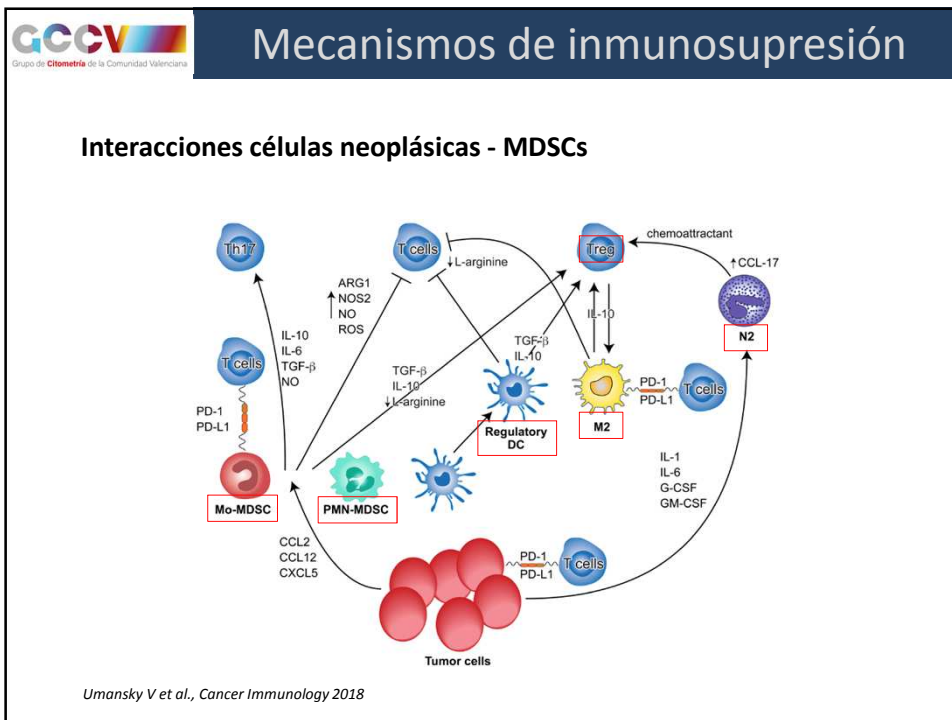
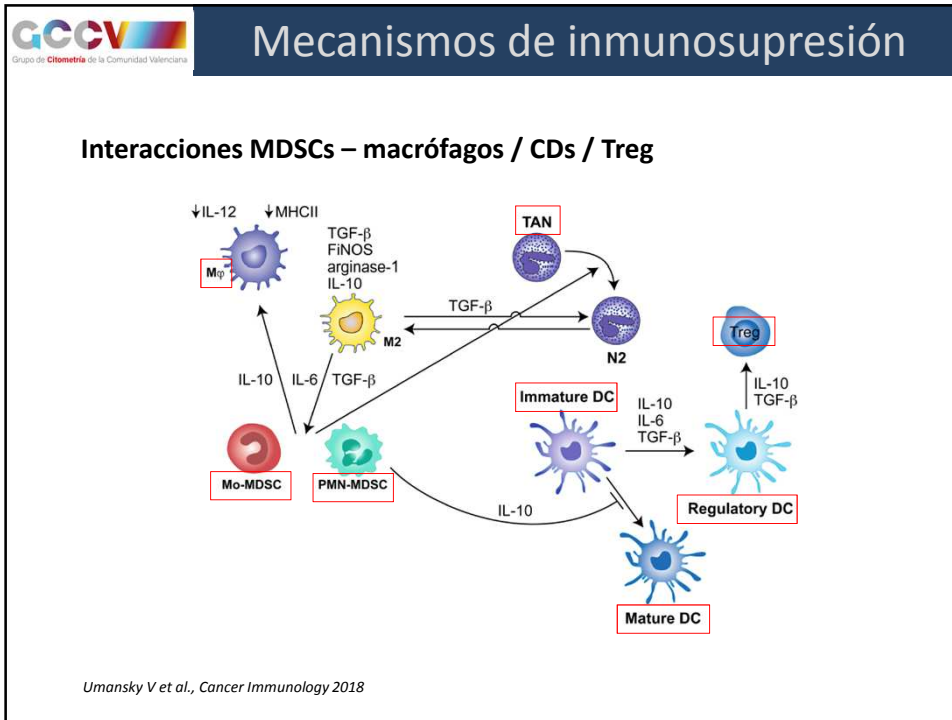
Mecanismos de inmunosupresión mediados por MDSCs

