

PUCRS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA
DOUTORADO EM MEDICINA/PEDIATRIA

RODRIGO BENEDETTI GASSEN

**INFLUÊNCIA DO EIXO INIBITÓRIO PD-1/PD-L1 EM DIFERENTES ASPECTOS
DA RESPOSTA IMUNE ANTI-TUMORAL E ANTI-VIRAL**

Porto Alegre
2018

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

RODRIGO BENEDETTI GASSEN

**INFLUÊNCIA DO EIXO INIBITÓRIO PD-1/PD-L1 EM DIFERENTES ASPECTOS
DA RESPOSTA IMUNE ANTI-TUMORAL E ANTI-VIRAL**

Tese apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-
Graduação em Pediatria e Saúde da Criança da
Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade
Católica do Rio Grande do Sul

Orientação:

Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Duarte de Souza

Prof^ª. Dr^ª. Cristina Beatriz C. Bonorino

Porto Alegre

2018

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA
DOUTORADO EM MEDICINA/PEDIATRIA

RODRIGO BENEDETTI GASSEN

**INFLUÊNCIA DO EIXO INIBITÓRIO PD-1/PD-L1 EM DIFERENTES ASPECTOS
DA RESPOSTA IMUNE ANTI-TUMORAL E ANTI-VIRAL**

Tese apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-
Graduação em Pediatria e Saúde da Criança da
Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade
Católica do Rio Grande do Sul

Aprovada em: _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Daniel Mansur – UFSC-SC

Prof. Dra. Florência Barbé-Tuana – PUCRS -RS

Prof. Dr. Leonardo Pinto – PUCRS-RS

Porto Alegre
2018

Ficha Catalográfica

B462i Benedetti Gassen, Rodrigo

Influência do eixo inibitório PD-1/PD-L1 em diferentes aspectos da resposta imune anti-tumoral e anti-viral / Rodrigo Benedetti Gassen . – 2019.
130.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Duarte de Souza.

Co-orientadora: Profa. Dra. Cristina Bonorino.

1. Imunologia anti-tumoral. 2. Imunologia anti-viral. 3. Células Dendríticas. 4. Células T foliculares auxiliares. 5. PD-1/PD-L1. I. Duarte de Souza, Ana Paula. II. Bonorino, Cristina. III. Título.

*“Pode-se encontrar a felicidade mesmo nas horas mais sombrias, se a pessoa se lembrar
de acender a luz”.*

Alvo P. W. B. Dumbledore

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a força maior que rege a natureza e todos os destinos da terra, por me propiciar o desejo do conhecimento e me fazer trilhar os caminhos da academia.

Agradeço a meus professores do ensino médio e fundamental, por serem meus primeiros mentores. Eles viram meus primeiros passos no ramo da educação, e através deles estendo meus agradecimentos aos colégios Castelo Branco e Dom Hermeto da cidade de Três de Maio no Rio Grande do Sul.

Agradeço à escolha do meu curso de graduação. Ter me formado bacharel em farmácia me trouxe até aqui, e abriu meus horizontes em relação à área de pesquisa que estou trilhando.

Agradeço ao professor Luiz Rodrigues, pelo incentivo em entrar na pós-graduação da PUCRS, e pela amizade e coleguismo.

Agradeço a todos os meus amigos que estiveram ao meu lado nessa caminhada, me descontraindo, me auxiliando e dando dicas. A meus colegas de laboratório que se tornaram grandes amigos, presentes nos momentos bons de descobertas e nos momentos ruins, quando algum experimento não saía como esperado, e isso é o que mais acontece.

Não poderia esquecer-se de agradecer a paciência, pois é uma qualidade essencial para um pesquisador, sem ela nenhum conseguiria chegar lá.

Às minhas queridas orientadoras Ana Paula Duarte e Cristina Bonorino, pelo auxílio imediato a qualquer momento de dúvida, por sempre estarem presentes para reuniões e esclarecimentos. Espero que no futuro eu seja um pouco parecido com elas.

Por último, e mais importante, quero agradecer a minha mãe Marlene Inês Benedetti que é minha maior fã. Eu mostro pra ela todos os resultados dos meus experimentos, mesmo sabendo que nada será compreendido, devido à mesma nunca ter estudado o mundo da imunologia como eu. Contudo, ela me olha com um sorriso enorme no rosto e me elogia sempre que pode para todos seus amigos, me deixando um pouco envergonhado por fora, mas com um orgulho enorme por fazê-la feliz. Amo-te do fundo do meu coração mãe.

RESUMO

Para manter a homeostase após a ativação imunológica e a formação da memória, algumas células entram em morte programada ou são desativadas pela expressão de moléculas inibitórias. O eixo PD-1/PD-L1 é uma importante via inibitória envolvida na regulação das respostas de células T mantendo a homeostase e prevenindo autoimunidade. O aumento da expressão dessa via é uma estratégia usada por tumores e até mesmo alguns vírus para escapar da resposta imune e deste modo tem sido amplamente investigada como alvo de imunoterapias. Nesta tese avaliamos diferentes aspectos da via PD1/PD-L1 utilizamos modelos murinos de tumores e vírus. Utilizamos dois modelos tumorais, melanoma e câncer de pulmão, para investigar se após o tratamento com o anticorpo anti-PD-1 poderia ocorrer ativação precoce de subpopulações de células dendríticas (DCs) e células T, e se isso poderia ser observado no tumor, sangue ou linfonodos drenantes, correlacionando com a inibição do crescimento do tumor. Os resultados indicam que o tratamento com anti-PD-1 pode afetar não apenas células T, mas também subpopulações de DCs. Isso pode ser observado no sangue, fornecendo informações relevantes para prever respostas precoces a esse imunoterapêutico. Além disso, hipotetizamos que por aumentar a expressão de PD-L1, o Vírus Respiratório Sincicial (VSR) modula as células T CD4 foliculares (TFH) negativamente e, assim, diminui a afinidade dos anticorpos anti-VSR. Nesse segundo modelo, o bloqueio de PD-L1 levou ao aumento da expressão de IL-21, ativando a resposta imune humoral e controlando a infecção pelo VSR. Em suma, a tese enfatiza a importância do eixo PD-1/PD-L1 como uma via comum de inibição de respostas imunes tanto em infecções virais quanto no crescimento tumoral.

Palavras-chave: Tumor; Vírus sincicial respiratório; PD-1/ PD-L1; células dendríticas; células T CD4 foliculares; imunoterapia, IL-21.

ABSTRACT

To maintain homeostasis after activation and memory formation, some immune cells either die or are deactivated by the expression of various molecules. The PD-1 / PD-L1 axis is an important inhibitory pathway involved in regulating immune responses. Increased expression of these inhibitory molecules is a strategy used by tumors and even some viruses to evade the immune response. In the first part of the study, used a melanoma model to investigate whether, upon treatment with anti-PD1 antibody, an early activation of dendritic cell subpopulations (DCs) and T cells could be observed in blood or draining lymph nodes (DLN) and correlate with inhibition of tumor growth. In the second part of the study, we hypothesized that Respiratory Syncytial Virus (VSR) modulates follicular CD4 + T cells (TFH) and thus decreases the affinity of the responding antibodies by increasing PD-L1 expression. In the tumor model, the results indicate that treatment with anti-PD-1 can affect not only T cells, but also subpopulations of DCs. This can be observed in the blood, providing relevant information to predict early responses to this immunotherapeutic. In the case of the viral model, PD-L1 blockade led to increased IL-21 expression, activating the entire humoral immune response and controlling VSR infection. Our results stress the importance of the PD-1 / PD-L1 signaling axis as a common pathway activated by inhibition of immune responses in both infection and tumor growth.

Keywords: tumor; Respiratory Syncytial Virus; PD-1/PD-L1; dendritic cells; T follicular helper cells; immunotherapy; IL-21.

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	<i>Antigen-presenting cell</i> ; Célula apresentadora de antígenos
Treg	<i>Regulatory T cell</i> ; Células T regulatórias
VSR	Vírus Sincicial Respiratório
B cell	Célula B
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i> ; Grupo de diferenciação 4
CD8	<i>Cluster of Differentiation 8</i> ; Grupo de Diferenciação 8
Foxp3	<i>Factor forkhead Box P3</i>
IFN-γ	<i>Interferon gamma</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> ; Ácido ribonucleico
G	<i>Attachment glycoprotein</i> ; glicoproteína de ligação
F	<i>Fusion glycoprotein</i> ; glicoproteína de fusão
SH	<i>Small hydrophobic protein</i> ; pequena proteína hidrofóbica
M	<i>Matrix protein</i> ; proteína de matriz
N	<i>nucleoprotein</i> ; nucleoproteína
P	<i>phosphoprotein</i> ; fosfoproteína
TH2	<i>Type 2 T helper</i> ; Célula T helper 2
IL-4	<i>Interleukin-4</i> ; Interleucina 4
IL-5	<i>Interleukin-5</i> ; Interleucina 5
IL-10	<i>Interleukin-10</i> ; Interleucina 10
IL-21	<i>Interleukin-21</i> ; Interleucina 21
TH1	<i>Type 1 T helper</i> ; Células T helper 1
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> ; Complexo principal de histocompatibilidade
CTLs	<i>Cytotoxic T lymphocytes</i> ; Linfócitos T citotóxicos
pAKT	<i>Phosphorylated Akt/ Protein kinase B</i>
pERK1/2	<i>Phosphorylated ERK 1 and 2</i>
P38	<i>Phosphorylated p38 MAPKinase</i>
OVA	Ovalbumina
FDC	<i>Follicular dendritic cell</i> ; Células dendrítica folicular
CD44	<i>Cluster of differentiation 44</i> ; Grupo de diferenciação 44
CD62L	<i>Cluster of differentiation 62L</i> ; Grupo de diferenciação 62L
TCR	<i>T cell receptor</i> ; Receptor da célula T
TFH	<i>Follicular helper T cell</i> ; Célula T folicular auxiliar
TFR	<i>Follicular regulatory T cell</i> ; Célula T folicular regulatória
CD86	<i>Cluster of differentiation 86</i> ; Grupo de diferenciação 86
GC	<i>Germinal center</i> ; Centro Germinativo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1	Resposta imunológica.....	11
1.2	Imunoterapia: pontos de verificação imunológicos (<i>immune checkpoints</i>).....	12
2	Características dos Tumores	10
2.1	Fatores necessários para o estabelecimento de um tumor	10
2.2	Resposta Imune antitumoral.....	13
2.3	Células dendríticas e seu papel na imunidade antitumoral.....	15
2.4	Imunoterapia oncológica	33
3	HIPÓTESE	28
4	OBJETIVOS	28
4.1.	Objetivo geral	28
4.2.	Objetivos específicos.....	28
5	Vírus Sincicial Respiratório (VSR)	30
5.1	A infecção por VSR e a resposta imunológica.....	32
5.2	Reação do Centro Germinativo	33
6	HIPÓTESE	36
7	OBJETIVOS	36
7.1.	Objetivo geral	36
7.2.	Objetivos específicos.....	28
	Considerações finais	38
	REFERÊNCIAS	38
	ANEXO 1	00
	ANEXO 2	00
	ANEXO 3	00
	ANEXO 4	00

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Resposta imunológica

A resposta imune pode ser dividida entre resposta inata e resposta adaptativa. O sistema imune inato é composto de células de origem hematopoiética ou embrionária. Os precursores hematopoiéticos podem ser de dois tipos básicos, mielóides ou linfóides. Com a refinação dos métodos de análise de subpopulações celulares, os precursores embrionários foram descritos para células entre características linfóides ou mielóides (1,2). As células de origem mielóide estão principalmente envolvidas em mecanismos da imunidade inata, assim como as de origem linfóide coordenam as respostas adaptativas. Contudo, os mecanismos inatos e adaptativos normalmente se sobrepõem durante uma resposta imune.

Células dendríticas (DCs) possuem um papel chave na interface com o sistema imune adaptativo interagindo amplamente com células T na apresentação de antígenos e na indução da resposta de memória, e assim aumentando o potencial de resposta secundária por estas células (3–5). As DCs são consideradas células especializadas e as principais células apresentadoras de antígenos (APCs), pois são responsáveis pelo processamento e apresentação de antígenos conjugados ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (5). Além disso, secretam citocinas que fornecem sinais co-estimuladores responsáveis por induzir a diferenciação das células T nos seus subtipos efetores (6,7).

Para que ocorra a ativação da resposta imune adaptativa, é necessário o envolvimento de três sinais que ocorrem de maneira específica e coordenada (8,9). O primeiro sinal ocorre quando APCs encontram nos linfonodos a célula T que possui o receptor de célula T (TCR) específico capaz de reconhecer o antígeno complexado ao MHC da APC. Esse sinal é fornecido a diferentes células T que possuem ou não TCR específico para o antígeno em questão. Porém podem existir várias células T capazes de reconhecer o mesmo antígeno, que geralmente possuem afinidades diferentes, dependendo da sequência gênica que os codifica o TCR. O segundo sinal, necessário para expansão de células antígeno específica, é gerado pela ligação de moléculas de adesão e co-estimuladores presentes na APC, como por exemplo, B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), com a molécula CD28 na superfície da célula T (10). Esse segundo sinal aumenta a interação entre a APC e a célula T e fornece sinais intracelulares de ativação. Na ausência do segundo sinal linfócitos antígeno específicos não respondem de maneira eficiente

e são funcionalmente inativados, ou tornam-se anérgicos e acabam resistentes a uma ativação subsequente pelo antígeno (11). Como terceiro sinal, ocorre a secreção de citocinas pela APC, que induzem a diferenciação de linfócitos antígeno-específicos ativados em subtipos de células T efetoras. Também ocorre durante essa sinalização, a secreção de IL-2 pelos linfócitos T ativados que garante a expansão clonal dessas células, a progressão do ciclo celular e indução da produção de outras citocinas (10). Assim, é gerado um ambiente de citocinas característico pela APC, que é capaz de influenciar no direcionamento da resposta imune (12–14).

1.2 Pontos de verificação imunológicos (*immune checkpoints*)

A resposta imune, tanto para antígenos próprios quanto para antígenos não próprios, requer a atuação específica e balanceada das células do sistema imune na eliminação de patógenos e tumores e no controle da tolerância. A indução e manutenção de tolerância dependem de um conjunto de rotas inibitórias, modulando a duração e amplitude das respostas imunes e fisiológicas, visando a preservação da estrutura dos tecidos (15). A interação de APCs com células T virgens (que ainda não encontraram seu antígeno) não leva somente a um programa de ativação de resposta de células T, mas também pode bloquear essa resposta. Dentro deste ponto se destacam o controle do segundo sinal, principalmente regulados pelas moléculas co-estimulatórias e co-inibitórias. Atualmente devido ao advento da imunoterapia recebem grande atenção as moléculas CTLA-4 e PD-1.

Células T regulatórias (T regs), são responsáveis pelo controle de respostas exacerbadas, e podem desativar outras respostas de células T, pois constitutivamente expressam o antígeno associado a linfócito T 4 (CTLA-4) (16,17). CTLA-4 é uma molécula inibitória expressa nas células T que se liga com maior afinidade a B7 que seu receptor estimulatório CD28. O microambiente tumoral recruta um grande número de células T regs fazendo com que a resposta imune antitumoral seja diminuída. Allison e colaboradores reportaram em 1996 que a administração do anticorpo específico para anti-CTLA-4 resultou na resposta contra os tumores, inclusive em tumores já estabelecidos (18). Estudos mais recentes demonstram que a administração *in vivo* de anticorpo anti-CTLA-4 bloqueia a sinalização de CTLA-4 em células T regs CTLA-4+, e em contrapartida promove imunidade tumoral (19). Porém, em pacientes com estágio avançado de melanoma (grau IV) ou câncer de células renais a administração do anticorpo não inibe a atividade supressiva de células T regs *in vitro* e *in vivo* (20). Quezada e

colaboradores também demonstraram que a atividade antitumoral de CTLA-4 foi associada a um aumento da taxa de células T CD4 e T CD8 efetoras (21). Adicionalmente, estudos mostram que não ocorre diminuição no número de células T regs circulantes e também a expressão de mRNA de Foxp3 nessas células pós tratamento com CTLA-4 não é alterada (22). Um dos pontos críticos de bloqueio é a interação com a molécula CTLA-4, um homólogo de CD28 que também liga a B7-1 e B7-2, porém com mais afinidade que CD28 (3). A expressão do gene *ctla-4* é iniciada com a ativação de células T, que é direcionada e se acumula na sinapse imunológica, eventualmente atenuando ou prevenindo a co-estimulação de CD28 e competindo pela ligação em B7, sinalizando negativamente (23,24). Desta forma, na resposta antitumoral de células T pode ser acompanhada da sinalização via CTLA-4 que fornece uma série de sinais inibitórios e inibe função e proliferação da resposta.

Outro importante ponto de verificação imunológico é a interação de PD-1/PD-L1. As células T requerem a interação da molécula PD-1 com seu ligante PD-L1, que pode ser expresso tanto em células hematopoiética como não-hematopoiéticas, para limitar a resposta de células T efectoras e proteger tecidos de danos mediados pela exacerbação resposta imune. Entretanto essa sinalização PD-1/PD-L1 também pode ser modulada por vírus e tumores para atenuar a imunidade facilitando a sobrevivência de tumores e infecções crônicas. PD-1 é uma proteína transmembrana tipo I formada por 288 aminoácidos (aa) composta por um domínio da superfamília de imunoglobulina (Ig) (cerca de 20 aa), um domínio transmembrana, e um domínio intracelular com cerca de 95 resíduos contendo um motivo imunoreceptor inibitório baseado em tirosina (ITIM) bem como de um motivo imunoreceptor de troca baseado em tirosina (ITSM). PD-L1 é uma proteína de 290 aa contendo um domínio *IgV like* e *IgC like*, um domínio transmembrana e um domínio intracelular curto (cerca de 30 aa), porém altamente conservado (25,26).

