# La inhibición de PD-L1 da lugar a una respuesta IL-17 en los cocultivos de linfocitos T CLA+ con células epidérmicas activados por S. pyogenes en psoriasis

M. Ferran[1,2], E. Ruiz-Romeu[3], C. De Jesus[3], A. Celada[4], RM. Pujol[1,2], LF. Santamaria-Babí[2,3]

1. Departamento de Dermatología. Hospital del Mar. Barcelona. 2. Grupo de Investigación en Enfermedades Inflamatorias y Neoplásicas Dermatológicas. IMIM. Barcelona.
3. Inmunología Traslacional. Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Facultad de Biología. Universitat de Barcelona. Barcelona.
4. Grupo de Biología del Macrófago. Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Facultad de Biología. Universitat de Barcelona. Barcelona

## Introducción

Program cell death (PD)-1 es un receptor transmembrana expresado en linfocitos T activados, de la familia CD28, que al unirse a su ligando (PD-L1) participa en la inhibición de la respuesta inmune exacerbada. En los últimos años se han desarrollado y se están utilizando nuevas terapias oncológicas que específicamente bloquean esta diana (nivolumab, pembrolizumab...). Dentro de los efectos secundarios, se han observado casos que han presentado empeoramiento o debut de psoriasis en los pacientes tratados. El objetivo de nuestro estudio es estudiar cómo se modula la respuesta inmune de los pacientes con psoriasis tras el bloqueo PD-1/L1 *ex vivo*, utilizando un desencadenante clínicamente relevante (*Streptococcus pyogenes*) y linfocitos T patogénicos.

## Material y métodos

Se incluyeron 9 pacientes con psoriasis en placas que habían aceptado participar y signaron el consentimiento informado. Se les realizó una analítica de sangre y 2 biopsias tipo punch: de la extracción sanguínea se aislaron los linfocitos T memoria circulantes con tropismo cutáneo CLA$^+$; a partir de la biopsia cutánea, mediante técnicas mecánicas y químicas, se obtuvieron las células epidérmicas (Epi). Se cocultivaron conjuntamente 5x10$^4$ linfocitos T CLA+/- con 3x10$^4$ células epidérmicas autólogas, y se activaron con 1μg/ml de un extracto de *Streptococcus pyogenes* (SE). En el día 0 se añadió un anticuerpo anti-CD274 (PD1-L1), así como anticuerpos neutralizantes HLA-A/B/C (clase I), o bien el control del isotipo, a una concentración final de 10μg/ml. A los 5 días de cocultivo se evaluaron los niveles de IL-17A y IFN-g mediante inmunoensayo basado en beads fluorescentes Diaplex, y se midió el número de linfocitos T CD4$^+$ y CD8$^+$, así como su activación (por expresión de HLA-DR), por citometría de flujo. Se representan los datos mediante una gráfica de dispersión que muestra la mediana (barra roja).