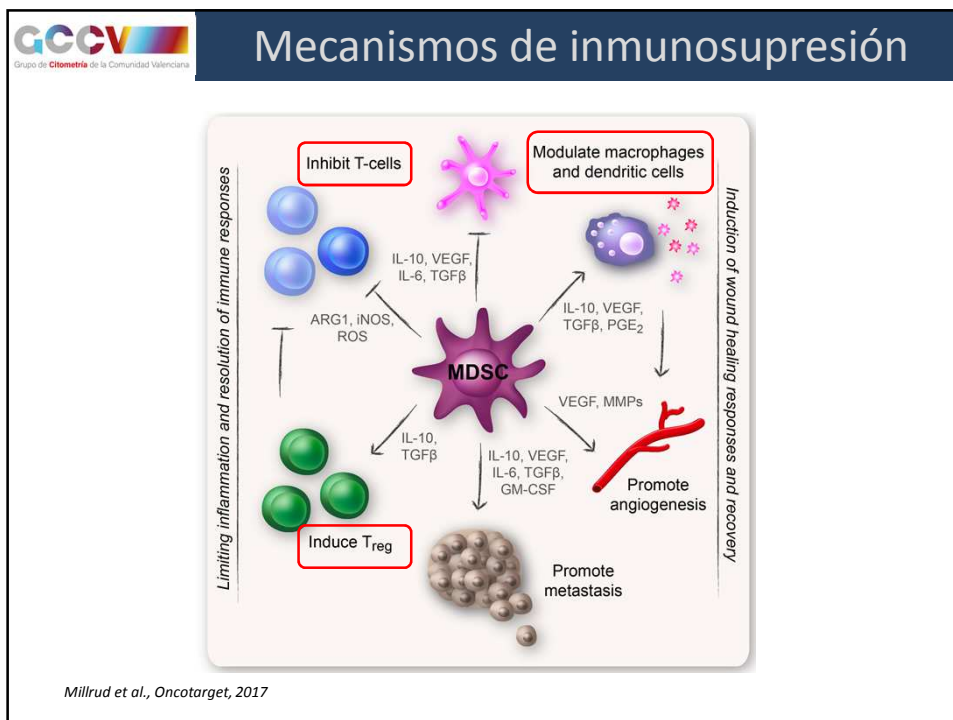
f Activation of immune regulatory molecules

The diagram illustrates the mechanism of immunosuppression mediated by MDSCs through activation of immune regulatory molecules. MDSCs produce IFN-γ, which activates IRF-1. IRF-1 upregulates B7 and PD-L1. B7 binds to CTLA-4 on the T-cell, leading to T-cell anergy. PD-L1 binds to PD-1 on the T-cell, leading to T-cell apoptosis. MDSCs also express FasL, which binds to Fas on the T-cell, leading to upregulation of Fas. NO is also produced by MDSCs and acts on T-cells.

- Expresión de moléculas reguladoras inmunitarias B7, PD-L1, FasL
- Anergia y apoptosis a través de la unión a sus respectivos receptores

Groth C et al., British Journal Cancer 2019





GCCV
Grupo de Citometría de la Comunidad Valenciana

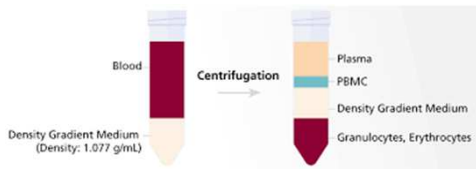
Índice

- Células supresoras de origen mieloide (MDSCs)
- Mecanismos de inmunosupresión mediados por MDSCs
- **Caracterización por citometría de MDSCs**
- MDSCs en neoplasias hematológicas