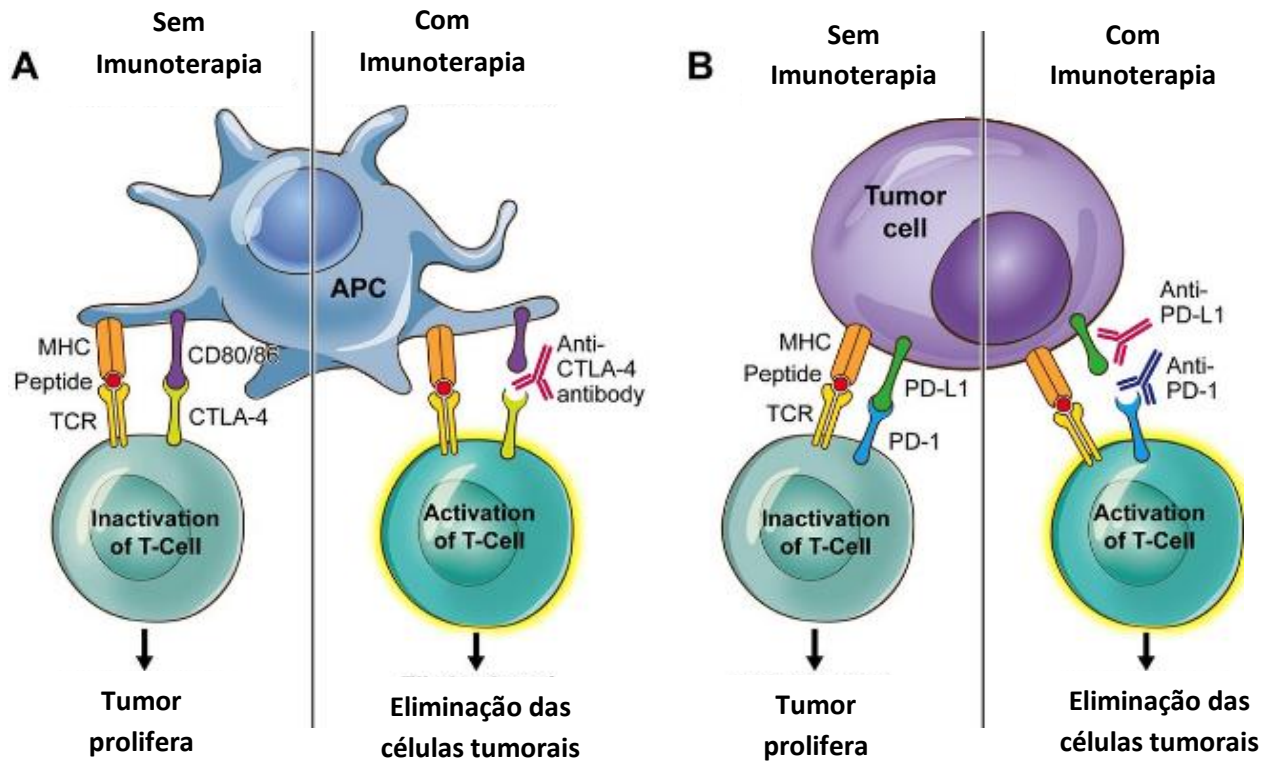
PD-1 e seus ligantes PD-L1 e PD-L2, direcionam sinais inibitórios que regulam o balanço entre ativação de células T, tolerância e imunopatologia (25). PD-1 pode ser expresso em células T, células B, células NK, monócitos ativados e células dendríticas. Em células T, PD-1 é expresso depois da ativação (27). Células dendríticas mielóides (CD11c+) e monócitos humanos expressam PD-1 de maneira induzível, porém sua função nestas células ainda não é clara.

Os dois ligantes de PD-1 diferem no seu padrão de expressão. Em camundongos PD-L1 é constitutivamente expresso em células T e B, DCs, macrófagos, células tronco mesenquimais e mastócitos derivados de medula óssea (28). Ambos, interferons do tipo I e II aumentam a expressão de PD-L1 (29,30). Análises no promotor humanos de PD-L1 demonstram que ambas,

expressão constitutiva e induzida, são dependentes de dois sítios de ligação de fator regulador de IFN-1 (IRF-1) (30). Diversos estudos vêm demonstrando rotas requeridas para ativação de PD-L1. Em linhagens celulares a expressão de PD-L1 diminui quando MyD88, TRAF6, MEK e JAK2 são inibidos (31,32). Já a perda ou inibição da fosfatase e homólogo de tensina (PTEN), uma fosfatase que modifica fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) e a sinalização via Akt, aumenta a expressão pos-transcricional de PD-L1 (31). Diferente de CD28 e CTLA-4, o acúmulo de PD-1 na sinapse imunológica é extensivo somente quando células T interagem com DCs expressando altos níveis de B7-DC (33).

A sinalização via PD-1 possui um efeito maior na produção de citocinas quando comparado a proliferação celular, com efeitos significantes na redução da produção de IFN- γ , TNF- α e IL-2. Os sinais inibitórios de PD-1 dependem da intensidade do sinal do TCR, uma maior inibição é resultante de baixos níveis de estimulação do TCR. Esta redução pode ser superada através da co-estimulação por CD28 e IL-2 (25,34). PD-1 pode exercer seu efeito na diferenciação celular e sobrevivência diretamente, inibindo ativação de eventos que são positivamente regulados por CD28 ou indiretamente por IL-2. Ambos CD28 e IL-2 promovem expansão celular e sobrevivência através de efeitos anti-apoptóticos, no ciclo celular e secreção de citocinas (25). Também, há uma forte evidência que a ligação de PD-1 inibe a indução do fator de sobrevivência celular Bcl-*xL* (35). Outra questão importante é o fato de PD-1 inibir a expressão de fatores de transcrição como GATA-3, T-bet e Eomes, o que impede a diferenciação de células T (36).

Ao encontrar seu ligante, PD-1 é fosforilado em suas duas tirosinas intracelulares e então liga a fosfatases que diminuem a sinalização do TCR via desfosforilação da sinalização de intermediários (25). A ligação de PD-1 inibe a atividade de PI3K e consequentemente de Akt. Em contraste CTLA-4 inibe a ativação de Akt, mas não afeta a atividade de PI3k, indicando que esses receptores inibitórios funcionam com mecanismos distintos um do outro (37). Um estudo em células T CD8+ demonstrou efeitos sinérgicos entre as vias PD-1 e CTLA-4, mostrando que ao inibir a via PD-1 houve uma reversão do fenótipo de tolerância das células T CD8+, que foi aumentada ao inibir também a via CTLA-4 (38). Além disso, sinais inibitórios derivados da ligação de PD-L1 podem ser resultantes da interação dessa molécula com outras que não seja PD-1, como por exemplo, B7-1 das células T. Esse fator sugere que há uma sinalização negativa bidirecional entre células T e APCs (25).



Papel do CTLA-4 (A) e do PD-1 (B) na imunorregulação. O uso da imunoterapia com anticorpos monoclonais anti-CTLA-4, anti-PD-1 ou anti-PD-L1 é capaz de gerar ativação das células T e eliminação das células tumorais, sem o uso da imunoterapia as células tumorais proliferam descoordenadamente. Adaptado de Soularue *et al* (39).

A expressão de PD-1 também ocorre em células dendríticas do baço diante de vários estímulos inflamatórios e foi demonstrado que DCs PD-1 deficientes, possuem uma capacidade maior de responder à infecções por *Listeria monocytogenes* em camundongos (40). Esse estudo demonstra um papel importante da molécula PD-1 em DCs, nas respostas inatas. Além disso, células dendríticas expressam as moléculas PD-L1 e PD-L2 e o bloqueio de PD-L2 nas DCs resulta em uma maior proliferação de células T e produção de citocinas incluindo IFN- γ e IL-10, enquanto o bloqueio de PD-L1 teve efeitos similares, porém mais modestos. Ao mesmo tempo, o bloqueio de ambas demonstrou um efeito aditivo com um maior potencial de ativação de células T (41). Um estudo realizado em pacientes com hepatite B crônica demonstrou que células dendríticas mielóides do sangue desses pacientes apresentam níveis aumentados da expressão de PD-L1 que foi correlacionada a estados mais graves da doença e níveis aumentados do vírus no plasma desses pacientes. Esse estudo também demonstrou que ao bloquear PD-L1 nas DCs desses pacientes *in vitro*, foi aumentada a capacidade de estimulação de células T e também houve diminuição da produção de IL-10 e aumento de IL-12 (42).

Concluindo, a terapêutica eficiente dos anticorpos monoclonais como anti-PD1 e anti-PD-L1 não é exclusividade de pacientes com câncer. A indução de moléculas de exaustão também pode ocorrer em diversos casos de infecções crônicas, como tuberculose, HIV, Hepatite B, malária e Citomegalovírus, principalmente no caso de pacientes resistentes as terapias convencionais (43). Outro fator é que o desbloqueio imunológico permite que rotas estimulatórias sejam ativadas levando a melhora da eficácia de vacinas (3,19). Assim, as vias de bloqueio imunológico podem constituir hoje, um dos mais avançados pontos para elucidar os mecanismos que levam à falta de resposta imune em diversas doenças. O bloqueio - ou desbloqueio - dessas vias pode representar uma nova alternativa de tratamento para inúmeras desordens.

2 Características dos tumores

2.1 Fatores necessários para o estabelecimento de um tumor

Nas últimas décadas, muitas descobertas têm sido feitas acerca dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento do câncer (44). O processo oncogênico envolve mutações somáticas que resultam na ativação de genes que são normalmente envolvidos na regulação da divisão celular e morte celular programada, assim como na inativação de genes envolvidos na proteção contra danos ao DNA ou no direcionamento da apoptose (44,45)

Muitas capacidades biológicas são adquiridas pelos tumores durante suas múltiplas etapas de desenvolvimento. Entre essas habilidades o sustento da capacidade proliferativa, o escape dos supressores de tumor, a resistência à morte celular, a aquisição de imortalidade replicativa, a indução de angiogênese e capacidade de invadir e promover metástase, são considerados marcos importantes para que o tumor se estabeleça e progrida com sucesso. Entretanto, mais recentemente novos aspectos foram abordados como essenciais para a progressão da massa tumoral, como possuir uma instabilidade genômica, a inflamação local, a reprogramação das funções energéticas e a habilidade de escapar do sistema imunológico (44).

Recentemente, pesquisas começaram a apontar a ideia de que a inflamação existente no microambiente tumoral possui propriedades pró-tumorais, auxiliando as células neoplásicas a adquirirem certas habilidades, citadas acima. O ambiente inflamatório pode contribuir de várias maneiras para o crescimento tumoral, incluindo na produção de fatores de crescimento que

sustentam a capacidade proliferativa, fatores que limitam a morte celular, moléculas que auxiliam a modificação de matriz extracelular e conseqüentemente favorecem angiogênese, invasão e metástase (46–48). Outro fator importante é o estresse gerado no microambiente diante de sinalização inflamatória, como por exemplo, a produção de espécies reativas de oxigênio que são potencialmente mutagênicas o que favorece e acelera sua evolução genética (48).

De acordo com Vesely e colaboradores, o sistema imune possui três papéis primários na prevenção de tumores. Primeiramente na defesa contra vírus indutores de tumor, suprimindo infecções virais. Segundo, na eliminação de patógenos e na resolução do tumor impedindo a instalação de um ambiente inflamatório. Finalmente, o sistema imune pode reconhecer e eliminar diretamente células tumorais que passam a expressar antígenos diferenciados. Esse último processo é denominado imunovigilância, ou seja, o sistema imune reconhece as células modificadas e elimina antes que elas estabeleçam a malignidade (4). Diferentes populações de células imunes podem estar envolvidas no controle do crescimento tumoral (49). Assim, foi criado o conceito denominado “*Immunoediting*” (50) onde o envolvimento do sistema imune no câncer prossegue sequencialmente através de três fases distintas, a eliminação, o equilíbrio, e o escape (4,51).

Tumores expressam uma ampla variedade de antígenos, incluindo antígenos próprios (20). Entretanto alguns pesquisadores exploram a ideia de que os tumores não expressam os antígenos de maneira suficiente para o sistema imune reconhecer a presença tumoral (52), enquanto outros exploram a ideia de que o sistema imune pode ignorar ou ser tolerante ao desenvolvimento do tumor porque células tumorais apresentam uma ampla variedade de antígenos próprios (53). Também, alguns achados demonstram que uma ativação persistente do sistema imune, com produção de um microambiente pró-inflamatório pode facilitar a transformação celular e promover o crescimento de tumores (54,55).

O primeiro estudo a demonstrar o conceito de *immunoediting* foi realizado por Old e colaboradores (1964) (56). Nesse estudo camundongos foram imunizados com antígenos tumorais antes da indução dos tumor via compostos carcinógenos. Os camundongos imunizados ficaram protegidos do aparecimento do tumor. Posteriormente alguns estudos revelaram que esses antígenos são produtos de genes mutados, além de genes expressos de forma aberrante ou genes codificando proteínas virais (57). Desta forma, para identificação de antígenos de câncer humano é necessário que métodos de detecção *in vitro* sejam desenvolvidos, uma vez que nem sempre o estudo *in vivo* é possível.

A descoberta em 2001 que o sistema imune controla não somente a quantidade, mas também a qualidade (imunogenicidade) fez com que pesquisadores revisassem a hipótese de imunovigilância (50). Tumores formados em animais imunodeficientes quando transferidos para animais selvagens não apresentam crescimento (57). Isso demonstra a capacidade do sistema imune de modificar a imunogenicidade das células tumorais. Esses dados fornecem a idéia de que o sistema imune não somente protege contra a formação de tumores, mas também modifica a imunogenicidade do mesmo podendo até favorecer o seu desenvolvimento.

Na fase de eliminação o sistema imune inato e adaptativo atuam de maneira conjunta para detectar a presença tumoral e destruir o tumor antes que ele seja clinicamente aparente. Um dos mecanismos pelo qual o sistema imune pode reconhecer tumores em fases iniciais é pela secreção de IFN tipo I, capaz de ativar DCs que iniciam a resposta antitumoral (52). Além disso, padrões moleculares associados à danos devem ser considerados uma vez que são liberados por células tumorais que morrem (57,58).

Contudo, se alguma variante de células tumorais não é destruída na fase de eliminação, o tumor entra na fase de equilíbrio na qual o crescimento é controlado ou prevenido por alguns mecanismos imunes. Células T, IL-12 e IFN- γ são requeridos para manter as células tumorais em estado de dormência, enquanto células assassinas naturais (NK) e moléculas que participam do reconhecimento ou funções efetoras. A modificação da imunogenicidade do tumor ocorre na fase de equilíbrio (2,59).

Contudo, como uma consequência da pressão seletiva constante que o sistema imune exerce sobre células geneticamente instáveis, variantes de células tumorais podem surgir apresentando características distintas que levam à fase de escape. Uma das características é a capacidade de variação antigênica levando às células imunes a não reconhecer mais as células tumorais, a perda de sensibilidade aos mecanismos imunes efetores, e, a indução de um estado de imunossupressão no microambiente tumoral (50,57). Desta forma, o sistema imune torna-se insuficiente na maioria dos casos, para o combate do tumor levando a progressão da doença.

2.2. A resposta imune antitumoral

Durante a resposta imune antitumoral antígenos de células tumorais são reconhecidos por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, para iniciar uma resposta adaptativa efetora contra o tumor. Nesse contexto, células dendríticas assumem um papel crucial na captura, processamento e apresentação dos peptídeos tumorais às células T (4). No linfonodo células T específicas para os peptídeos apresentados pelas DCs são ativadas e se diferenciam em subtipos efetores. Essas

células migram para o tumor, onde produzem mediadores solúveis capazes, ou não, de combater as células tumorais (60).

O microambiente tumoral inclui uma complexa rede de subpopulações imunes, incluindo células T. Estudos vêm avaliando o impacto clínico desses infiltrados quanto a sobrevida dos pacientes e resposta aos tratamentos. Em pacientes com câncer colorretal foi demonstrado que infiltrados do tipo Th17 apresentam um prognóstico ruim, enquanto pacientes com infiltrado tipo Th1 apresentam bom prognóstico e sobrevida livre de doença (61). Ainda em câncer colorretal ocorre um aumento significativo de células Th17 já nos estágios iniciais da doença, entretanto em estágios mais avançados as células T regs tendem a continuar aumentando, enquanto Th17 diminui (62). Uma vez que as células T regs exercem um papel imunossupressor, a progressão do câncer colorretal pode estar relacionada à atividade supressora dessas células. Recentemente foi reportado em modelo murino de carcinoma, a IL-17 exerce um papel importante na redução do crescimento tumoral e metástase. Nesse estudo também se observou que células Th17 polarizadas com TGF- β e IL-6 também foram capazes de reduzir o crescimento tumoral (63). Outro achado importante foi que em modelo de melanoma murino células Th17 promoveram o aumento da ativação de células T CD8+ específicas, além do recrutamento de DCs no infiltrado tumoral e no linfonodo drenante houve um aumento de DCs CD8 α + contendo material tumoral (64). Ainda não está claro se o mesmo fenótipo de células T CD4+ pode atuar de maneira distinta em diferentes tipos de tumores, entretanto estudos utilizando carcinógenos demonstraram que ao depletar células T CD4+ e CD8+, assim como ao depletar as citocinas INF- γ e IL-12, células tumorais dormentes (fase de equilíbrio) expandem. Ao mesmo tempo ao bloquear células NK o mesmo efeito não foi observado o que comprova a atuação da imunidade adaptativa na fase de equilíbrio (65)

São diversos os mecanismos pelos quais as células tumorais evadem a resposta imune, por exemplo, através da inibição da expressão de CCR7 na superfície de DCs, importante molécula que promove sua migração para os linfonodos (66), assim como a expressão de receptores que induzem uma excessiva captação de lipídios pelas DCs prejudicando sua capacidade de estimulação de células T (67). Outros fatores também vêm sendo descritos como inibitórios para a resposta tumoral, como por exemplo, em melanoma a secreção de TGF- β , IL-10, além da expressão da molécula PD-L1 e da enzima indolamina 2,3-dioxigenase (IDO), moléculas co-inibitórias que auxiliam o tumor no escape da resposta à células T (68–70). Em melanoma há um aumento de células T regulatórias, e a resposta de células T CD8+ geralmente é fraca e localizada (71,72). Um estudo realizado em pacientes com melanoma observou que há um aumento de citocinas plasmáticas TH2 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) além de altos níveis

de expressão de VEGF nos melanócitos consistente com a formação de metástases (73). Finalmente, conforme mencionado anteriormente, um ambiente crônico de inflamação pode favorecer o aparecimento de tumores através de um ambiente de estresse, moléculas que estimulam a mitose, angiogênese e invasão tecidual (4,44).

Em tumores como melanoma a taxa de células T regs e T CD8+ infiltrantes no tumor pode ser utilizada como fator prognóstico, sendo que um grande infiltrado de T regs pode significar um microambiente de imunossupressão e conseqüente evasão do tumor ao sistema imune (74). Ocorre também uma redução de moléculas co-estimuladoras em DCs nos linfonodos drenantes, o que pode representar uma tolerância do sistema imune frente a antígenos tumorais (75,76). Evidências demonstram que a imunossupressão mediada por células T regulatórias é um dos mecanismos cruciais de evasão e o principal obstáculo para o sucesso de imunoterapias tumorais. Muitos mecanismos supressores envolvidos na evasão da resposta antitumoral vem sendo utilizados como alvos de tratamentos pré-clínicos e clínicos, como por exemplo a produção de TGF β , aumento de células T regs Foxp3+ e metabólitos de triptofano (IDO) (3).