## Resultados

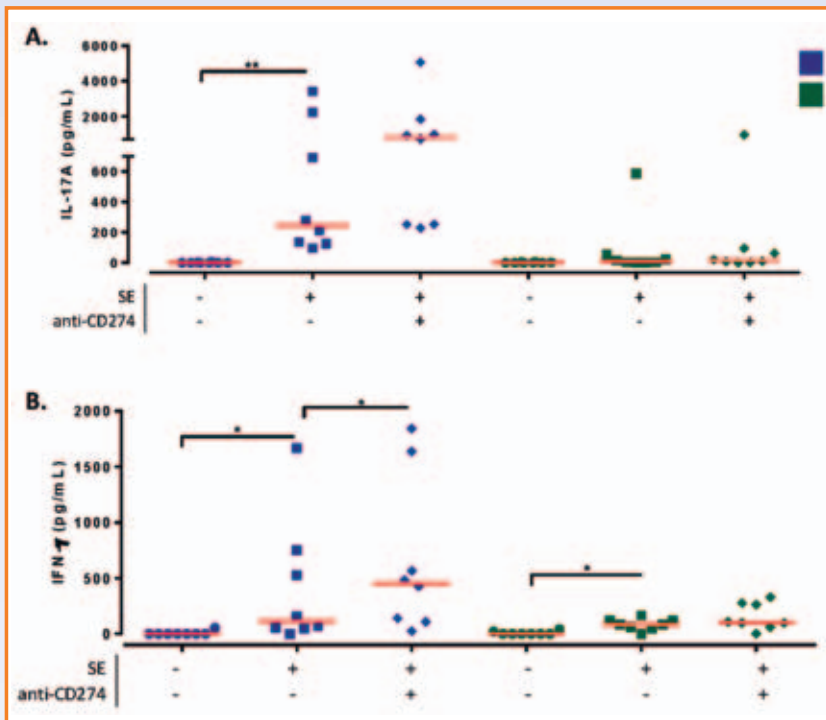


**Figura 1. El bloqueo de CD274 aumenta la producción de IL-17A y IFN-γ dependiente de CLA tras la estimulación de los cocultivos con extracto de estreptococo (SE).** Las células epidérmicas (Epi) y los linfocitos T CLA$^+$ o CLA$^-$ de pacientes con psoriasis fueron cocultivados y se activaron con SE, con y sin la presencia del anticuerpo neutralizante de CD274, comparándose con la condición de cocultivo sin activar. Los sobrenadantes se recogieron en el día 5 y se analizaron los niveles de **(A)** IL-17A (n=8) y **(B)** IFN-γ (n=8). Para comparar las dos condiciones se utilizó una prueba t de muestras apareadas (**: p<0.01, *: p<0.05). Se observó que a pesar que la inhibición de CD274 muestra un incremento tanto en los niveles de IL-17A como de IFN-γ tras la estimulación del cocultivo CLA$^+$/Epi (y no en CLA$^-$) con SE, dicho incremento es más marcado en el caso de IL-17A.

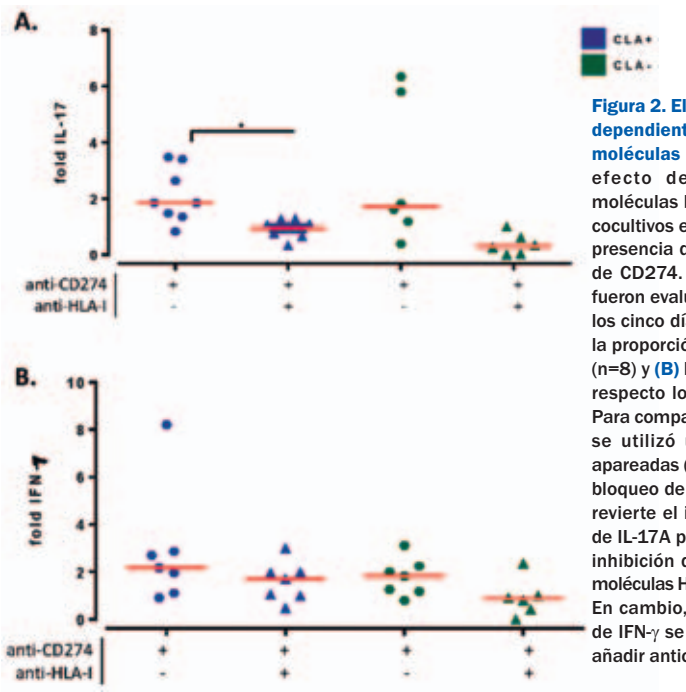


**Figura 2. El incremento de IL-17A y IFN-γ dependiente de CD274 es mediado por moléculas HLA de clase I.** Se analizó el efecto de añadir adicionalmente moléculas bloqueadoras de HLA-I en los cocultivos estimulados con SE con/sin la presencia de anticuerpos neutralizantes de CD274. Los niveles de IL-17 y IFN-γ fueron evaluados en los sobrenadantes a los cinco días. En la figura se representa la proporción de los niveles de **(A)** IL-17A (n=8) y **(B)** IFN-γ (n=8) en cada condición respecto los isotipos correspondientes. Para comparar las diferentes condiciones se utilizó una prueba t de muestras apareadas (*: p<0.05). Se observó que el bloqueo de las moléculas HLA de clase I revierte el incremento de la producción de IL-17A por los linfocitos T CLA$^+$ tras la inhibición de CD274, indicando que las moléculas HLA-I median dicho incremento. En cambio, la proporción de los niveles de IFN-γ se ve escasamente afectada al añadir anticuerpo neutralizante de HLA-I.