GCCV
Grupo de Citometría de la Comunidad Valenciana

Caracterización por citometría

Características fenotípicas MDSCs



Flotabilidad alterada
↓ gránulos
↓ CD16, CD62L
↑ CD11b, CD66b

Subpoblación MDSCs (PBMNCs)	Inmunofenotipo
e-MDSC	CD33+ CD11b+ HLA-DR-/dim CD14- CD15-
Mo-MDSC	CD33+ CD11b+ HLA-DR-/dim CD14+ CD15-
PMN-MDSC	CD33+ CD11b+ HLA-DR-/dim CD14- CD15+

Control: SP individuos sanos
SP fresca (26 h) → PBMNCs
Posibilidad criopreservación

Bronte V et al., Nature Communications, 2016

GCCV
Grupo de Citometría de la Comunidad Valenciana

Caracterización por citometría


Table 1 | Minimal phenotypic characteristics necessary to identify cells as MDSC.

Human (in PBMC fraction)	Phenotype
Total (mixed) MDSC	Not clearly determined
PMN-MDSC	CD14 ⁻ CD11b ⁺ CD15 ⁺ (or CD66b ⁺)
M-MDSC	CD11b ⁺ CD14 ⁺ HLA-DR ^{low} /- CD15 ⁻
e-MDSC	Lin ⁻ (CD3/14/15/19/56) ⁻ HLA-DR ⁻ /CD33 ⁺

Table 2 | Minimal functional characteristics necessary to identify cells as MDSC.

Human functional tests	
Autologous system	Allogeneic system
<ul style="list-style-type: none"> Inhibition of anti-CD3/CD28 (or PHA) induced T-cell proliferation or IFN-γ production (in ELISPOT or by intracellular staining) by the addition of candidate MDSC populations Improved T-cell proliferation after removal of candidate MDSC populations 	<ul style="list-style-type: none"> Inhibition of proliferation or IFN-γ production by T cells (in ELISA, ELISPOT or by intracellular staining) by the addition of selected MDSC populations