Devido aos fatores que inibem as repostas antitumorais, terapias contra o câncer constituem um desafio importante para a obtenção de abordagens preventivas e de cura. Alguns estudos demonstraram que ao utilizar peptídeos modificados, derivados de antígenos próprios do câncer de mama e ovário, aumentam a imunização *in vivo* (77). Células de melanoma resistentes à tratamentos quimioterápicos (CD133+), foram irradiadas e utilizadas como vacina, demonstrando uma potente atividade antitumoral, com uma resposta específica de células Th17 e Th1, mas não Th2 contra a linhagem parental do melanoma (78). Esses achados comprovam que células T CD4+ específicas possuem propriedades antitumorais capazes de mediar a regressão do tumor. Ainda, células T reg diminuíram significativamente diante do tratamento demonstrando que o estado de tolerância observado frequentemente em tumores foi diminuído.

Não são claros os mecanismos que governam a diferenciação das células T CD4+ antitumorais e se esse fenótipo é governado pela sinalização do TCR. No entanto, terapias utilizando células T específicas para peptídeos tumorais vêm demonstrando resultados promissores na redução no tumor (79,80). Em modelo de melanoma células T CD4+ foram capazes de erradicar o tumor já estabelecido após a transferência destas células, e, quando associado ao bloqueio de CTLA-4 resultou em grande expansão de células T efetoras e diminuição de T regs (81). Assim, torna-se importante elucidar os mecanismos de modulação desses fenótipos em diferentes tipos de tumores, possibilitando assim um melhor, ou pior

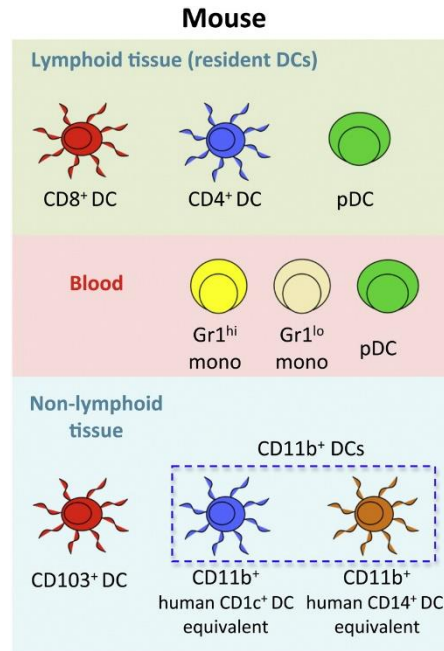
prognóstico, e buscando tratamentos adequados para ativar as células efetoras do infiltrado imune.

2.3 Células dendríticas e seu papel na imunidade antitumoral

Todas as células nucleadas são capazes de apresentar antígenos através de MHC I, todavia apenas três populações celulares são capazes de apresentar antígenos em MHC II (Macrófagos, Células B e Células dendríticas) (82). Células nucleadas apresentam antígenos via MHC de classe I, quando infectadas por patógenos ou mesmo diante de modificações proteicas derivadas de alterações neoplásicas. A partir disso, células TCD8+ citotóxicas são eficientes em reconhecer o complexo peptídeo:MHC I e induzir uma resposta de morte a célula alvo. Contudo, a resposta citotóxica é mais eficiente na presença de células auxiliares, como as células TCD4+ (83).

Em 1973, ao encontrar células com morfologia distinta em meio a cultura de células do baço, o pesquisador Ralph Steinman descobriu as células dendríticas (84). Posteriormente foi observada alta expressão de MHC de classe II e capacidade diferenciada na ativação de células imunes, ficando conhecidas como células apresentadoras de antígenos (APC) (85). Células apresentadoras de antígeno possuem uma propriedade única de induzir resposta imune específica a um antígeno. DCs correspondem ao principal elo entre imunidade inata e adaptativa, uma vez que essas células são capazes de capturar, processar e apresentar antígenos tanto por via MHC de classe I quanto via MHC de classe II. Após a captura e processamento de antígenos, as DCs ativadas aumentam a expressão de moléculas co-estimulatórias, aumentando a força de ligação com as células T e favorecendo a sinapse imunológica. DCs estão presentes em uma grande gama de tecidos e possuem capacidade migratória. De acordo com as citocinas presentes no microambiente e nos fatores transcricionais ativados, as DCs podem se diferenciar em diferentes subpopulações e as mesmas podem estar em diferentes tecidos do organismo (86). Quando maduras, as DCs (murinas) expressam o marcador CD11c, altos níveis de MHC de classe II e também CD80, CD86 e CD40 (9). A classificação das DCs leva em consideração sua origem, moléculas de expressão e localização podendo ser classificadas em dois grandes grupos, plasmocitóides (pDCs) ou DCs mielóides ou DCs clássicas (mDCs ou cDCs) (87). Além disso, dentro dessa classificação em pDCs e mDCs, as DCs podem ser divididas em pelo menos cinco grupos baseados no seu fenótipo, função e desenvolvimento (88). Basicamente os grupos de DCs incluem DCs plasmocitóides, DCs migratórias e residentes em órgãos linfóides CD8+, DCs migratórias e residentes em órgãos

linfóides CD11b+, Células de Langerhans e DCs derivadas de monócitos (vide figura a baixo) (89).



Fenótipo e localização das subpopulações de DCs. As DCs são classificadas de acordo com a expressão de moléculas de superfície e localização nos tecidos. Adaptado de Haniffa *et al*, 2012.(90)

Células dendríticas convencionais são tipos especializados no processamento e apresentação de antígenos. Elas podem ser agrupadas em duas maiores classes baseado na sua localização nos tecidos e em sua capacidade migratória pelo organismo. A primeira categoria de DCs convencionais geralmente se refere às DCs migratórias que se desenvolvem de precursores nos tecidos periféricos onde funcionam como sentinelas apresentadoras de antígenos. Dos tecidos periféricos essas DCs migram para os linfonodos regionais via vasos linfáticos aferentes, um processo que é acelerado em resposta à sinais de perigo, como por exemplo em infecções por patógenos ou morte celular. DCs migratórias não são encontradas no baço, sendo restritas aos linfonodos, onde elas constituem uma proporção variável de DCs em *steady state* (8,87,89). As DCs migratórias podem ser divididas em CD11b⁺ (também denominada dermais ou intersticiais) e CD11b⁻, as quais mais recentemente foram denominadas como CD103⁺ (87,91). A segunda maior categoria de DCs convencionais são as DCs residentes de tecidos linfóides que são encontradas em sua maior parte em órgãos como linfonodos, baço e timo. Essas DCs podem ser classificadas de acordo com a expressão das suas

moléculas de superfície CD4 e CD8 sendo, DCs CD4+, DCs CD8 α + e DCs CD4-CD8 α - (9,88,92).

Células dendríticas CD8 α + possuem ampla capacidade de apresentação cruzada de antígenos, ou seja, apresentação via MHC de classe I, além de estimular respostas Th1 e ativar células T CD8 α + citotóxicas (9,88,91,93,94). Em determinadas situações, células dendríticas CD4+ e CD4-CD8 α - também podem apresentar antígenos via MHC de classe I (95), porém sua eficiência parece ser maior na apresentação de antígenos via MHC de classe II às células T CD4+ (96–98). No baço, as DCs CD8 α + são concentradas nas zonas de células T enquanto as CD4+ são encontradas em sua maioria nas zonas marginais desse órgão, porém em condições estimulatórias, as DCs CD4+ migram para as zonas de células T (9,99,100). As DCs CD4-CD8 α - são encontradas em níveis moderados nos linfonodo, porém são o subtipo dominante do timo sendo fenotipicamente caracterizadas por expressar CD205 na sua superfície ao mesmo tempo em que não expressam CD11b. No linfonodos as DCs CD4-CD8 α - se caracterizam por expressar CD11b e também expressam CD205 (9).

Células dendríticas residentes de tecidos linfóides não circulam em outros tecidos e são derivadas de precursores do próprio tecido linfóide (101). Na ausência de sinais de perigo, as células dendríticas são caracterizadas por se apresentar em um estado imaturo, caracterizado por alta capacidade endocítica e baixa expressão de MHC de classe II, e sua presença em órgãos linfóides apresentam-se como uma característica estratégica para o processamento de patógenos presentes no sangue (102).

Células de Langherans são residentes da pele e, assim como as DCs migratórias, migram para o linfonodo para apresentação de antígenos (89). Entretanto, diferente das DCs convencionais (que são derivadas de células precursoras de medula óssea), células de Langherans são derivadas de populações locais de precursores mielomonocíticos LY6C+ da pele. Essas células desempenham papéis importantes na apresentação de antígenos derivados de patógenos na pele, uma vez que elas estão estrategicamente posicionadas na epiderme e são capazes de projetar seus dendritos nas junções intercelulares da epiderme, um tecido mais estratificado e de difícil acesso. Ademais, também se sabe que elas desempenham um papel na tolerância tanto apresentando antígenos próprios e deletando populações de células T auto-reativas, quanto na indução direta de células T regs (103–105). As células de Langherans são caracterizadas por expressar o marcador Langerina, CD11b, CD205 e baixos níveis de CD8 α . Além disso, sua alta capacidade de responder a estímulos leva a altos níveis de expressão das moléculas CD40, CD80 e CD86, assim como, moléculas de MHC de classe II (9,88).

As DCs plasmocitóides estão amplamente distribuídas pelo organismo. São caracterizadas pela sua rápida habilidade de produzir altos níveis de interferons do tipo I, uma citocina presente em inúmeros tipos de respostas, principalmente diante de infecções virais (88,106). Essas células encontram-se tipicamente circulando no sangue e em condições não-inflamatórias são ausentes na pele, sendo recrutadas para esse sítio diante de infecções ou outros acometimentos (88).

Em condições inflamatórias, monócitos circulantes do sangue podem rapidamente ser mobilizados e se diferenciar em células que possuem propriedades de células dendríticas (107). Essas células possuem uma ampla capacidade de apresentação de antígeno, incluindo habilidade de apresentação de antígeno cruzada (108). Além disso, possuem funções antimicrobianas nos sítios inflamatórios, produzindo TNF (109).

As células dendríticas são encontradas também no infiltrado tumoral como em câncer de mama, pulmão, renal, neuronal, bexiga, ovário e gástrico (110). Entretanto, devido à sua complexidade de fenótipos e funções as DCs do infiltrado tumoral são dubiamente descritas tanto associadas a um bom quanto mau diagnóstico. Por exemplo, em pacientes com carcinoma colorretal com altos níveis de células dendríticas infiltrantes (TIDCs – *tumor infiltrating DCs*) exibiram pequena sobrevida livre de doença que demonstrou-se aumentada quando as TIDCs estão em níveis menores (111). Contudo muitas vezes a regressão do tumor está relacionada ao fenótipo dessas células e não propriamente ao seu número. Alguns estudos também demonstram que o tipo, fenótipo e quantidade de TIDCs são dinâmicos com o passar do tempo, e a progressão da doença podendo influenciar fortemente a progressão tumoral em diferentes estágios de crescimento (112).

Em um modelo murino de câncer de ovário foi demonstrado que o número de TIDCs aumenta com a progressão do tumor. Contudo, TIDCs aumentam progressivamente a expressão de moléculas imunossupressoras e essa modificação é associada a diminuição do infiltrado de células T (113). Um estudo similar observou que durante a progressão tumoral existe um aumento da densidade do infiltrado de DCs, macrófagos, células supressoras derivadas de linhagem mielóide (MDSCs - *myeloid-derived suppressor cells*) e células T (114). Um ponto importante desse trabalho foi a observação de que o crescimento e agressividade do tumor correlacionam com um a troca de DCs que expressam moléculas estimulatórias por DCs que expressam moléculas imunossupressoras. Ao mesmo tempo, a depleção das DCs num estágio inicial levou a um aumento do volume tumoral e agressividade, enquanto a depleção dessas células em um estágio tardio levou à uma interrupção do crescimento, sugerindo que tumores eventualmente desenvolvem estratégias para prevenir a atividade antitumoral de DCs (114).

Entretanto, em um modelo de melanoma murino, observou-se que células dendríticas de estágios iniciais do crescimento tumoral são capazes de acelerar o crescimento do tumor, e, células dendríticas de estágios tardios do crescimento tumoral, inibiram o crescimento do tumor (115). Assim, não se sabe o quanto o fenótipo das DCs e o tipo de tumor podem influenciar nesses resultados. Um estudo realizado com a linhagem de melanoma B16F10, demonstrou a presença de DCs mielóides (CD11c+B220-) e DCs plasmocitóides (CD11c+B220+) no infiltrado tumoral, sendo que mais de 80% das TIDCs são as DCs mielóides, apresentando fenótipo CD11c+B220- (116,117). Além disso, outro estudo demonstrou que as DCs do infiltrado tumoral em melanoma secretam maiores níveis da citocina IL-10 (imunossupressora) e menores níveis de IL-12 (citocina ativadora de células T) o que corrobora com os dados anteriores (118). Esses achados implicam que a interação entre o tumor e TIDCs podem mudar durante o crescimento tumoral.

Em tumores como o melanoma, foi demonstrado que no linfonodo drenante tumoral há uma redução de moléculas co-estimuladoras em todas as subpopulações de DCs, o que pode gerar uma tolerância do sistema imune frente a antígenos tumorais. Essas células demonstraram-se ineficientes na ativação de células T CD4+ e também na apresentação de antígenos tumorais (75,76,119). Foi demonstrado em um modelo de melanoma murino que, quando um antígeno não tumoral é injetado dentro do tumor, as células dendríticas também se demonstraram ineficientes na apresentação deste antígeno no linfonodo drenante, o que demonstra que o microambiente tumoral exerce um efeito de tolerância nas DCs do infiltrado podem induzir um estado não responsivo de resposta mediada por células T antitumorais (76).

Os mecanismos pelos quais as células dendríticas agem no microambiente tumoral ainda não estão claros. Entretanto a participação das DCs é necessária para indução da resposta antitumoral e na modulação do crescimento tumoral em diversos tipos de tumores. Uma vez que as DCs expressam ambas moléculas PD-1 e PD-L1, e pouco se sabe sobre o efeito da imunoterapia oncológica sobre as diferentes subpopulações de células dendríticas, estudos afins de elucidar esses mecanismos são necessários.

2.4 Imunoterapia oncológica

Imunoterapias fornecem algumas vantagens no tratamento antitumoral. Um ponto importante é que a imunoterapia visa como alvo as células do sistema imune e não as células tumorais, o que fornece uma abordagem ampla de uma única estratégia para tratar diversos

tipos de tumores com propriedades histológicas distintas, assim como características genéticas diferenciadas.

Terapia utilizando como alvo a molécula CTLA-4 vem sendo utilizada na prática clínica com sucesso. O uso de Ipilimumab (nome comercial do anticorpo anti-CTLA-4 para humanos - Medarex, Bristol-Myers Squibb) demonstrou um efeito de regressão em testes clínicos de fase I e II em vários tipos de tumores, incluindo melanoma, carcinoma de células renais, carcinoma urotelial, câncer de ovário e próstata (120–122). Em pacientes com melanoma, estudos clínicos de fase II com anti-CTLA-4 demonstraram um aumento de 20% na sobrevida dos pacientes e as pessoas tratadas viveram 4 -10 anos ou mais após o tratamento (122,123). O mecanismo exato pelo qual Ipilimumab estimula a atividade antitumoral ainda não é totalmente conhecido, contudo alguns estudos demonstram que durante o tratamento ocorre um aumento de células T efetoras e/ou diminuição do infiltrado tumoral de T regs (124).

O sucesso do tratamento com anti-CTLA-4 impulsionou novos estudos acerca de mecanismos envolvendo o desbloqueio da inibição das funções efetoras das células T. Assim outros mecanismos inibitórios mediados por células T vêm sendo explorados, como o programa de morte 1 (PD-1) e seu ligante (PD-L1). A função dessas moléculas na inibição da resposta tumoral não estava bem estabelecida até pouco tempo quando se mostrou que a presença de PD-L1 em células tumorais protegeu essas células da morte por induzir apoptose em células T (58). Estudos posteriores em modelos animais demonstraram o uso de anticorpos anti-PD-1 e anti-PD-L1, atuava de maneira semelhante ao anti-CTLA-1, levando ao desbloqueio imunológico para tratar tumores (25). Através desses estudos, o uso de tratamentos combinados começou a ser uma realidade, pois os mesmos atuam de forma eficaz e complementar em respostas antitumorais. Os mecanismos de tratamentos combinados devem focar em mecanismos não-redundantes e que evitem a resistência das células tumorais. Em pacientes com melanoma tanto no tratamento somente com anti-CTLA-4 como no tratamento combinado de anti-CTLA-4 com radioterapia, demonstraram resistência. Esse tratamento quando aplicado em modelo murino de melanoma, demonstrou resistência relacionada ao aumento da expressão de PD-L1 pelas células de melanoma e também foi relacionado a uma maior exaustão de células T (125). Assim, tratamentos complementares utilizando anti-CTLA-4, radiação e anti-PD-L1 demonstram uma maior eficácia, uma vez que essas terapias atuam respectivamente no aumento da disponibilidade de antígenos, expansão de células T, no aumento da diversidade dos TCRs das células T dos tecidos periféricos e, finalmente na reversão da exaustão dessas células (125).

Assim, a expressão de moléculas de bloqueio imunológico, infiltrado de linfócitos, e certas características genéticas de tumores podem representar um conjunto de características

que informa sobre a melhor estratégia de combinação a ser utilizada em cada paciente e/ou tipo de tumor. Em casos mais avançados, o conhecimento dessas características pode auxiliar a reverter mais rápido um quadro de tolerância do sistema imunológico e ainda, reduzindo efeitos colaterais e custos de terapias desnecessárias.

3 HIPÓTESE

O tratamento com o anticorpo monoclonal anti-PD-1 é capaz de ativar não somente a resposta de células T, mas também de diferentes subtipos de células dendríticas em diferentes regiões anatômicas de animais com tumor implantado.

4 OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Investigar a influência do imunoterápico oncológico desbloqueador da resposta imune anti-PD-1 em subpopulações de células dendríticas e células T em diferentes regiões anatômicas de animais com tumor implantado.

4.2. Objetivos específicos

1. Avaliar o crescimento tumoral de animais com melanoma ou câncer de pulmão tratados com anti-PD-1;
2. Avaliar o crescimento tumoral de animais com melanoma ou câncer de pulmão tratados com anti-PD-1 em camundongos imunodeficientes (*Nod Scid Gamma*);
3. Analisar a frequência de células dendríticas assim como o seu fenótipo no linfonodo drenante, sangue e infiltrado tumoral de animais com tumor tratados com anti-PD-1;
4. Analisar a frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺, e proliferação dessas células no linfonodo drenante, sangue e infiltrado tumoral de animais com tumor tratados com anti-PD-1;
5. Analisar as DCs provenientes de animais com tumor tratados com anti-PD-1 são mais eficientes a indução de respostas de células T específicas.