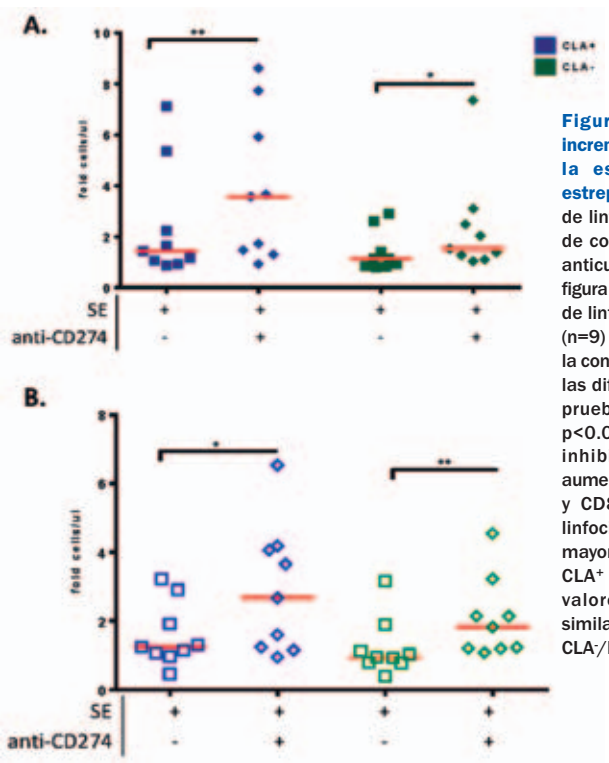


**Figura 3. La inhibición de CD274 incrementa el número de linfocitos T tras la estimulación con extracto de estreptococo (SE).** Se analizó el número de linfocitos T CD4$^+$ y CD8$^+$ a los 5 días de cocultivo, ante la presencia o no de anticuerpos neutralizantes de CD274. La figura representa la proporción del número de linfocitos T **(A)** CD4$^+$ (n=9) y **(B)** CD8+ (n=9) tras la estimulación con SE respecto la condición basal (sin SE). Para comparar las diferentes condiciones se utilizó una prueba t de muestras apareadas (**: p<0.01, *: p<0.05). Se observó que la inhibición de CD274 condicionó un aumento en el número de linfocitos T CD4$^+$ y CD8$^+$, tanto en los cocultivos con linfocitos T CLA$^+$ y CLA$^-$. Se evidenció un mayor incremento de linfocitos T CD4$^+$ en CLA$^+$ respecto CLA-. Sin embargo, los valores de linfocitos T CD8$^+$ fueron similares entre los cocultivos CLA$^+$/Epi y CLA$^-$/Epi.

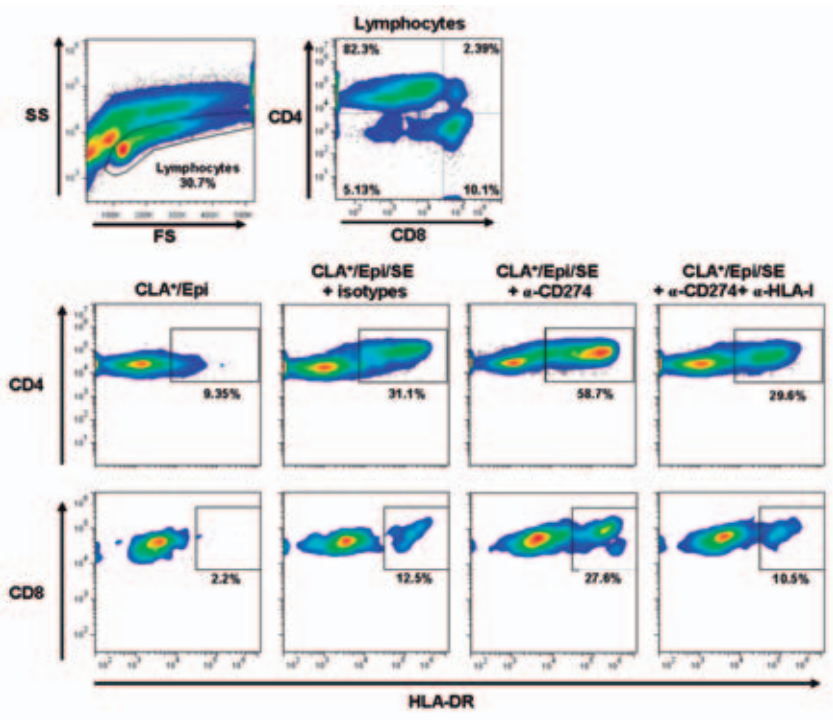


**Figure 4. La inhibición de CD274 induce la activación de los linfocitos T tras la estimulación con extracto de estreptococo (SE) mediado por moléculas HLA de clase I.** Se determinó el número de linfocitos T CD4$^+$ y CD8$^+$ activados a los 5 días de cocultivo ante/sin la presencia de anticuerpos neutralizantes de CD274 y HLA-I. Se analizó el estado de activación a través de la expresión de HLA-DR (n=4). Se muestran los resultados del fenotipo de un paciente representativo. La inhibición de CD274 aumenta el porcentaje de linfocitos T CD4$^+$ y CD8$^+$ T activados, cuando se compara a la condición basal de sólo estimulación por SE. Únicamente el aumento del número de linfocitos T CD4$^+$ activados es revertido a los niveles de sólo estimulación por SE cuando se añade un anticuerpo neutralizante para moléculas HLA-I, indicando que dichas moléculas HLA-I median este proceso.

## Conclusiones

En resumen, nuestros resultados muestran que la inhibición de CD274 induce un incremento significativo de la producción de IL-17A por parte de los linfocitos T CLA$^+$, así como un aumento del número y activación de los linfocitos T CD4$^+$ CLA$^+$ en nuestro modelo del cocultivo, todo ello dependiente de las moléculas HLA de clase I. Son la primera evidencia de la relación entre la inhibición de PD1-L1 y la respuesta IL-17A en un modelo de psoriasis humano *ex vivo*. Estos hallazgos contribuirán a esclarecer las causas de la psoriasis inducida por las nuevas terapias anti-PD1, la cual podría estar causada por la proliferación y activación mediada por moléculas HLA-I de linfocitos T que producirían una respuesta inmune exacerbada, principalmente Th17.

***FUNDING***

*The study was funded by FIS/ISCIII 2013 (Ministerio de Economía y Competitividad e Instituto de Salud Carlos III; PI09/2222, PI13/01845 and PI13/01716), and FIS/ISCIII 2016 (PI16/01573, and PI016/99532). This work was supported by European Regional Development Fund grants. E. R. R was granted by a PhD fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte of the Spanish Government (FPU13/02308).*