Bronte V et al., Nature Communications, 2016

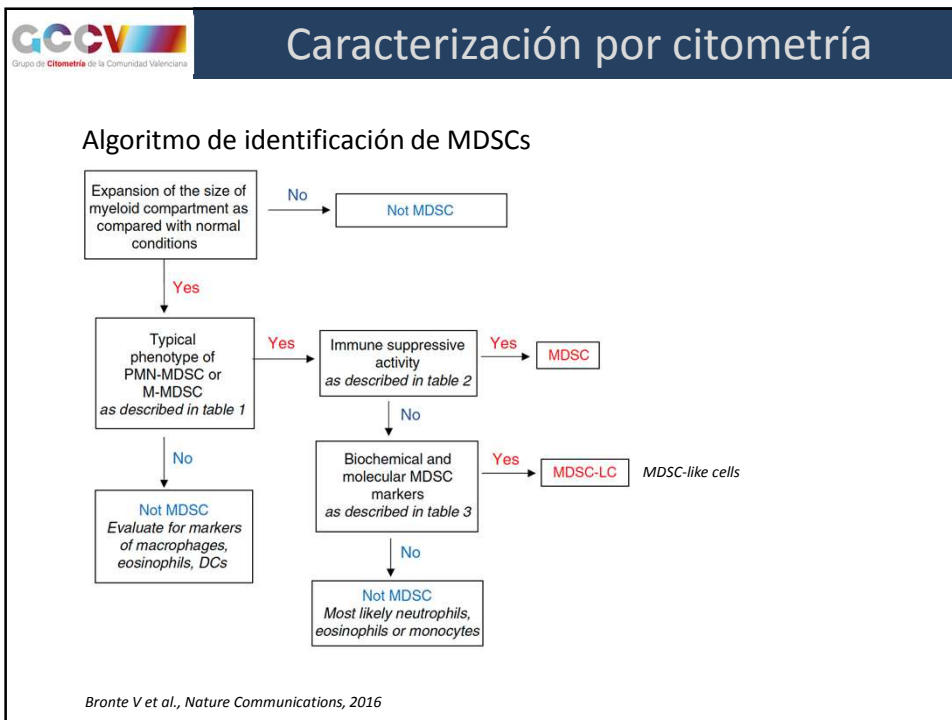


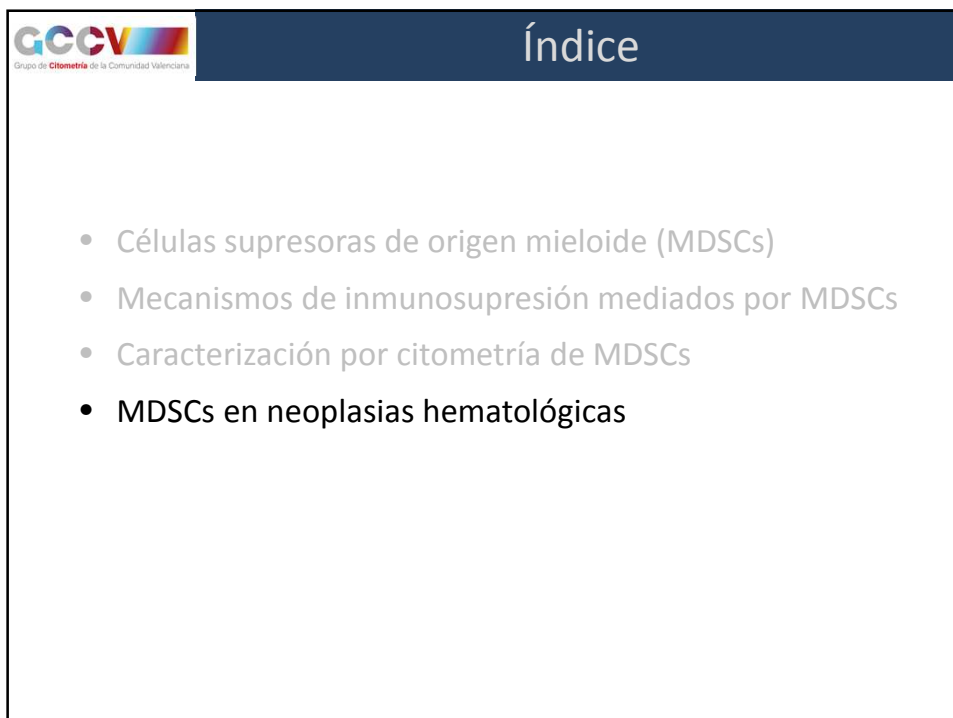
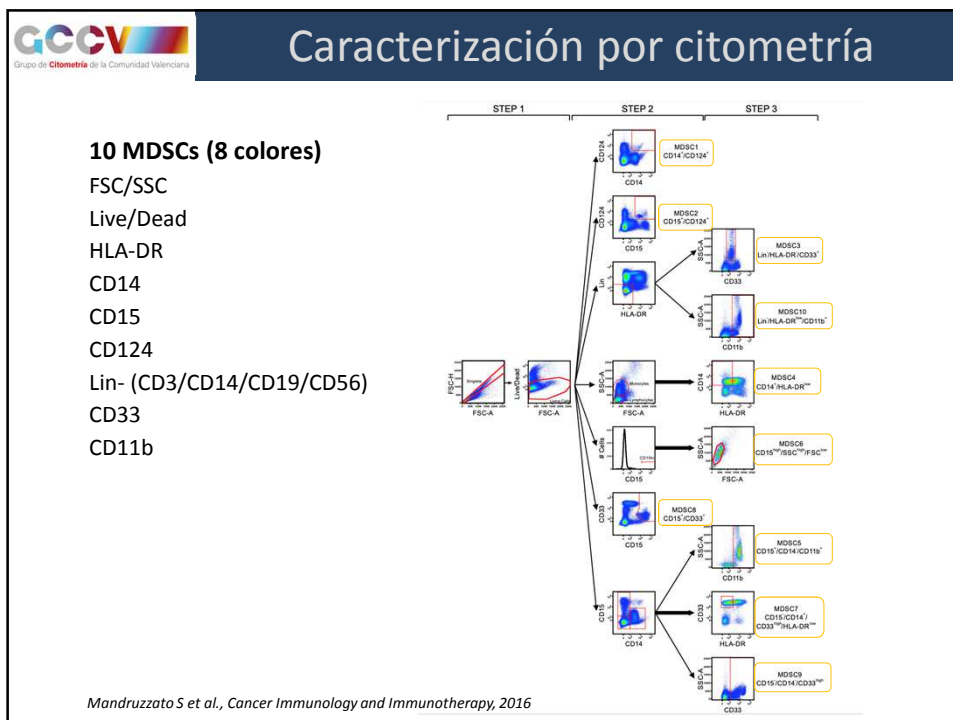
Caracterización por citometría