ANEXO 1: ARTIGO: *PD-1+ DENDRITIC CELLS EXHAUSTION CAN BE REVERTED BY α PD-1 TREATMENT IN MOUSE TUMOR MODEL*

5 Vírus Sincicial Respiratório (VSR)

O VSR é um vírus envelopado, com RNA de fita simples negativa, pertence à família *Pneumoviridae*, do gênero *Pneumovirus*, tem um genoma que codifica 11 proteínas. Dentre essas proteínas, duas estão presentes na superfície do vírion: a proteína de adesão (G) e a proteína de fusão (F) (126,127). As proteínas não-estruturais, NS1 e NS2, junto com as proteínas G e F, constituem os componentes chave para o ciclo infectivo e para a evasão da resposta imune do hospedeiro. O vírus interage com a nucleolina na superfície apical da célula hospedeira através da glicoproteína F do envelope viral. O bloqueio da nucleolina, através de anticorpo monoclonal, em células do epitélio pulmonar foi associado com uma redução significativa da infecção por VSR em camundongos, confirmando que nucleolina é um receptor funcional de VSR (128).

O VSR faz a adsorção na célula alvo pela fusão do envelope com a membrana celular e libertação do genoma viral no citoplasma da célula, onde ocorre a tradução, e formação de proteínas virais. A nucleoproteína (N), Large (L) e fosfoproteínas (P), matriz (M), proteína de fusão (F), e da glicoproteína (G) são classificadas como proteínas estruturais. As proteínas não-estruturais incluem NS1 e 2, hidrofóbico pequeno (SH) e M2 totalizando um RNA genômico de 15.25Kb (129). Na presença da proteína de fusão (F), as células infectadas podem infectar as vizinhas causando a fusão das membranas para formar uma "célula gigante" chamada de sincício (sin grego = com, e kytos = célula) caracterizado por uma grande célula multinucleada (126). Existem polimorfismos entre as cepas virais do VSR. Contudo a proteína G está presente em ambos os subtipos, com 53% dos seus aminoácidos conservados (130).

O VSR é considerado um vírus citopático, capaz de infectar o epitélio alveolar causando infiltração de células mononucleares, edema submucal, secreção de muco e algumas vezes o sincício é observado no pulmão (131,132). Quando o VSR infecta uma célula, assim como todos os vírus, seu objetivo é manter-se vivo dentro da mesma e se replicar. Para isso utiliza diversos mecanismos de virulência, como a inibição de fatores de transcrição JAK e STAT (133,134), diminuição da expressão de IFN- γ (135), diminuindo da sinalização TLR, diminuindo a apoptose e aumentando a vida da célula hospedeira (136,137). O VSR é um patógeno comum que pode causar sintomas em adultos e crianças, porém a infecção e sintomatologia mais grave ocorrem em lactentes, com agressão no trato respiratório inferior,

causando pneumonia, bronquiolite, otite média e asma, constituindo a infecção viral mais comum em recém-nascidos. (138)

Nos países ao Norte do Equador, o pico das infecções pelo VSR ocorre durante o início da primavera; no Sul, os climas chuvosos favorecem a transmissão do vírus (139). A patogenia do VSR é exacerbada por fatores ambientais, pela estrutura viral e por fatores do hospedeiro, como características genéticas, pacientes hospitalizados, imunodeprimidos e pacientes fumantes. Essa combinação está associada a uma infecção severa (140). Porém a idade é o maior fator de risco, sendo que a infecção primária ocorre na maioria das vezes em indivíduos menores de 3 meses e a reinfeção em menores de 6 meses (141). O mesmo causa a morte de idosos, recém-nascidos e imunocomprometidos, sendo que a mortalidade em 2005 foi de cerca de 66 mil pessoas no mundo, principalmente em países em desenvolvimento (142).

A vacinação em neonatos é um tema bastante discutido devido à imaturidade do sistema imunológico, contudo o VSR parece usar mais estratégias além da própria imaturidade imune. A falta de conhecimento sobre as estratégias de escape viral do VSR é um dos principais motivos do porque ainda não existir uma vacina eficiente contra o vírus (143).

A infecção por VSR é uma das principais causas de problemas respiratórios em lactentes, causando lesão pulmonar e bronquiolite, além de ser um fator que predispõe para asma na vida adulta. Devido à dificuldade de formação de uma resposta imune eficiente, principalmente de anticorpos neutralizantes de alta afinidade, o VSR é capaz de gerar infecções recorrentes mesmo com a mesma cepa viral. O mecanismo pelo qual o VSR evita essa resposta ainda é desconhecido. Recentemente, um tipo de linfócito T regulatório foi descrito cujo principal papel é inibir a resposta humoral através do controle de reações no centro germinativo, inibindo células B e TFH. Essas células são conhecidas como T foliculares regulatórias (TFR). Até o presente momento não está estabelecido o papel das células TFR na infecção pelo VSR. Nossa hipótese é que o VSR inibe a formação de anticorpos de alta afinidade pela indução da diferenciação de células TFR. Neste trabalho utilizaremos anticorpos fusionados com a proteína F do VSR para estimular subtipos de células dendríticas com o objetivo ativar uma resposta específica efetiva contra o VSR. Acreditamos que a utilização destes anticorpos fusionados com a proteína F do VSR possa induzir uma resposta de células TFH específica que ajude a geração de anticorpos neutralizantes e protetores contra a infecção. Os resultados obtidos serão instrumentais no desenvolvimento de novas terapias e vacinas para este importante problema de saúde pública.

5.1 A infecção por VSR e a resposta imunológica

A resposta imunológica contra os vírus é composta por dois mecanismos principais: a ação de anticorpos neutralizantes, antes mesmo da adsorção do vírus em alguma célula; e a resposta T CD8+ citotóxicas, quando o vírus já está dentro das células. Contudo, tanto as células B, quanto às células T CD8+ necessitam de células T auxiliares (CD4+) para uma resposta eficiente (144). A formação de anticorpos neutralizantes e de alta afinidade depende da ajuda de células T CD4+ auxiliares do tipo TFH para com as células B (145). A formação de linfócitos T CD8+ citotóxicos depende de citocinas (exemplo: IL-12) produzidas pelas células dendríticas (DCs) no momento da apresentação de antígeno nos linfonodos (146).

No caso da infecção por VSR, a resposta imunológica em geral não é eficiente. Estudos têm demonstrado que é a proteína F do VSR é capaz de inibir a ativação de células T (147). Gerando uma resposta inflamatória elevada no pulmão, responsável pelos sintomas nas crianças infectadas, oriunda da dificuldade na eliminação do vírus. Devido a injúria pulmonar inflamatória e desregulação da resposta adaptativa, o VSR consegue aumentar sua taxa de replicação e ocasiona o desenvolvimento de uma doença respiratória alérgica severa (148).

Evidências em estudos experimentais mostram que as células dendríticas presentes no trato respiratório carregam os antígenos virais do trato respiratório até os linfonodos drenantes ocasionando uma subsequente ativação de células T virgem. Porém parece ocorrer uma inibição da formação de células Th1 efetoras, juntamente com a diminuição da produção de IFN- γ (135) e consecutivamente de T CD8+ citotóxicas (149). O VSR ainda é capaz de induzir PD-L1 em células de linhagem de epitélio pulmonar, diminuindo a produção de granzima B pelas células T CD8+ em coculturas (150).

A ausência de sinais estimulatórios e a indução de sinais inibitórios pode ser uma explicação do porque o VSR é capaz de interferir na diferenciação de linfócitos T CD8+ de memória específicos para o vírus (151,152). As primeiras hipóteses da ausência da memória contra o VSR vêm sendo estudadas desde os anos 60, pelo fato de a primeira vacina não causar proteção contra subseqüentes infecções. A vacina com o vírus inativado com formalina além de não causar defesa contra subseqüentes infecções gerava uma elevada eosinofilia (153,154).

Estudos para o desenvolvimento de uma vacina eficiente para o VSR estão quase atingindo seu êxito. Atualmente existem 4 protótipos em fase 2 de testes clínicos, sendo um

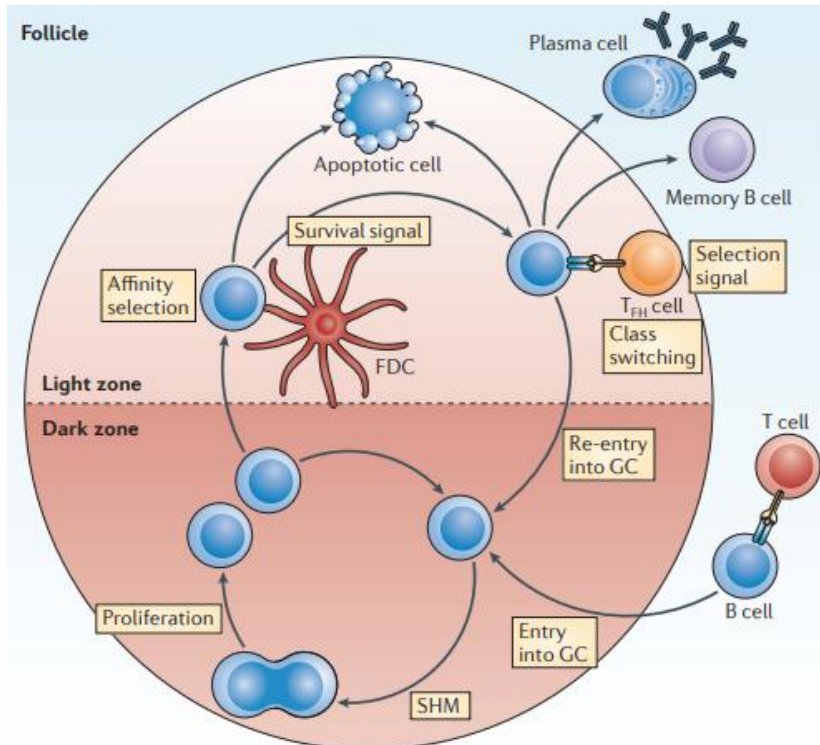
deles uma vacina que é aplicada na mãe, e as células de defesa e anticorpos seriam passado de forma transplacentária (155). Até agora o tratamento de crianças infectadas é feito a base do anticorpo monoclonal Palivizumab, que bloqueia a proteína F do vírus. O fármaco antiviral chamado Ribavirina, anteriormente utilizado como uma das estratégias de tratamento, não é o mais indicado devido a grande quantidade de efeitos colaterais e alta toxicidade (155).

5.2 Reação do Centro Germinativo

O Centro Germinativo (GC) se encontra no centro dos folículos de células B, dentro dos órgãos linfoides secundários (baço e linfonodos). Dentro dos Centros Germinativos estão presentes as células responsáveis pela formação da resposta humoral. Para a formação de uma resposta humoral robusta e funcional contra diversos tipos de patógenos, o sistema imunológico necessita de múltiplos fatores. Entre eles, a total funcionalidade de um subtipo particular de células T CD4⁺ auxiliares, as células T auxiliares foliculares (TFH). Estas células recebem esse nome por serem primeiramente relacionadas aos folículos de órgãos linfoides secundários, e fornecerem ajuda às células B (156). Contudo as TFH não ficam restritas apenas aos folículos; elas podem migrar e desempenhar funções em outros órgãos e na circulação, possuindo características de *memória-like* (157). Assim como os demais subtipos de células T CD4⁺, as células TFH apresentam uma assinatura molecular característica, apresentando em sua superfície os marcadores PD-1, CXCR5, ICOS e SLAM além do CD4. PD-1 é um receptor conhecido como *Programmed death 1* (morte programada 1), sendo altamente expresso nas TFH. Este receptor pode induzir a anergia de células T no momento que reconhece seu ligante (PD-L1 ou PD-L2) em outras células (158). A função de PD-1 nessa população celular ainda não está bem compreendida, porém sabe-se que ele é importante para a formação do centro germinativo (159). O PD-1 bloqueia a sinalização da IL-2, impedindo a regulação positiva de Blimp-1 (fator transcricional contrário a Bcl-6) importante para a diferenciação de células TFH (160). A molécula SLAM é associada à adesão e co-estimulação, favorecendo a sinapse imunológica das células TFH com células B e DCs. Isso contribui para a formação do centro germinativo e geração de células B de memória (161). O receptor de quimiocina CXCR5 é responsável por manter as células TFH no centro germinativo (162). Contudo, quando as células TFH diminuem a expressão de CXCR5, tornam-se capazes de sair do folículo, perdendo sua denominação de TFH do centro germinativo (GC TFH) (163). Estas células passam então a

expressar um fenótipo de memória na circulação, e expressam também os marcadores CD62L e CCR7, os quais permitem que estas células retornem aos outros folículos (164). A migração das células TFH através de pseudópodes para o centro germinativo é altamente dependente da ligação de seu receptor ICOS com o ligante ICOSL (presente em células B foliculares) (165).

Alguns sinais necessários para a diferenciação de células TFH já são conhecidos. O microambiente deve conter citocinas como IL-21 e IL-6 (166), que farão com que as células TH0 (células T CD4+ que ainda não entraram em contato com antígeno) sejam capazes de expressar os fatores transcricionais Bcl6 e c-Maf. Esses fatores induzem a diminuição da expressão de CCR7 e aumento da expressão de CXCR5, permitindo a saída dessas células da zona T dos órgãos linfoides secundários (167), em direção ao folículo e posteriormente ao Centro Germinativo (168). No Centro Germinativo encontram-se as células dendríticas foliculares (FDCs), que secretam CXCL13 (quimiocina de atração para o receptor CXCR5) (169). As TFH secretam a citocina IL-21 que age tanto de forma autócrina quanto parácrina, sendo essencial para a manutenção do Centro Germinativo (170).



Reação do centro germinativo. Na borda da célula T-B do linfonodo as células B apresentam antígeno às células T auxiliares e recebem sinais co-estimulatórios. As células selecionadas entram na zona escura do CG e sofrem hipermutação somática (SHM) aumentando AID. Após um ciclo (ou possivelmente mais ciclos) de proliferação e SHM, as células B migram para a zona clara. Na zona clara, os BCRs mutados são expostos a antígenos através das células dendríticas foliculares (FDCs). Se a afinidade do BCR for muito baixa, a célula B não receberá sinais de sobrevivência e sofrer apoptose. As células B sobreviventes podem então sofrer três destinos: eles podem reentrar na zona escura e passar por mais proliferação e SHM, eles podem sair do CG como plasmócitos ou podem sair como células B de memória.

Nos linfonodos, as células B são capazes de reconhecer antígenos iniciando assim a produção de anticorpos. Os antígenos podem chegar aos linfonodos pelos vasos linfáticos através de imunocomplexos (171) ou via células apresentadoras de antígenos (DCs e macrófagos). As células B são ativadas através do seu receptor BCR, formado pela imunoglobulina de superfície e moléculas acessórias. No final do processo, diferenciam-se em plasmócitos e ficam aptas a secretar anticorpos em altas quantidades. Porém, os primeiros anticorpos produzidos não são totalmente eficientes. Após o primeiro encontro com o antígeno, as células B migram para os folículos B (em torno do centro germinativo) onde estão localizadas as FDCs. As FDCs apresentam antígenos complexos não processados para as células B, que são capazes, então, de maturar a afinidade melhorando a qualidade e força de ligação do anticorpo (172). As FDC produzem o Fator Ativador de célula B (BAFF) durante a interação com as células B, sendo esta citocina essencial para a proliferação e sobrevivência dos linfócitos B. Após esse estímulo, as células B interagem com as células TFH através de moléculas co-estimulatórias (ICOS, CD40, SLAM) e citocinas (IL-21 e IL-6), fazendo com que as células B troquem a classe de imunoglobulinas e produzam anticorpos eficientes (156).

Nos últimos anos, uma nova população de células T CD4⁺ regulatórias vindo sendo estudada como a principal célula inibitória da resposta humoral. Essas células são denominadas células T foliculares regulatórias (TFR), capazes de diminuir a secreção de anticorpos pelas células B e impedir a ação das células TFH. As TFR apresentam os mesmos marcadores que as células TFH, contudo são menos proliferativas e expressam CD25 e Foxp3. Algumas vias de inibição já foram desvendadas: como a produção de IL-10 e TGF- β capaz de inibir a produção de anticorpos, a indução de moléculas inibitórias (CTLA-4 e PD-L1) e até mesmo a indução de morte de células B pela produção de granzimas (173–175).

6 HIPÓTESE

O motivo pelo qual a resposta humoral induzida contra o Vírus Sincicial Respiratório é falha se dá pelo fato de o mesmo induzir PD-L1 em células dendríticas e células B, levando a disfuncionalidade de células T auxiliares foliculares.

7 OBJETIVOS

7.1. Objetivo geral

Investigar a influência da expressão de PD-L1 pelos vírus sincicial respiratório na resposta humoral e como reverter esse perfil.

7.2. Objetivos específicos

1. Avaliar se o VSR é capaz de induzir a diferenciação de células TFH e TFR *in vitro* e *in vivo*;
2. Confirmar se o VSR é capaz de induzir PD-L1 em células B e DCs *in vitro* e *in vivo*;
3. Avaliar se o VSR é capaz de interferir na função de células TFH e TFR *in vitro* e *in vivo*;
4. Investigar se o tratamento com IL-21 é capaz de aumentar a resposta humoral contra o VSR;
5. Analisar se o tratamento com IL-21 é capaz de proteger os animais da infecção por VSR;
6. Investigar se a resposta humoral formada pela ação da IL-21 sozinha consegue proteger os animais da infecção por VSR;

ANEXO 2: ARTIGO: *RSV DOWNREGULATES IL-21/IL-21R ON TFH CELLS VIA PD-L1 INDUCTION IN APCs IMPAIRING PROTECTIVE HUMORAL RESPONSES*

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, foram abordados diferentes aspectos da imunidade antitumoral e antiviral, focando na interação dos subtipos de células dendríticas com subtipos de linfócitos T, na geração de imunidade celular e humoral específica.

A análise comparativa das respostas imunes geradas em animais com melanoma ou câncer de pulmão tratados com anti-PD-1 ou IgG controle trouxe uma série de informações importantes para este campo de estudo. O tratamento mobilizou populações de células diferentes. Ainda, o fato de existir uma resposta detectável no sangue abre uma nova linha de investigação de marcadores prognósticos, ou desenvolvimento de testes companheiros, para estes tratamentos.

Pretendemos prosseguir nesta linha de investigação, aprofundando o conhecimento sobre os mecanismos pelos quais anti-PD-1 pode influenciar os subtipos de DCs. Será interessante verificar se existe um efeito direto do anticorpo, investigar esse fenômeno em diferentes tipos tumorais. Estudos em pacientes tratados com nivolumab (anti-PD-1) serão importantes para determinar o alcance translacional destes achados. Estamos atualmente estabelecendo colaboração com o setor de oncologia do Hospital São Lucas, para elaborar um projeto que nos permita estudar mais a fundo as respostas imunes circulantes em pacientes de diversos tumores, tratados com diferentes regimes de imunoterapias, principalmente anti-CTLA-4, PD-1 e PD-L1. Nossos estudos partirão de análises celulares, como realizado neste trabalho, mas deve compreender ainda a busca de assinaturas gênicas que nos permitam identificar claramente ativação preferencial de diferentes respostas imunes nesses pacientes. Tais perguntas constituem hoje um ponto fundamental para a terapia oncológica.

A segunda parte deste trabalho, com o uso de um modelo murino de infecção por VSR, nossos resultados desvendam um mecanismo imunológico pelo qual o VSR modula as células TFH e TFR e a reação do centro germinativo. Confirmamos que o VSR pode induzir PD-L1 em células dendríticas e células B, diminuindo as funções das células B e TFH. Isto está correlacionado com diminuição da capacidade das células TFH produzirem IL-21 e regulação negativa de IL-21R, conduzindo a uma resposta humoral de baixa avidéz para VSR. O tratamento com IL-21 recombinante reduziu o comprometimento mediado pelo VSR na indução da resposta humoral como um todo, bem como melhorou a sobrevivência dos animais. Nossos resultados sublinham a importância da atividade da via PD-1 / PD-L1 e da atividade

adjuvante da IL-21 na geração de respostas efetivas de anticorpos protetores anti-VSR. Pela avaliação da resposta de mucosa formada pela ação da IL-21, descobrimos que essa citocina foi capaz de induzir a modulação de células TFH e TFR no linfonodo drenante e pulmão infectados dos animais e mesmo ativar a diferenciação de subtipos de células B capazes de secretar anticorpos com alta afinidade. Também foi mensurado os níveis de anticorpos IgG e IgA presentes no lavado broncoalveolar, e avaliado a capacidade protetora dos mesmos com a imunização passiva antes da infecção.

REFERENCIAS

1. Zhou L, Chong MMW, Littman DR. Review Plasticity of CD4 + T Cell Lineage Differentiation. *Immunity*. 2009;30(5):646–55.
2. Gajewski TF, Schreiber H, Fu Y-X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol*. 2013;14(10):1014–22.
3. Sharma P, Allison JP. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: Toward combination strategies with curative potential. *Cell* [Internet]. 2015;161(2):205–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.030>
4. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annu Rev Immunol*. 2011;(29):235–71.
5. Steinman RM, Bonifaz L, Fujii S, Liu K, Bonnyay D, Yamazaki S, et al. The innate functions of dendritic cells in peripheral lymphoid tissues. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2005;560:83–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15932024>
6. Murphy KM, Stockinger B. Effector T cell plasticity: Flexibility in the face of changing circumstances. *Nat Immunol* [Internet]. 2010;11(8):674–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1899>
7. Torchinsky MB, Garaude J, Martin AP, Blander JM. Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T H17 cell differentiation. *Nature* [Internet]. 2009;458(7234):78–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature07781>
8. Liu K, Nussenzweig MC. Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev*. 2010;234(1):45–54.
9. Shortman K, Liu Y, Walter T, Hall E. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(March).
10. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2013;13(4):227–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3405>
11. David A, Crawford F, Garside P, Kappler JW, Marrack P, MacLeod M. Tolerance induction in memory CD4 T cells requires two rounds of antigen-specific activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(21):7735–40.
12. Gutcher I, Becher B. Science in medicine APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. 2007;117(5).
13. Burchill MA, Yang J, Vang KB, Moon JJ, Chu HH, Lio CJ, et al. Article Linked T Cell Receptor and Cytokine Signaling Govern the Development of the Regulatory T Cell Repertoire. 2007;2.
14. Jenkins MK, Khoruts A, Ingulli E, Mueller DL, Mcosorley SJ, Reinhardt RL, et al. I N V I V O A C T I V A T I O N O F A N T I G E N - S P E C I F I C C D 4 T C E L L S. 2001;23–45.
15. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2012 Apr [cited 2014 Jul 10];12(4):252–64. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22437870>

16. Read BS, Malmström V, Powrie F. Cytotoxic T Lymphocyte – associated Antigen 4 Plays an Essential Role in the Function of CD25⁺ CD4⁺ Regulatory Cells that Control Intestinal Inflammation. 2000;192(2).
17. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, et al. Regulatory T Cells Constitutively Expressing Cytotoxic T Lymphocyte – associated Antigen 4. *J Exp Med* [Internet]. 2000;192(2):303–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10899917> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2193248>
18. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. 1996;271(March):1–3.
19. Fan X, Quezada SA, Sepulveda MA, Sharma P, Allison JP. Engagement of the ICOS pathway markedly enhances efficacy of CTLA-4 blockade in cancer immunotherapy. *J Exp Med* [Internet]. 2014;211(4):715–25. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20130590>
20. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(4):295–307.
21. Quezada SA, Peggs KS, Curran MA, Allison JP. CTLA4 blockade and GM-CSF combination immunotherapy alters the intratumor balance of effector and regulatory T cells. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1935–45.
22. Maker AV, Attia P, Rosenberg SA, Maker AV, Attia P, Rosenberg SA. Analysis of the cellular mechanism of antitumor responses and Autoimmunity in Patients Treated with CTLA-4 Blockade. *J Immunol*. 2005;(175):7746–54.
23. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, et al. CTLA-4 Can Function as a Negative Regulator of T Cell Activation. *Immunity*. 1994;1:405–13.
24. Krummel BMF, Allison J. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med*. 1995;182(August):459–65.
25. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2008;26(1):677–704. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331>
26. Zhang X, Schwartz JD, Guo X, Bhatia S, Cao E, Chen L, et al. Structural and Functional Analysis of the Costimulatory Receptor Programmed Death-1. *Immunity*. 2004;20:337–47.
27. Nishimura H, Agata Y, Kawasaki A, Sato M, Imamura S, Minato N, et al. Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative (CD4⁻CD8⁻) thymocytes. *Int Immunol*. 1996;8(5):773–80.
28. Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, Matsuda H, Aoki M, Tanno Y, et al. Expression of Programmed Death 1 Ligands by Murine T Cells and APC. *J Immunol*. 2002;169:5538–45.

29. Schreiner B, Mitsdoerffer M, Kieseier BC, Chen L, Hartung HP, Weller M, et al. Interferon- β enhances monocyte and dendritic cell expression of B7-H1 (PD-L1), a strong inhibitor of autologous T-cell activation: Relevance for the immune modulatory effect in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2004;155(1–2):172–82.
30. Lee S, Jang B, Lee S, Yang Y, Suh S, Park Y, et al. Interferon regulatory factor-1 is prerequisite to the constitutive expression and IFN- γ -induced upregulation of B7-H1 (CD274). *Fed Eur Biochem Soc.* 2006;580:755–62.
31. Parsa AT, Waldron JS, Panner A, Crane CA, Parney IF, Barry JJ, et al. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med.* 2007;13(1):84–8.
32. Liu J, Hamrouni A, Wolowiec D, Coiteux V, Kuliczkowski K, Hetuin D, et al. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- γ and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood.* 2007;110(1):296–304.
33. Pentcheva-hoang T, Chen L, Pardoll DM, Allison JP. Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. *PNAS.* 2007;104(45):17765–70.
34. Freeman BGJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *J Exp Med.* 2000;192(7):1027–34.
35. Chemnitz JM, Parry R V, Nichols KE, June CH, Riley JL. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol.* 2004;173(2):945–54.
36. Nurieva R, Thomas S, Nguyen T, Martin-Orozco N, Wang Y, Kaja MK, et al. T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals. *EMBO J.* 2006;25(11):2623–33.
37. Parry R V, Chemnitz JM, Frauwirth K a, Lanfranco AR, Braunstein I, Sumire V, et al. CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms †. *Mol Cell Biol.* 2005;25(21):9543–53.
38. Probst HC, McCoy K, Okazaki T, Honjo T, Van Den Broek M. Resting dendritic cells induce peripheral CD8⁺ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat Immunol.* 2005;6(3):280–6.
39. Soularue E, Lepage P, Colombel JF, Coutzac C, Faleck D, Marthey L, et al. Enterocolitis due to immune checkpoint inhibitors: A systematic review. *Gut.* 2018;67(11):2056–67.
40. Yao S, Wang S, Zhu Y, Luo L, Zhu G, Flies S, et al. PD-1 on dendritic cells impedes innate immunity against bacterial infection. *Blood.* 2016;113(23):5811–9.
41. Brown J a, Dorfman DM, Ma F-R, Sullivan EL, Munoz O, Wood CR, et al. Blockade

- of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol.* 2003;170(3):1257–66.
42. Chen L, Zhang Z, Chen W, Zhang Z, Li Y, Shi M, et al. B7-H1 up-regulation on myeloid dendritic cells significantly suppresses T cell immune function in patients with chronic hepatitis B. *J Immunol.* 2007;178(10):6634–41.
 43. Dyck L, Mills KHG. Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. *Eur J Immunol* [Internet]. 2017;1–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28393361>
 44. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Vol. 144, *Cell.* 2011. p. 646–74.
 45. Weinberg RA. Tumor Suppressor Genes A Brief History of Tumor Suppressors. 1991;254(1986).
 46. Qian B, Pollard JW. Review Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. 2010;39–51.
 47. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature.* 2007;449(October).
 48. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Review Immunity , Inflammation , and Cancer. *Cell.* 2010;140(6):883–99.
 49. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN g and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. 2001;410(April):1107–11.
 50. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting : from immuno- surveillance to tumor escape. 2002;3(11):991–8.
 51. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. 2007;1–14.
 52. Matzinger P. TOLERANCE , DANGER , DANGER , AND AND THE THE EXTENDED FAMILY * FAMIL y * EXTENDED. *Annu Rev Immunol.* 1994;991–1045.
 53. Pardoll D. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol.* 2003;21(1):807–39.
 54. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: Back to Virchow? *Lancet.* 2001;357(9255):539–45.
 55. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li Z-W. Nf-Kb in Cancer: From Innocent Bystander To Major Culprit. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(4):301–10.
 56. Old LJ, Boyse E a. Immunology of experimental tumors. *Ann Rev Med.* 1964;(September).
 57. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity’s

- Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* (80-). 2011;331(6024):1565–70.
58. Dong H, Strome S, Salomao D, Tamura H, Hirano F, Flies D, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis : A potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. 2002;(4):793–800.
 59. Schreiber RD. Cancer Immunoediting : Integrating Suppression and Promotion. 2012;1565(2011).
 60. Melero I, Gaudernack G, Gerritsen W, Huber C, Parmiani G, Scholl S, et al. Therapeutic vaccines for cancer : an overview of clinical trials. *Nat Publ Gr*. 2014;11(9):509–24.
 61. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, et al. Clinical Impact of Different Classes of Infiltrating T Cytotoxic and Helper Cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in Patients with Colorectal Cancer. *Cancer Res*. 2011;71(4):1263–71.
 62. Maruyama T, Kono K. Distribution of Th17 cells and FoxP3 (+) regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes, tumor-draining lymph nodes and peripheral blood lymphocytes in. *Cancer* 2010;101(9):1947–54.
 63. Kryczek I, Wei S, Szeliga W, Vatan L, Zou W. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood*. 2009;114(2):357–9.
 64. Martin-orozco N, Muranski P, Chung Y, Yang XO, Yamazaki T, Lu S, et al. T Helper 17 Cells Promote Cytotoxic T Cell Activation in Tumor Immunity. *Immunity*. 2009;31(5):787–98.
 65. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*. 2007;450(7171):903–7.
 66. Villablanca EJ, Raccosta L, Zhou D, Fontana R, Maggioni D, Negro A, et al. Tumor-mediated liver X receptor-alpha activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. *Nat Med*. 2010;16(1):98–105.
 67. Herber DL, Cao W, Nefedova Y, Novitskiy S V, Nagaraj S, Tyurin V a, et al. Lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer. *Nat Med*. 2010;16(8):880–6.
 68. Speeckaert R, Vermaelen K, van Geel N, Autier P, Lambert J, Haspeslagh M, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase, a new prognostic marker in sentinel lymph nodes of melanoma patients. *Eur J Cancer*. 2012;48(13):2004–11.
 69. Blank C, Mackensen A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunol Immunother*. 2007;56(5):739–45.
 70. Kawamura K, Bahar R, Natsume W, Sakiyama S, Tagawa M. Secretion of interleukin-10 from murine colon carcinoma cells suppresses systemic antitumor immunity and impairs protective immunity induced against the tumors. *Cancer Gene Ther*. 2002;9(1):109–15.
 71. Nicholaou T, Ebert LM, Davis ID, McArthur G a, Jackson H, Dimopoulos N, et al.

- Regulatory T-cell-mediated attenuation of T-cell responses to the NY-ESO-1 ISCOMATRIX vaccine in patients with advanced malignant melanoma. *Clin Cancer Res.* 2009;15(6):2166–73.
72. Turk MJ. Concomitant Tumor Immunity to a Poorly Immunogenic Melanoma Is Prevented by Regulatory T Cells. *J Exp Med.* 2004;200(6):771–82.
 73. Nevala WK, Vachon CM, Leontovich AA, Scott CG, Thompson MA, Markovic SN. Evidence of systemic Th2-driven chronic inflammation in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 2009;15(6):1931–9.
 74. Jacobs JFM, Nierkens S, Figdor CG, Vries IJM De, Adema GJ. Regulatory T cells in melanoma : the final hurdle towards effective immunotherapy ? *Lancet.* 2012;32–42.
 75. Gerner MY, Casey KA, Mescher MF. Defective MHC class II presentation by dendritic cells limits CD4 T cell help for antitumor CD8 T cell responses. *J Immunol (Baltimore, Md 1950).* 2008;181(1):155–64.
 76. Souza APD De, Borges TD Jesus, Pillat MM, Bonorino C. CD4 + T cell response against a non-tumor antigen is una V ected in melanoma-bearing mice. 2011;145–51.
 77. Kallinteris NL, Wu S, Lu X, Humphreys RE, von Hofe E, Xu M. Enhanced CD4+ T-cell response in DR4-transgenic mice to a hybrid peptide linking the Ii-Key segment of the invariant chain to the melanoma gp100(48-58) MHC class II epitope. *J Immunother.* 2005;28(4):352–8.
 78. Miyabayashi T, Kagamu H, Koshio J, Ichikawa K. Vaccination with CD133 + melanoma induces specific Th17 and Th1 cell – mediated antitumor reactivity against parental tumor. 2011;1597–608.
 79. Alli R, Zhang ZM, Nguyen P, Zheng JJ, Geiger TL. Rational Design of T Cell Receptors with Enhanced Sensitivity for Antigen. 2011;6(3).
 80. Wan Q, Kozhaya L, Imberg K, Mercer F, Zhong S, Krogsgaard M, et al. Probing the Effector and Suppressive Functions of Human T Cell Subsets Using Antigen-Specific Engineered T Cell Receptors. 2013;8(2).
 81. Quezada S a, Simpson TR, Peggs KS, Merghoub T, Vider J, Fan X, et al. Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J Exp Med.* 2010;207(3):637–50.
 82. Stone JD, Harris DT, Kranz DM. TCR affinity for p/MHC formed by tumor antigens that are self-proteins: impact on efficacy and toxicity. *Curr Opin Immunol.* 2015;33:16–22.
 83. Engels B, Chervin AS, Sant AJ, Kranz DM, Schreiber H. Long-term Persistence of CD4+ but Rapid Disappearance of CD8+ T Cells Expressing an MHC Class I-restricted TCR of Nanomolar Affinity. *Mol Ther.* 2012;20(3):652–60.
 84. Steinman R, Harbor B. Identification of a novel cell type in perypheral organs of mice. *J Exp Med.* 1973;137:1142–62.
 85. Steinman RM, Witmer MD. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.*

- 1978;75(10):5132–6.
86. Segura E, Kapp E, Gupta N, Wong J, Lim J, Ji H, et al. Differential expression of pathogen-recognition molecules between dendritic cell subsets revealed by plasma membrane proteomic analysis. *Mol Immunol*. 2010;47(9):1765–73.
 87. Heath WR, Carbone FR. Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nat Immunol*. 2009;10(12):1237–44.
 88. Heath WR, Carbone FR. The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. *Nat Immunol* [Internet]. 2013;14(10):978–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24048119>
 89. Belz GT, Nutt SL. Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2012;12(2):101–13. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri3149>
 90. Haniffa M, Shin A, Bigley V, McGovern N, Teo P, See P, et al. Human Tissues Contain CD141^{hi} Cross-Presenting Dendritic Cells with Functional Homology to Mouse CD103⁺ Nonlymphoid Dendritic Cells. *Immunity*. 2012;37(1):60–73.
 91. Belz GT, Smith CM, Kleinert L, Reading P, Brooks A, Shortman K, et al. Distinct migrating and nonmigrating dendritic cell populations are involved in MHC class I-restricted antigen presentation after lung infection with virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(23):8670–5.
 92. Vremec D, Pooley J, Hochrein H, Wu L, Shortman K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol*. 2000;164(6):2978–86.
 93. Bedoui S, Whitney PG, Waithman J, Eidsmo L, Wakim L, Caminschi I, et al. Cross-presentation of viral and self antigens by. 2009;10(5):488–95.
 94. Waithman J, Zanker D, Xiao K, Oveissi S, Wylie B, Ng R, et al. Resident CD8⁺ and Migratory CD103⁺ Dendritic Cells Control CD8 T Cell Immunity during Acute Influenza Infection. *PLoS One*. 2013;8(6):1–7.
 95. Kim TS, Braciale TJ. Respiratory dendritic cell subsets differ in their capacity to support the induction of virus-specific cytotoxic CD8⁺ T cell responses. *PLoS One*. 2009;4(1):e4204.
 96. Pooley JL, Heath WR, Shortman K. Cutting Edge: Intravenous Soluble Antigen Is Presented to CD4 T Cells by CD8⁻ Dendritic Cells, but Cross-Presented to CD8 T Cells by CD8⁺ Dendritic Cells. *J Immunol*. 2001;166(9):5327–30.
 97. Mount AM, Smith CM, Kupresanin F, Stoermer K, Heath WR, Belz GT. Multiple dendritic cell populations activate CD4⁺ T cells after viral stimulation. *PLoS One*. 2008;3(2):e1691.
 98. Allenspach EJ, Lemos MP, Porrett PM, Turka LA, Laufer TM. Migratory and Lymphoid-Resident Dendritic Cells Cooperate to Efficiently Prime Naive CD4 T cells. *Immunity*. 2008;29(5):795–806.
 99. Reis e Sousa C, Hieny S, Schariton-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, et

- al. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med*. 1997;186(11):1819–29.
100. Iwasaki A, Kelsall BL. Localization of Distinct Peyer's Patch Dendritic Cell Subsets and Their Recruitment by Chemokines Macrophage Inflammatory Protein (Mip)-3 , Mip-3 , and Secondary Lymphoid Organ Chemokine. *J Exp Med*. 2000;191(8):1381–94.
 101. Malissen B, Tamoutounour S, Henri S. The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nat Rev Immunol [Internet]*. 2014;14(6):417–28. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri3683>
 102. Merad M, Manz MG, Dc W, Merad M, Manz MG. Review article Dendritic cell homeostasis. 2013;3418–27.
 103. Ouchi T, Kubo A, Yokouchi M, Adachi T, Kobayashi T, Kitashima DY, et al. Langerhans cell antigen capture through tight junctions confers preemptive immunity in experimental staphylococcal scalded skin syndrome. *J Exp Med*. 2011;208(13):2607–13.
 104. Kautz-Neu K, Noordegraaf M, Dinges S, Bennett CL, John D, Clausen BE, et al. Langerhans cells are negative regulators of the anti-Leishmania response. *J Exp Med*. 2011;208(5):885–91.
 105. Chorro L, Sarde A, Li M, Woollard KJ, Chambon P, Malissen B, et al. Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. *J Exp Med*. 2009;206(13):3089–100.
 106. Villadangos J a., Young L. Antigen-Presentation Properties of Plasmacytoid Dendritic Cells. *Immunity*. 2008;29(3):352–61.
 107. León B, López-Bravo M, Ardavín C. Monocyte-Derived Dendritic Cells Formed at the Infection Site Control the Induction of Protective T Helper 1 Responses against Leishmania. *Immunity*. 2007;26(4):519–31.
 108. Cheong C, Matos I, Choi JH, Dandamudi DB, Shrestha E, Longhi MP, et al. Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209 + dendritic cells for immune T cell areas. *Cell*. 2010;143(3):416–29.
 109. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):762–74.
 110. Karthaus N, Torensma R, Tel J. Deciphering the message broadcast by tumor-infiltrating dendritic cells. *Am J Pathol*. 2012;181(3):733–42.
 111. Jochems C, Schlom J. Between Conventional Cancer Therapy and Immunity. *J Exp Med*. 2011;236(5):567–79.
 112. Tran Janco JM, Lamichhane P, Karyampudi L, Knutson KL. Tumor-Infiltrating Dendritic Cells in Cancer Pathogenesis. *J Immunol*. 2015;194(7):2985–91.
 113. Krempski J, Karyampudi L, Behrens MD, Courtney L, Hartmann L, Dong H, et al.