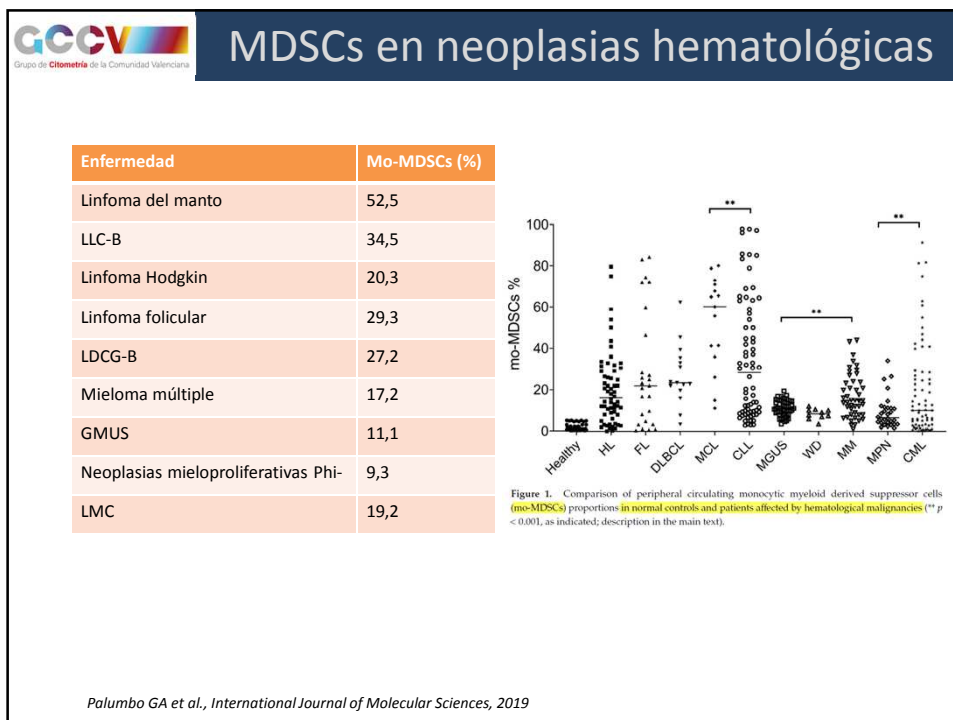
Table 3 | Biochemical and molecular parameters associated with MDSC characterization.

Class of biomarkers	Biomarker	Detection technology	Mainly found in
Transcription factors and apoptotic regulators	↓ IRF8*	FC, P	MDSC
	Phospho-STAT3*	PTM (FC, ELI), FA	MDSC
	cEBP/β*	ELI, P, T, FA	MDSC
	S100A8/9*	ELI, FC, IHC, P, T	MDSC
	RB	IF, P, T, FC	M-MDSC > PMN-MDSC
	Phospho-STAT5	PTM (FC, IHC, P), FA	MDSC
	ROR/RORC1	FC, P	PMN-MDSC
Genes and molecules contributing to the immune-regulatory activity	αXBP, CHOP	P, T	MDSC
	ARG1*	E, FC, IHC, P, T	M-MDSC
	NOS2/NO*	FC, IF, IHC, P, T	M-MDSC
	NOX2/ROS*	E, FC, P, T	PMN-MDSC
	PNT/RNS*	PTM (IHC), E, FC	MDSC
	VEGF	FC, IHC	MDSC
	PGE ₂	ELI	M-MDSC
Cytokines and receptors	PD-L1	FC, P, T	MDSC
	IL-10*	ELI, FC, T	MDSC
	TGFβ1*	ELI, FC, T, P	M-MDSC
	IL-4R (CD124)*	FC, T	M-MDSC
Cytokines involved in MDSC development <small>These cytokines are not produced by MDSC. However, they are important for the evaluation of MDSC microenvironment.</small>	GM-CSF	ELI, T	MDSC
	G-CSF	ELI, T	PMN-MDSC
	IL-13	FC	M-MDSC
	IL-1	ELI	MDSC