- Tumor-Infiltrating Programmed death receptor-1+ Dendritic Cells Mediate Immune Suppression in Ovarian Cancer. *J Immunol.* 2012;186(12):6905–13.
114. Scarlett UK, Rutkowski MR, Rauwerdink AM, Fields J, Escovar-Fadul X, Baird J, et al. Ovarian cancer progression is controlled by phenotypic changes in dendritic cells. *J Exp Med.* 2012;209(3):495–506.
 115. Nakahara T, Oba J, Shimomura C, Kido-Nakahara M, Furue M. Early Tumor-Infiltrating Dendritic Cells Change their Characteristics Drastically in Association with Murine Melanoma Progression. *J Invest Dermatol.* 2015;(August):1–36.
 116. Preynat-seauve O, Schuler P, Contassot E, Beermann F, Huard B, French LE. Tumor-Infiltrating Dendritic Cells Are Potent Tumor Rejection 1. *J Immunol.* 2006;
 117. Stoitzner P, Green LK, Jung JY, Price KM, Atarea H, Kivell B, et al. Inefficient presentation of tumor-derived antigen by tumor-infiltrating dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2008;57(11):1665–73.
 118. Zhao F, Falk C, Osen W, Kato M, Schadendorf D, Umansky V. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase drives dendritic cells to become tolerogenic in Ret transgenic mice spontaneously developing melanoma. *Clin Cancer Res.* 2009;15(13):4382–90.
 119. Gerner MY, Mescher MF. Antigen processing and MHC-II presentation by dermal and tumor-infiltrating dendritic cells. *J Immunol.* 2009;182(5):2726–37.
 120. Yang JC, Hughes M, Kammula U, Royal R, Sherry RM, Topalian SL, et al. Ipilimumab (Anti-CTLA4 Antibody) Causes Regression of Metastatic Renal Cell Cancer Associated With Enteritis and Hypophysitis. *J Immunother.* 2007;30(8):825–30.
 121. Carthon BC, Wolchok JD, Yuan J, Kamat A, Tang DSN, Sun J, et al. Preoperative CTLA-4 Blockade : Tolerability and Immune Monitoring in the Setting of a Presurgical Clinical Trial. *Clin Cancer Res.* 2010;16:2861–72.
 122. Hodi FS, Butler M, Oble DA, Seiden M V, Haluska FG, Kruse A, et al. Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients. 2008;105(8):3005–10.
 123. Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, Weber JS, Margolin K, Hamid O, et al. Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol.* 2015;33(17).
 124. Smyth MJ, Ngiow SF, Ribas A, Teng MWL. Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment. *Nat Rev Clin Oncol.* 2015;1–16.
 125. Victor CT, Rech AJ, Maity A, Rengan R, Pauken KE, Stelekati E, et al. Radiation and dual checkpoint blockade non-redundant immune mechanisms in cancer. *Nature.* 2015;
 126. Bueno SM, González P a, Pacheco R, Leiva ED, Cautivo KM, Tobar HE, et al. Host immunity during RSV pathogenesis. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2008 Oct [cited 2015 Jul 10];8(10):1320–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18687294>

127. Ogra PL. Respiratory syncytial virus : The virus , the disease and the immune response. 2004;5.
128. Tayyari F, Marchant D, Moraes TJ, Duan W, Mastrangelo P, Hegele RG. Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. *Nat Med* [Internet]. 2011 Sep [cited 2015 Jul 13];17(9):1132–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21841784>
129. McLellan JS, Yang Y, Graham BS, Kwong PD. Structure of respiratory syncytial virus fusion glycoprotein in the postfusion conformation reveals preservation of neutralizing epitopes. *J Virol* [Internet]. 2011 Aug [cited 2015 Jul 13];85(15):7788–96. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3147929&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
130. Bukreyev A, Yang L, Fricke J, Cheng L, Ward JM, Murphy BR, et al. The secreted form of respiratory syncytial virus G glycoprotein helps the virus evade antibody-mediated restriction of replication by acting as an antigen decoy and through effects on Fc receptor-bearing leukocytes. *J Virol* [Internet]. 2008 Dec [cited 2015 Sep 2];82(24):12191–204. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2593351&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
131. Johnson JE, Gonzales R a, Olson SJ, Wright PF, Graham BS. The histopathology of fatal untreated human respiratory syncytial virus infection. *Mod Pathol* [Internet]. 2007 Jan [cited 2015 Jul 22];20(1):108–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17143259>
132. Wright PF, Ikizler MR, Gonzales RA, Carroll KN, Johnson JE, Werkhaven JA. Growth of Respiratory Syncytial Virus in Primary Epithelial Cells from the Human Respiratory Tract. 2005;79(13):8651–4.
133. Bhoj VG, Sun Q, Bhoj EJ, Somers C, Chen X, Torres J, et al. MAVS and MyD88 are essential for innate immunity but not cytotoxic T lymphocyte response against respiratory syncytial virus. 2008;
134. Hashimoto K, Ishibashi K, Ishioka K, Zhao D, Sato M, Ohara S, et al. RSV replication is attenuated by counteracting expression of the suppressor of cytokine signaling (SOCS) molecules. *Virology* [Internet]. 2009 Sep 1 [cited 2015 Sep 2];391(2):162–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19595407>
135. Schauer U, Hoffjan S, Rothoefl T, Bartz H, Konig S, Fuchs E, et al. Severe respiratory syncytial virus infections and reduced interferon-gamma generation in vitro. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2004 Oct [cited 2015 Sep 2];138(1):102–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1809175&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
136. Ling Z, Tran KC, Teng MN. Human respiratory syncytial virus nonstructural protein NS2 antagonizes the activation of beta interferon transcription by interacting with RIG-I. *J Virol* [Internet]. 2009 Apr [cited 2015 Sep 2];83(8):3734–42. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2663251&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

137. Bitko V, Shulyayeva O, Mazumder B, Musiyenko A, Ramaswamy M, Look DC, et al. Nonstructural proteins of respiratory syncytial virus suppress premature apoptosis by an NF-kappaB-dependent, interferon-independent mechanism and facilitate virus growth. *J Virol* [Internet]. 2007 Feb [cited 2015 Sep 2];81(4):1786–95. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1797585&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
138. Hall CB, Weinberg GA, Poehling KA, Erdman D, Grijalva CG, Zhu Y. The Burden of Respiratory Syncytial Virus Infection in Young Children. 2009;
139. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi S a, Singleton RJ, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet (London, England)* [Internet]. 2010 May 1 [cited 2015 Jun 22];375(9725):1545–55. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2864404&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
140. van Drunen Littel-van den Hurk S, Watkiss ER. Pathogenesis of respiratory syncytial virus. *Curr Opin Virol* [Internet]. 2012 Jun [cited 2015 Jul 17];2(3):300–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22709517>
141. Principles O. From the American Academy of Pediatrics: Policy statements--Modified recommendations for use of palivizumab for prevention of respiratory syncytial virus infections. *Pediatrics* [Internet]. 2009 Dec [cited 2015 Aug 12];124(6):1694–701. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19736258>
142. Baird JK, Gorelick KJ. Respiratory Syncytial Virus Infection in Elderly Adults. 2005;422–3.
143. Paul W, Taber LH, Frank AL, Kasel JA. Risk of Primary Infection and Reinfection With Respiratory Syncytial Virus. 2013;2–5.
144. Rouse BT, Sehrawat S. Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome? *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2010 Jul [cited 2015 Jun 13];10(7):514–26. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3899649&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
145. Crotty S. The 1-1-1 fallacy. 2012;133–42.
146. Agarwal P, Raghavan A, Nandiwada SL, Curtsinger JM, Bohjanen PR, Mueller DL, et al. Gene regulation and chromatin remodeling by IL-12 and type I IFN in programming for CD8 T cell effector function and memory. *J Immunol* [Internet]. 2009 Aug 1 [cited 2015 Nov 3];183(3):1695–704. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2893405&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
147. Walliser G, Fricke J, Conzelmann K. Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Mediates Inhibition of Mitogen-Induced T-Cell Proliferation by Contact. 2002;76(3):1163–70.
148. Jang S, Smit J, Kallal LE, Lukacs NW. Respiratory syncytial virus infection modifies and accelerates pulmonary disease via DC activation and migration. *J Leukoc Biol*

- [Internet]. 2013 Jul [cited 2015 Jun 8];94(1):5–15. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3685016&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
149. Chang J, Srikiatkachorn a., Braciale TJ. Visualization and Characterization of Respiratory Syncytial Virus F-Specific CD8+ T Cells During Experimental Virus Infection. *J Immunol* [Internet]. 2001 Oct 15 [cited 2015 Nov 3];167(8):4254–60. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.167.8.4254>
 150. Telcian AG, Laza-Stanca V, Edwards MR, Harker J a, Wang H, Bartlett NW, et al. RSV-induced bronchial epithelial cell PD-L1 expression inhibits CD8+ T cell nonspecific antiviral activity. *J Infect Dis* [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2015 Jul 17];203(1):85–94. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3086441&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 151. Bree GJ De, Heidema J, Leeuwen EMM Van, Bleek GM Van, Jonkers E, Jansen HM, et al. Respiratory Syncytial Virus – Specific CD8 + Memory T Cell Responses in Elderly Persons. 2005;191:0–8.
 152. Braciale TJ. Respiratory syncytial virus and T cells: interplay between the virus and the host adaptive immune system. *Proc Am Thorac Soc* [Internet]. 2005 Jan [cited 2015 Jul 17];2(2):141–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16113482>
 153. Openshaw PJM, Clarke SL, Record FM. Pulmonary eosinophilic response to respiratory syncytial virus infection in mice sensitized to the major surface glycoprotein G. 1992;4(4):493–500.
 154. Hill M. Helper T Cell Recognition of Respiratory Syncytial Virus in Mice. 1988;305–12.
 155. Mazur NI, Martínón-Torres F, Baraldi E, Fauroux B, Greenough A, Heikkinen T, et al. Lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus: current management and new therapeutics. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2015 Sep 24 [cited 2015 Oct 9];2600(15):1–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26411809>
 156. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2011 Jan [cited 2014 Jul 9];29(December):621–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21314428>
 157. Bentebibel S-E, Schmitt N, Banchereau J, Ueno H. Human tonsil B-cell lymphoma 6 (BCL6)-expressing CD4+ T-cell subset specialized for B-cell help outside germinal centers. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2011 Aug 16 [cited 2015 Jul 31];108(33):E488-97. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3158181&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 158. Giancchetti E, Delfino DV, Fierabracci A. Recent insights into the role of the PD-1/PD-L1 pathway in immunological tolerance and autoimmunity. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2013 Sep [cited 2015 Jul 17];12(11):1091–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23792703>

159. Tomayko M, Shlomchik MJ. NIH Public Access. 2010;11(6):535–42.
160. Gong D, Malek TR. Cytokine-Dependent Blimp-1 Expression in Activated T Cells Inhibits IL-2 Production. *J Immunol* [Internet]. 2006 Dec 19 [cited 2015 Nov 3];178(1):242–52. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.178.1.242>
161. Manuscript A. to improve vaccination. 2014;3(3):363–70.
162. Breitfeld BD, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, et al. Follicular B Helper T Cells Express CXCR5 Chemokine Receptor 5 , Localize to B Cell Follicles , and Support Immunoglobulin Production. 2000;192(11).
163. Lee SK, Rigby RJ, Zotos D, Tsai LM, Kawamoto S, Marshall JL, et al. B cell priming for extrafollicular antibody responses requires Bcl-6 expression by T cells. *J Exp Med* [Internet]. 2011 Jul 4 [cited 2015 Aug 23];208(7):1377–88. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3135363&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
164. Cells CT, Kim BCH, Rott LS, Clark-lewis I, Campbell DJ, Wu L, et al. Subspecialization of CXCR5² T Cells : B Helper Activity Is Focused in a Germinal Center – localized Subset of. 2001;193(12).
165. Xu H, Li X, Liu D, Li J, Zhang X, Chen X, et al. Follicular T-helper cell recruitment governed by bystander B cells and ICOS-driven motility. *Nature* [Internet]. 2013 Apr 25 [cited 2015 Jun 18];496(7446):523–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23619696>
166. Eto D, Lao C, DiToro D, Barnett B, Escobar TC, Kageyama R, et al. IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (Tfh) differentiation. *PLoS One* [Internet]. 2011 Jan [cited 2015 Jun 21];6(3):e17739. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3056724&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
167. Manuscript A. NIH Public Access. 2013;188(8):3734–44.
168. Hardtke S, Ohl L, Fo R. Balanced expression of CXCR5 and CCR7 on follicular T helper cells determines their transient positioning to lymph node follicles and is essential for efficient B-cell help. 2015;106(6):1924–32.
169. Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, Luther SA, Sedgwick JD, Browning JL, et al. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. 2000;406(July):309–14.
170. Linterman M a, Beaton L, Yu D, Ramiscal RR, Srivastava M, Hogan JJ, et al. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J Exp Med* [Internet]. 2010 Feb 15 [cited 2015 Nov 4];207(2):353–63. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2822609&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
171. Heesters B a, Chatterjee P, Kim Y-A, Gonzalez SF, Kuligowski MP, Kirchhausen T, et al. Endocytosis and recycling of immune complexes by follicular dendritic cells

- enhances B cell antigen binding and activation. *Immunity* [Internet]. 2013 Jun 27 [cited 2015 Oct 26];38(6):1164–75. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3773956&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
172. Kelsoe G. Life and Death in Germinal Centers (Redux). 1996;4:107–11.
173. Sage PT, Sharpe AH. T Follicular Regulatory Cells in the Regulation of B cell Responses. *Trends Immunol* [Internet]. 2015 Jun 16 [cited 2015 Jun 30];(Table 1):1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26091728>
174. Sage PT, Tan CL, Freeman GJ, Haigis M, Sharpe AH. Defective TFH Cell Function and Increased TFR Cells Contribute to Defective Antibody Production in Aging. *Cell Rep* [Internet]. 2015 Jul 14 [cited 2015 Jul 17];12(2):163–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26146074>
175. Wallin EF, Jolly EC, Suchánek O, Bradley JA, Espéli M, Jayne DRW, et al. Human T-follicular helper and T-follicular regulatory cell maintenance is independent of germinal centers. *Blood* [Internet]. 2014 Oct 23 [cited 2015 Jul 17];124(17):2666–74. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4208282&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
176. Heesters B a, Myers RC, Carroll MC. Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2014 Jul [cited 2015 Jun 1];14(7):495–504. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24948364>

ANEXOS

ANEXO 1 – Artigo: *PD-1+ DENDRITIC CELLS EXHAUSTION CAN BE REVERTED BY α PD-1 TREATMENT IN MOUSE TUMOR MODEL*

ANEXO 2 – Artigo: *RSV DOWNREGULATES IL-21/IL-21R ON TFH CELLS VIA PD-L1 INDUCTION IN APCs IMPAIRING PROTECTIVE HUMORAL RESPONSES*

ANEXO 3 – Cartas de Aprovação do Comitê de Ética para o Uso de Animais

ANEXO 4 – Participação em outros artigos como colaborador

ANEXO 5 – Submissão de artigo científico original

ANEXO 1

PD-1⁺ DENDRITIC CELLS EXHAUSTION CAN BE REVERSED BY α PD-1 TREATMENT IN MOUSE TUMOR MODEL

Rodrigo Benedetti Gassen^{1,2}, Eliza Mazak¹, Karina Lima¹, Tiago Fazolo^{1,4}, Thiago J. Borges^{1*}, Rodrigo Dornelles¹, Gisele Olinto Libanio Rodrigues³, Michelle Adriane³, Vivian Vasconcelos³, Ana Paula Duarte de Souza², Cristina Bonorino^{1,4}.

1. Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul;
2. Laboratório de Imunologia Clínica e Experimental, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul;
3. Laboratório de Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais;
4. Laboratório de Imunoterapia; Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre & School of Medicine, University of California at San Diego

*Current location: Schuster Family Transplantation Research Center, Renal Division, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, 221 Longwood Ave, Boston, MA, 02115, USA

Corresponding Author:

Rodrigo Benedetti Gassen

Av. Ipiranga, 6690. 2nd floor, Labs 6-8. – São Lucas Hospital – IPB, PUCRS

Porto Alegre, RS – Brazil – 90610-900

Phone: (+55) 51-3320.3000 ext. 2725

Fax: (+55) 51-3320.3312

E-mail: rbgassen@gmail.com

ABSTRACT

The use of immune checkpoint inhibitors (α CTLA-4, α PD-1, α -PD-L1 or their combination) enhances anti-tumor immune responses in around 25% of lung and melanoma cancer patients, inducing durable clinical benefits. The mechanism to this response is linked to the recovery of anti-tumor functions by exhausted T cells expressing PD-1. In tumors, PD-1 is also expressed on innate cells, mainly dendritic cells (DC) and macrophages. The role of PD-1 in tumor DC is still unexplored.

DCs are the link between innate and adaptive immunity, and the different subsets of DCs have highly specialized functions, inducing diverse types of immune responses. In this study, we investigated the effect of α PD-1 treatment in DCs using melanoma and lung cancer murine models. In addition to total DCs (CD11c⁺), we evaluated pDCs (CD11c⁺B220⁺), CD11b⁺ DCs (CD11c⁺B220⁻CD11b⁺) and CD103⁺ DCs (CD11c⁺B220⁻CD103⁺). In all subsets, PD-1⁺ DCs from tumor and tumor draining lymph nodes had less expression of MHC II and CD86. α PD-1 treatment increased the number of intratumoral CD103⁺ DCs, as well as MHCII expression in blood CD103⁺ DCs and all intratumoral DCs subsets. As expected, α PD-1 increased T cells response in B6 mice leading to decrease of tumor volume and weight. In NSG mice there was still a trend, however the difference was non significant. α PD-1 treatment also decreased death by apoptosis and increased ERK1/2 phosphorylation in TDLN DCs of tumor-bearing mice, improving their capacity to elicit antigen-specific T cell proliferation. These results indicate that α PD-1 treatment can affect not only T cells but also subpopulations of DCs. Our data provide information that may be useful to predict early responses to α PD-1 immunotherapy.

.

Key words: Dendritic cells, α PD-1 treatment, dendritic cell subsets

Count: 267 words

INTRODUCTION

The chronicity of cancer provides constant antigen exposure to T cells, leading to cellular exhaustion, mainly associated with the cell surface bound molecules Programed death 1 (PD-1). PD-1 is expressed in activated T cells, natural killer T cells (NKT), B cells, monocytes and some populations of dendritic cells (DCs) (Nishimura et al., 1996). PD-1 expression can affect cell differentiation and survival, inhibiting directly activation of CD28 or indirectly by IL-2. Both CD28 and IL-2 promote cell expansion and survival through anti-apoptotic effects, cell cycle modulation and cytokine secretion (O'Donnell et al., 2017). PD-L1 and PD-L2 are the ligands to PD-1 and this interactions also reduces AKT phosphorylation in T cells and ERK phosphorylation in B cells (Okazaki and Honjo, 2006). PD-L1 are highly expressed in tumor cells, however, can be expressed in immune cells like B cells, DCs, macrophages, mesenchymal stem cells and bone marrow derived mast cells (Yamazaki et al., 2002). PD-1/PD-L1 blockade with monoclonal antibody has being successful used in the clinic mainly in patients with metastatic melanoma (Mahoney et al., 2015; Ott et al., 2013). Likewise, we should not assume that α PD-1 therapy will work exclusively on T cells or as a blocker of the immune synapse.

PD-1 can be expressed in DC, and the function of PD-1 in these cells are not fully elucidated. DCs play a key in the interface with the adaptive immune system by interacting extensively with T cells in the antigen presentation and activation of the memory response (Sharma and Allison, 2015; Steinman et al., 2005). Mice and human studies have shown that DCs are a heterogeneous population composed of several distinct subsets. DC subsets have been initially separated according to their surface phenotype, but recent work has

demonstrated that DC subsets can be further distinguished by their ontogeny and transcriptomic signature (Merad et al., 2013). DCs can be broadly separated into two main groups: plasmacytoid (pDCs) and classical DCs (cDCs) (Lazar, 2003). pDCs accumulate mainly in the blood and lymphoid tissues, in one had express low levels of major histocompatibility complex class II (MHC II) and costimulatory molecules, in the other hand express high levels of Toll-like receptors (TLRs) 7 and 9 and are capable to produce massive amounts of type I IFN (Merad et al., 2013). The cDCs are subdivided in different subsets. We analyzed two phenotypes of cDCs that are involved in anti-tumor immune response: CD103+ and CD11b+ DCs. Migratory CD103+ DCs are the most connective to tissues and had previously been shown to transport antigenic material from malignant lesions to tumor-draining lymph nodes (TDLN) and potently cross-prime tumor-targeting T cells, leading to rejection of highly immunogenic tumors (Vanpouille-Box and Galluzzi, 2017). CD11b+ DCs are mainly associated to the intratumoral increase of T regulatory cells (Okita et al., 2014). In addition, PD-1 expression can be upregulated in DCs in the presence of various inflammatory stimuli and deficient PD-1 DCs have been shown to have a greater capacity to respond to *Listeria monocytogenes* infections in mice (Yao et al., 2009). However, the role of PD-1 in DCs subsets in the tumor and how PD-1 blockade activates these cells populations remains unknow.

In this study, we have shown that treatment with α PD-1 reduced tumor grows in B6 mice and increased numbers and proliferation of T cells in TDLN, blood and tumor. The anti-tumor effect was abrogated in NSG, given the necessity of a functional T cell response. The tumor presence increased PD-1 expression in all DCs subsets analyzed and PD-1⁺ DCs were characterized as an “exhaustion like”

phenotype. In addition, treatment modulates mainly CD103⁺ migratory DCs in both tumors, B16 and LL/2, as well as increase DCs survival in TDLN, increase MHC II expression and the capacity to elicited antigen-specific T cell response. These results indicate that α PD-1 treatment can affect not only T cells but also subpopulations of DCs. This can be observed in the blood, providing information that may be useful to predict early responses to this immunotherapeutic.

MATERIALS AND METHODS

Mice

C57BL/6 (B6) female mice (six to ten-weeks old) were purchased from Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CeMBE) – PUCRS. OT II and Nod Scid Gamma (NSG) mice were respectively gently providing by Dr. Prof. Niels Olsen Saraiva Camara from São Paulo University (USP) and Dra. Vivian Vasconcelos from Minas Gerais Federal University (UFMG). Mice were bred and housed under pathogen-free conditions at CeMBE animal facility (PUCRS, Brazil) with *ad libitum* access to food and water. In all procedures, mice were anesthetized intraperitoneally with 100 μ l volume of PBS 34% ketamine (50mg/ml) (Cristália) and 16% Xilazine (20mg/ml) (Syntec). All procedures were previously reviewed and approved by the Ethics Committee for the Use of Animals of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEUA-PUCRS), under protocol ID CEUA 13/00379.

Tumor and treatments

B16F10 melanoma (ATTC CRL-6475) and LL/2 lung cancer cells (ATCC CRL-1642) were cultured in complete DMEM media (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Cultilab). The culture was maintained at 37°C with 5% of CO₂ atmosphere. Fur at the site of injections was removed with Veet® (Reckitt Benckiser). Mice were inoculated subcutaneously with 1 x 10⁶ of tumor cells in the right thigh diluted in 100µl of phosphate-buffered saline (PBS) 1x. After 3 days of tumor growth, 200µg/mice of IgG isotype control (Bio X Cell) or anti-mPD-1 (clone RMP1-14; Bio X Cell), were injected intraperitoneally at day 3, 6 and 9 post tumor inoculation (Curran et al., 2010). Tumor growth was evaluated using a digital caliper (Mitutoyo) every 3 days. Tumor volume was calculated using the following formula: Volume (mm³) = (longest diameter) x (shortest diameter)²/2 (Tomayko and Reynolds, 1989). Mice were euthanized on day 7 and 15 after tumor injection. Blood, tumor and tumor-draining lymph nodes (TDLN) were collected. Red blood cells were lysed with BD FACS Lysing solution (BD Biosciences). Tumors were dissected and weighed on a digital scale. Tumors and tumor-draining lymph nodes digested with collagenase D (Roche), cells counted and stained for flow cytometry.

Flow cytometry

Cell suspensions from tumors, blood and tumor draining lymph nodes were blocked for Fc receptors (using 50uL of 24G2 hybridoma cell supernatant supplemented with 10% mouse serum and 10% rat serum) for 20 minutes on ice, and cells were subsequently stained for viability (Fixable Viability Dye from eBioscience). Cells were then stained for 30 minutes on ice with antibodies specific for CD45 (RUO), CD11c (N418), CD11b (M1-70), MHC II (AF6-120.1),

B220 (RA3-6B2), CD103 (M290), CD4 (RM4-5), CD8a (53-36.7) and CD86 (GL1), each conjugated to a different fluorochrome. Intracellular staining for pERK1/2 (20A), p38 (36p38), pAKT (M89-61) and Ki67 (SolA15), was performed using Transcription Factor Buffer Set (BD Biosciences), according to manufacturer's instructions. Cells were acquired on FACSCanto II (BD Biosciences) and BD FACSDiva software (BD Biosciences). Data obtained were analyzed using Flowjo software (version 10, TreeStar).

CFSE *in vitro* assay

TDLN single cell suspensions from mice-bearing B16 tumor treated with aPD-1 or IgG control, were used to purify DCs using magnetic beads coated with anti-CD11c according the manufacturer's protocol (Milteniy Biotec). Purify DCs were overnight culture in 96 well plate with 0,1µg of OVA (with or without 20 ng LPS) and in the next day coculture in a 1:10 ratio (DC: T cell) for four days with T cells (stained with CFSE) purified with Pan T cell (Milteniy Biotec) from OT II mice. The data was assessed by flow cytometry.

Statistical Analysis

The One-Way ANOVA test was used to compare difference among tumor groups and also among treated groups. Multiple comparisons among levels were checked with Tukey's post-test Statistical analysis and graphs were performed using Graphpad Prism version 6.0 (GraphPad Software). Value of $P < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

α PD-1 treatment reduces B16 and LL/2 tumor only in B6 mice.

Given the capacity of immune check point blocked antibodies treatment induce activation of immune cells in tumor microenvironment and trying to understand the necessity of adaptative immune response in this context. We implant tumor two tumors line cells (LL/2 and B16F10) in two mice strains, C57BL/6 (B6) and the immune compromised Nod Scid Gamma (NSG). The LL/2 and B16-bearing mice were treated with α PD-1 antibody or IgG control in early time points (days 3, 6 and 9 after tumor injection) (Fig 1. A). In B6 mice, B16-bearing mice treated with α PD-1 shown a reduce in tumor volume (Fig 1. B) and weight (Fig 1. C) in day 15 after tumor injection, different from NSG. The same occurred in LL/2-bearing mice, only the B6 strain treated with α PD-1 shown a reduction of tumor volume (Fig 1. D) and weight (Fig 1. E). In addition, CD45⁺ cells were increased in tumor microenvironment after α PD-1 treatment in B16-bearing B6 mice (Supplementary figure 1). These results confirm the anti-tumor potential and immunomodulatory proprieties of α PD-1 treatment and the necessity of adaptative immune cells to the response.

α PD-1 treatment induces CD4⁺ and CD8⁺ T cell proliferation in TDLN, blood and tumor.

Because T cells are the major target of α PD-1 therapy, we compared the immunomodulation proprieties of α PD-1 treatment to IgG control and analyzed the capacity of the treatment to increase the numbers and proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Supplementary Fig. 2 and 3) in TDLN, blood and tumor. In

TDLN, the treatment decreases the numbers of CD4⁺ T cells and CD8⁺Ki67⁺ T cells in day 7 after tumor injection, however, increase CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺Ki67⁺ and CD8⁺Ki67⁺ T cells in day 15. In blood, there was a decrease in CD8⁺Ki67⁺ T cell in day 7 and an increase in CD4⁺Ki67⁺ T cell in day 15. In tumor, the treatment also increases CD8⁺Ki67⁺ T cell in day 7 and CD4⁺Ki67⁺, CD8⁺ and CD8⁺Ki67⁺ T cell in day 7 and 15 after tumor injection. The analysis of NSG mice was not performed given the lack in adaptive immune response of this mice strain. These data confirm that αPD-1 therapy was able to increase T cells proliferation in TDLN and tumor, in addition increase proliferation of CD4⁺ T cell in blood periphery.

B16 tumor lead to PD-1 expression in dendritic cell subsets.

In the context of chronic infection and tumor, PD-1 upregulation by activation signals and pro-inflammatory cytokines has been demonstrated in DC, T and B cell and is already known to have a negative role in function and survival. We also observed PD-1 expression in T cells from B16-bearing mice (Supplementary Fig.4). However, the capacity of PD-1 upregulation in DCs subsets by the tumor presence is not fully elucidated. To answer this question we analyzed lymph node from naïve mice and compared the expression of PD-1 to tumor draining lymph node of a B16-bearing mice in different DCs subsets. We measured PD-1 expression in total DCs (CD11c⁺), pDCs (CD11c⁺B220⁺), CD11b⁺ DCs (CD11c⁺ B220⁻CD11b⁺ CD103⁻) and CD103⁺ DCs (CD11c⁺ B220⁻CD11b⁻ CD103⁺). Gate strategy can be seen in Supplementary Fig. 4. The data shown that tumor presence was able to upregulate PD-1 expression in almost all DCs subset, except in CD11b⁺ DCs (Fig. 2 A and B).

Tumor-infiltrating PD-1⁺ DCs express less CD86 and MHC II compared to PD-1⁻ DCs.

Beyond its role as a marker of T cells exhaustion, we hypothesized that PD-1 expression could affect DCs activation by limiting effector functions, analogous to the role it plays in the inhibition of stimulated T cells. To test this hypothesis, we analyzed the expression of two major markers of DCs activity, CD86 and MHC II. In TDLN, DCs PD-1⁺ showed less expression of MHC II compared to PD-1⁻ DCs (Fig. 3 A). In addition, more pronounced responses occurred inside of the tumor, DCs PD-1⁺ decreased the expression of both CD86 and MHC II (Fig. 3 B). Taking together, this result shown that PD-1 expression caused by tumor presence decreased the activation profile of DCs.

αPD-1 treatment modulates dendritic cell subsets in TDLN, blood and tumor in melanoma and lung cancer tumor.

PD-1 upregulation in DCs has been demonstrated in different models, like bacterial infection and cancer. However how anti-PD1 treatment interfere with the DCs subsets numbers in TDLN, blood and tumor in LL/2 and B16-bearing mouse are not fully elucidated. In B16 melanoma model, we observed an increase of CD103⁺ DCs in blood (Fig 4. B) and in tumor (Fig 4. C) in day 15 of treated mice. Moreover, in lung cancer tumor we saw an increase of total DCs and CD11b⁺ DCs in TDLN (Fig 5. A), increase in total DCs and pDCs in blood (Fig 5. B) and increase in CD103⁺ DCs in tumor (Fig 5. C). These results highlight the immunogenicity of LL/2 model over B16 model and suggest that ant-PD-1

treatment modulated not only T cells numbers, but also DCs subsets in blood, TDLN and tumor.

α PD-1 treatment increase MHC II in CD103⁺ DCs in blood and all dendritic cell subsets in B16 tumor

To determinate if α PD-1 treatment can increase DCs subsets activation, we analyzed the expression of MHC II in day 7 after tumor injection. The mice treated with α PD-1 showed a decrease of MHC II MFI in CD11b⁺ and CD103⁺ DCs in TDLN (Fig.6 A), nevertheless, we also observed an increase in CD103⁺ DCs in blood (Fig.6 B) and in all DCs subsets analyzed in tumor (Total DCs, CD11b⁺, CD103⁺ and pDCs) (Fig.6 C).

Dendritic cells from mice-bearing tumor treated with α PD-1 increase survival and capacity to stimulate T cells.

The lack of PD-1 in DCs has been associated with more cell functions. We observed that DCs (unless CD11b⁺ DCs) increase survival (Fig 7. A and B) and total DCs increase phosphorylation of ERK1/2 (Fig 7. C) in TDLN of B16-bearing mice treated with α PD-1. In addition, to investigate the DCs capacity to stimulated T cells, we pulsed OVA in TDLN DCs from B16-bearing mice treated or not with α PD-1 and cocultured with OT II T cells. Our data shown that DCs derived from treated mice and *in vitro* stimulated with LPS induced more proliferation of OT II T cells (Fig 7. D and E). In conclusion, treatment with α PD-1 increase the survival and functions of DCs and elicited antigen-specific T cell response to a great degree that not treated mice.

DISCUSSION AND CONCLUSION

Immune surveillance suggests that cells and tissues are constantly monitored by the immune system, which is responsible for recognizing and eliminating most cancer cells and emerging tumors (Hanahan and Weinberg, 2011). Though tumor cells had different mechanisms to escape from immunosurveillance, one of that is inducing tolerance. There are different tolerance forms, including regulatory cells (T regulatory cells, M2 macrophages, and myeloid-derived suppressor cells), immunosuppressive cytokines (IL-10 and TGF- β) and surface molecules, such as PD-1, that can reduce immune responses inducing exhaustion (Topalian et al., 2016).

The negative role of PD-1 in modulate T cells has been constantly studied in diversified models, such as tumors, and the anti-tumor mechanism of PD-1 blockaded has centered in reactivation of T cells functions. In T cells, PD-1 is expressed after activation (Nishimura et al., 1996). Exhausted T cell in the tumor microenvironment is known to express the inhibitor receptor PD-1. PD-1:PD-L1/2 binding inhibits the activity of PI3K and consequently of AKT (Parsa et al., 2007). α PD-1 in the clinic was already a strategy for metastatic melanoma tumor patients. Though the successful effects only occur in 25% of these patients, and why the others 75% do not respond has not been elucidated.

Our results showed that lung cancer and melanoma-bearing B6 mice treated with α PD-1 had a reduction of tumor in day 15 after tumor injection and rapid recruitment of CD45⁺ cells in tumor microenvironment. In addition, treatment increase CD4⁺ and CD8⁺ T cells numbers and proliferation capacity in TDLN, blood, and tumor. In contrast, the same not occurred in NSG mice, this data

corroborate with Lin et al results that demonstrated the necessity of an intact immune response to the immune checkpoint blockade successful. Additionally, Lin also showed in ovarian cancer and melanoma patients that PD-L1 expression on DCs correlated with the efficacy of treatment with either anti-PD-1 alone or in combination with anti-CTLA-4 (Lin et al., 2018). PD-1 can also be expressed in B cells, NK cells, activated monocytes and dendritic cells (Nishimura et al., 1996). Dendritic cells are the keys to a successful adaptative immune response and have been already demonstrated that effective α PD-1 anti-tumoral activity needs the crosstalk of DCs with T cells by the secretion of IL-12 and IFN- γ (Garris et al., 2018). Because of this, the activation and functions of DCs should be tightly controlled. Different from T cell, that PD-1 was induced by TCR triggering (Carter et al., 2002), DCs need TLR signals (Park et al., 2014). We first shown that DCs in TDLN from B16-bearing mice had an increase in PD-1 expression compared to *naïve* mice, showing that the presence of signals from tumor microenvironment can modulate not only PD-1 expression in DCs and T cells from tumor but also in TDLN, given the idea that de treatment with α PD-1 can modulate these cells outside of tumor. PD-1⁺ DCs from TDLN and tumor shown less expression of activation markers; reduced expression of CD86 and MHC II compared to PD-1⁻ DCs. DCs that lack PD-1 expression has been shown to have a greater capacity to respond to infections, like *Listeria monocytogenes* infections in mice (Yao et al., 2009). Similar to what we were observed in DCs, Gordon et al showed in macrophages, demonstrating that both mouse and human tumor macrophage express high levels of PD-1 and that PD-1 correlates with decreased of macrophage function, like phagocytosis (Gordon et al., 2017).