Bronte V et al., Nature Communications, 2016







GCCV
Grupo de Citometría de la Comunidad Valenciana

MDSCs en neoplasias hematológicas

Enfermedad	↑ Mo-MDSCs	↑ PMN-MDSCs	↑ e-MDSCs
LH	Predictor independiente de resultados Estadios avanzados (reducción tras ABVDx6) Progresión	Inmunosupresión Mal pronóstico Mejor correlación con resultados	
LF	Peores resultados	Mal pronóstico	
LDCG-B	Peores resultados Menor supervivencia libre progresión	Mal pronóstico	
LM	Peores resultados	Mal pronóstico	
LLC-B	Progresión Proliferación		
MM / MGUS	Enfermedad activa	Inmunosupresión Resistencia a tratamiento	
MPN	Respuesta al tratamiento	Respuesta al tratamiento	
LMA / SMD	Peor pronóstico	Peor pronóstico	Inmunosupresión Presencia ERM
LLA		Respuesta clínica Presencia ERM	

Palumbo GA et al., International Journal of Molecular Sciences, 2019
Bewersdorf JP & Zeidan AM, Expert Review of Anticancer Therapy, 2022
Damuzzo V et al., Cytometry B, 2015
Pyzer AR et al., Blood, 2017
Wang L et al., Oncoimmunology, 2018

GCCV
Grupo de Citometría de la Comunidad Valenciana

MDSCs en neoplasias hematológicas

Estrategias con MDSCs como diana: mejora inmunoterapias por diferentes mecanismos

Función MDSCs	Maduración MDSCs	Depleción MDSCs
inhibidores fosfodiesterasa nitroaspirinas triterpenoides sintéticos inhibidores de Cox2 inhibidores de Arg1 anticuerpos anti-glicano inhibidores IL-17 Restauración actividad T	ATRA vitaminas A o D3 IL-12 Diferenciación PMN-MDSCs N-Bifosfonatos moduladores de TK inhibidores de STAT3 Acción sobre programa transcripcional	agentes QT convencionales (gemcitabine, fludarabine, cyclophosphamide) nuevos agentes inmunes (daratumumab) Afectan viabilidad MDSCs Ejercen efectos <i>off-target</i>

Palumbo GA et al., International Journal of Molecular Sciences, 2019

GCCV
Grupo de Citometría de la Comunidad Valenciana

Conclusiones

- Las MDSCs son clave en la regulación de la respuesta inmunitaria en diversas condiciones patológicas
- La interacción entre MDSCs, células inmunitarias y células neoplásicas se produce en ambas direcciones y se retroalimenta
- La citometría de flujo permite caracterizar diferentes subpoblaciones de MDSCs
- Se recomiendan ensayos funcionales y determinación de parámetros bioquímicos y moleculares para completar la caracterización de MDSCs
- Las MDSCs están implicadas en la mayoría de neoplasias hematológicas, proporcionan información sobre la respuesta, progresión y/o el pronóstico de la enfermedad

Implicación de las células inmunosupresoras mieloides en las neoplasias hematológicas

Lourdes Cordón, Ph.D.

Lab. Citometría de Flujo

Grupo de Investigación en Hematología

2 de mayo de 2022



Instituto de
Investigación
Sanitaria LaFe

LaFe
Hospital
Universitari
i Politécnic



HematoLaFe

ciberonc
Centro de Investigación Biomédica en Red
Cáncer

CCCV
Grupo de **Citometría** de la Comunidad Valenciana

GECFH
Grupo Español de **Citometría**
de Flujo Hematológica