After that, we have shown that α PD-1 modulated the numbers and activation of dendritic cells subsets in TDLN, blood, and tumor. We observed an increase of CD11b⁺ DCs and pDCs in TDLN in treated mice and an increase in numbers of total DCs and pDCs in the tumor. Moreover, in our B16 model, CD103⁺ migratory DC in blood had more expression of MHC II in treated mice than IgG control as well as in all DCs subsets analyzed in the tumor. In addition, DCs (unless CD11b⁺ DCs) increase survival in TDLN of B16-bearing mouse treated with α PD-1. Taken together, these results suggest that α PD-1 treatment can modulate DCs subsets *in vivo*, leading to increased survival and MHC II expression and consecutiveness T cell activation and tumor regression. In addition, adoptive transfer PD-1 deficient DCs increase OVA-specific T CD8⁺ cell response and perforin and granzyme B production in Hepa 1-6 murine tumor model leading to tumor reduction (Lim et al., 2016). We also showed that DCs derived from treated mice and *in vitro* stimulated with OVA and LPS induced more proliferation of OT II T cells, highlighting the α PD-1 capacity to activate DCs leading to T cells stimulation. In conclusion, we provide the first evidence that tumor presence was able to upregulate PD-1 expression in almost all DCs subset, unless CD11b⁺ DCs and it is responsible for a DC exhaustion-like profile. α PD-1 treatment modulated not only T cell numbers but also DCs subsets in TDLN, blood, and tumor, increase DCs survival and functions and elicited antigen-specific T cell response to a great degree that not treated mice.

REFERENCES

- Carter, L.L., Fouser, L.A., Jussif, J., Fitz, L., Deng, B., Wood, C.R., Collins, M., Honjo, T., Freeman, G.J., and Carreno, B.M. (2002). PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4⁺ and CD8⁺ T cells and is overcome by IL-2. *Eur. J. Immunol.* 32, 634–643.
- Curran, M.A., Montalvo, W., Yagita, H., and Allison, J.P. (2010). PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 4275–4280.
- Garris, C.S., Arlauckas, S.P., Kohler, R.H., Trefny, M.P., Garren, S., Piot, C., Engblom, C., Pfirschke, C., Siwicki, M., Gungabeesoon, J., et al. (2018). Successful APD-1 Cancer Immunotherapy Requires T Cell-Dendritic Cell Crosstalk Involving the Cytokines IFN- γ and IL-12. *Immunity* 1–14.
- Gordon, S.R., Maute, R.L., Dulken, B.W., Hutter, G., George, B.M., McCracken, M.N., Gupta, R., Tsai, J.M., Sinha, R., Corey, D., et al. (2017). PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature* 545, 495–499.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Lazar, T. (2003). Dendritic Cell Protocols. *Vaccine* 21, 1300–1301.
- Lim, T.S., Chew, V., Sieow, J.L., Goh, S., Yeong, J.P.-S., Soon, A.L., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2016). PD-1 expression on dendritic cells suppresses CD8⁺ T cell function and antitumor immunity. *Oncoimmunology* 5, e1085146.
- Lin, H., Kryczek, I., Zou, W., Lin, H., Wei, S., Hurt, E.M., Green, M.D., Zhao, L., Vatan, L., Szeliga, W., et al. (2018). Host expression of PD-L1 determines

efficacy of PD-L1 pathway blockade – mediated tumor regression Find the latest version : Host expression of PD-L1 determines efficacy of PD-L1 pathway blockade – mediated tumor regression. *J. Clin. Invest.* 128, 805–815.

Mahoney, K.M., Freeman, G.J., and McDermott, D.F. (2015). The Next Immune-Checkpoint Inhibitors: PD-1/PD-L1 Blockade in Melanoma. *Clin. Ther.* 37, 764–782.

Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., and Mortha, A. (2013). The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 563–604.

Nishimura, H., Agata, Y., Kawasaki, A., Sato, M., Imamura, S., Minato, N., Yagita, H., Nakano, T., and Honjo, T. (1996). Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative(CD4⁻ CD8⁻) thymocytes. *Int. Immunol.* 8, 773–780.

O'Donnell, J.S., Smyth, M.J., and Teng, M.W.L. (2017). PD1 functions by inhibiting CD28-mediated co-stimulation. *Clin. Transl. Immunol.* 6, e138-3.

Okazaki, T., and Honjo, T. (2006). The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol.* 27, 195–201.

Okita, Y., Tanaka, H., Ohira, M., Muguruma, K., Kubo, N., Watanabe, M., Fukushima, W., and Hirakawa, K. (2014). Role of tumor-infiltrating CD11b⁺ antigen-presenting cells in the progression of gastric cancer. *J. Surg. Res.* 186, 192–200.

Ott, P. a, Hodi, F.S., and Robert, C. (2013). CTLA-4 and PD-1/PD-L1 blockade: new immunotherapeutic modalities with durable clinical benefit in melanoma patients. *Clin. Cancer Res.* 19, 5300–5309.

Park, S.J., Namkoong, H., Doh, J., Choi, J.-C., Yang, B.-G., Park, Y., and Chul

Sung, Y. (2014). Negative role of inducible PD-1 on survival of activated dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 95, 621–629.

Parsa, A.T., Waldron, J.S., Panner, A., Crane, C.A., Parney, I.F., Barry, J.J., Cachola, K.E., Murray, J.C., Tihan, T., Jensen, M.C., et al. (2007). Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat. Med.* 13, 84–88.

Sharma, P., and Allison, J.P. (2015). Immune checkpoint targeting in cancer therapy: Toward combination strategies with curative potential. *Cell* 161, 205–214.

Steinman, R.M., Bonifaz, L., Fujii, S., Liu, K., Bonnyay, D., Yamazaki, S., Pack, M., Hawiger, D., Iyoda, T., Inaba, K., et al. (2005). The innate functions of dendritic cells in peripheral lymphoid tissues. *Adv. Exp. Med. Biol.* 560, 83–97.

Tomayko, M.M., and Reynolds, C.P. (1989). Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 24, 148–154.

Topalian, S.L., Taube, J.M., Anders, R.A., and Pardoll, D.M. (2016). Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 16, 275–287.

Vanpouille-Box, C., and Galluzzi, L. (2017). CD103+ cells at the forefront of anticancer immunity. *Oncoimmunology* 6.

Yamazaki, T., Akiba, H., Iwai, H., Matsuda, H., Aoki, M., Tanno, Y., Shin, T., Tsuchiya, H., Pardoll, D.M., Okumura, K., et al. (2002). Expression of Programmed Death 1 Ligands by Murine T Cells and APC. *J. Immunol.* 169, 5538–5545.

Yao, S., Wang, S., Zhu, Y., Luo, L., Zhu, G., Flies, S., Xu, H., Ruff, W.,

Broadwater, M., Choi, I.-H., et al. (2009). PD- 1 on dendritic cells impedes innate immunity against bacterial infection. *Blood* 113, 5811.

Figure 1. α PD-1 treatment reduces tumor volume and weight in B6 mice but not in NSG. (A) Experimental design of α PD-1 treatment in B16 melanoma and LL/2 cancer tumor in B6 and NSG mouse. (B) Daily B16 tumor volume reduction in B6 and NSG mice. (C) Day 15 B16 tumor weight reduction in B6 and NSG mice. (D) Daily LL/2 tumor volume reduction in B6 and NSG mice. (E) Day 15 LL/2 tumor weight reduction in B6 and NSG mice. Results are the mean of one representative experiment of three performed. *P <0.05; **P<0.01; ***P<0,001.

Figure 2. B16 tumor lead to PD-1 expression in dendritic cell subsets. (A) Histogram and (B) graph gated in dendritic subsets live cells, showing PD-1 mean fluorescence intensity (MFI) in lymph node of *naïve* mice compared to tumor draining lymph node (TDLN) of 7-day tumor-bearing mice. Results are the mean of one representative experiment of three performed. *P <0.05; **P<0.01; ***P<0,001.

Figure 3. PD-1⁺ DCs in tumor express less CD86 and MHC II compared to PD-1⁻ DCs.

Gate strategy to analyze DCs PD-1⁻ and PD-1⁺, histogram and MFI graph quantification of CD86 and MHC II in TDLN (A) and tumor (B). Results are the mean of one representative experiment of three performed. *P <0.05; **P<0.01; ***P<0,001.

Figure 4. α PD-1 treatment modulates dendritic cell subsets in TDLN, blood and tumor in melanoma. Percentage graph showing modulation of dendritic cell subsets numbers in (A) TDLN, (B) blood and (C) tumor. All data's comparing α PD-1 treated and IgG control group. Results are the mean of one representative experiment of three performed. *P <0.05; **P<0.01; ***P<0,001.

Figure 5. α PD-1 treatment modulates dendritic cell subsets in TDLN, blood and tumor in lung cancer. Percentage graph showing modulation of dendritic cell subsets numbers in (A) TDLN, (B) blood and (C) tumor. All data's comparing α PD-1 treated and IgG control group. Results are the mean of one representative experiment of three performed. *P <0.05; **P<0.01; ***P<0,001.

Figure 6. α PD-1 treatment increase MHC II in blood CD103⁺ DCs and all tumor dendritic cell subsets in melanoma. MFI graph of MHC II in dendritic cell subsets of (A) TDLN, (B) blood and (C) tumor. All data's comparing α PD-1 treated and IgG control group. All data's comparing α PD-1 treated and IgG control group. Results are the mean of one representative experiment of three performed. *P <0.05; **P<0.01; ***P<0,001.

Figure 7. Dendritic cells from mice-bearing B16 tumor treated with α PD-1 had more *in vitro* capacity to stimulate T cells.

Histogram (A) and MFI graph quantification of Annexin-V (B) and histogram of pERK1/2, pATK and p38(C) gated in live CD11c⁺ cells from TDLN of mice-bearing tumor treated with α PD-1 or IgG control. TDLN dendritic cells from mice-bearing tumor treated with α PD-1 or IgG control was purified with CD11c⁺ Beads

column and cocultured with OT II T cell four days before OVA stimulation with or without LPS. (D) Histogram and (E) percentage graph of OTII T cell proliferation by CFSE assay. Results are the mean of one representative experiment of three performed. *P <0.05; **P<0.01; ***P<0,001.

Supplementary figure 1. α PD-1 treatment increase CD45⁺ immune cell in B16 tumor microenvironment. Gated strategy (A) and graph quantification (B) of live CD45⁺ cells in tumor of mice-bearing tumor treated with α PD-1 or IgG control. Results are the mean of one representative experiment of three performed. *P <0.05; **P<0.01; ***P<0,001.

Supplementary figure 2. Gate strategy for T cell analyses.

Supplementary figure 3. α PD-1 treatment induces CD4⁺ and CD8⁺ T cell proliferation in TDLN, blood and tumor. Percentage graph showing increase of numbers and proliferation (Ki67) of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in (A-B) TDLN, (C-D) blood and (E-F) tumor. All data's comparing α PD-1 treated and IgG control group. Results are the mean of one representative experiment of three performed. *P <0.05; **P<0.01; ***P<0,001.

Supplementary figure 4. B16 tumor lead to PD-1 expression in T cell. (A) Histogram and (B) graph gated in T cells (CD3⁺) live cells, showing PD-1 mean fluorescence intensity (MFI) in lymph node of naïve mice compared to tumor draining lymph node (TDLN) of 7-day tumor-bearing mice. Results are the mean

of one representative experiment of three performed. *P <0.05; **P<0.01;
***P<0,001.

Supplementary figure 5. Gate strategy for DCs analyses.

FIGURE 1

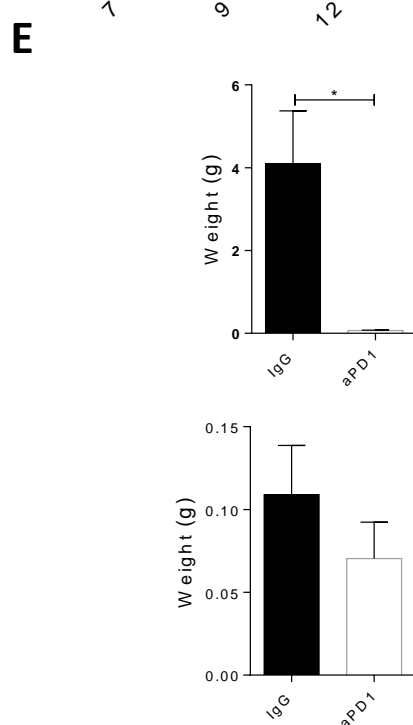
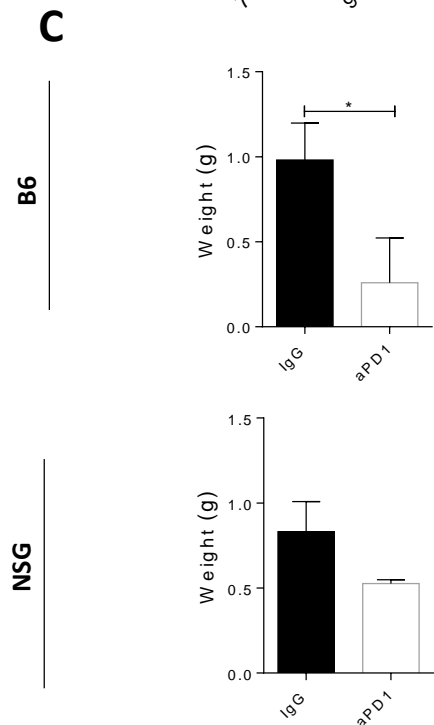
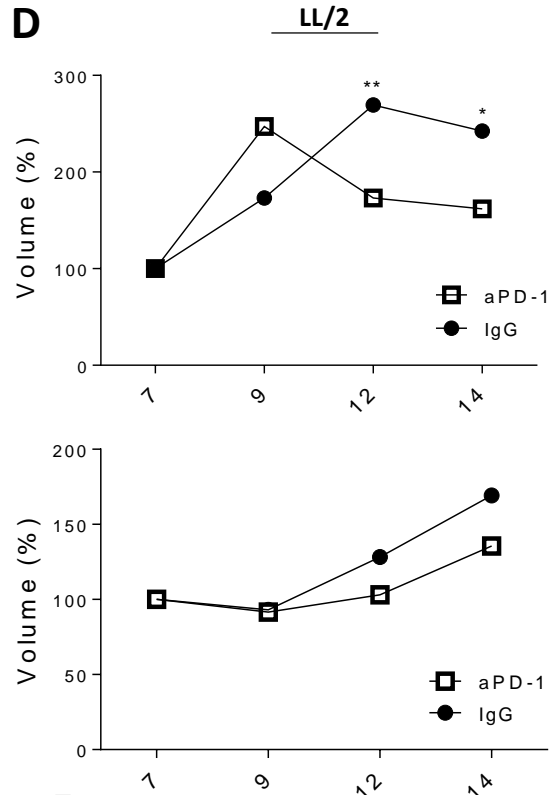
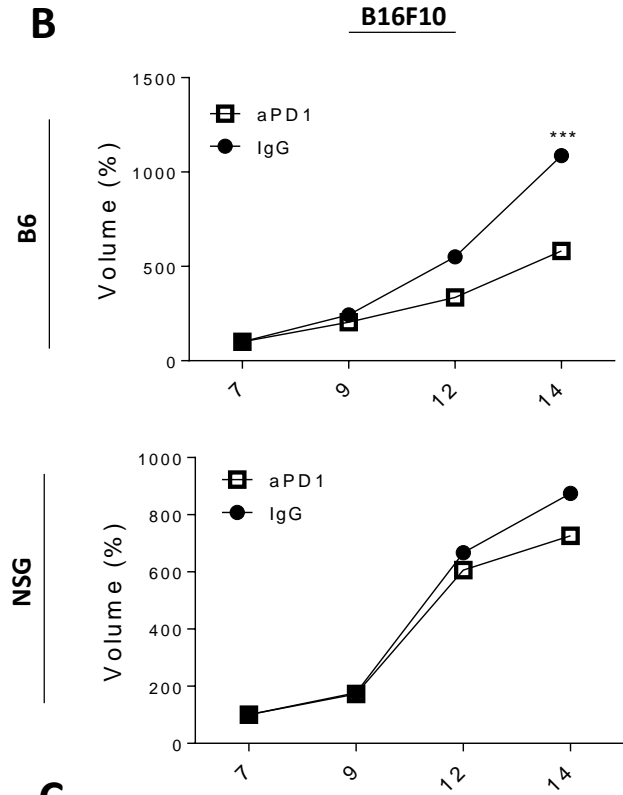
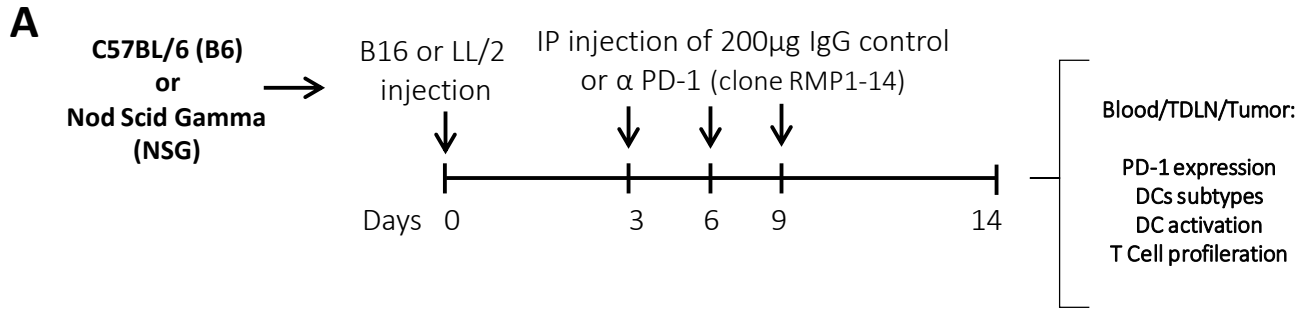


FIGURE 2

Gated in live LN cells

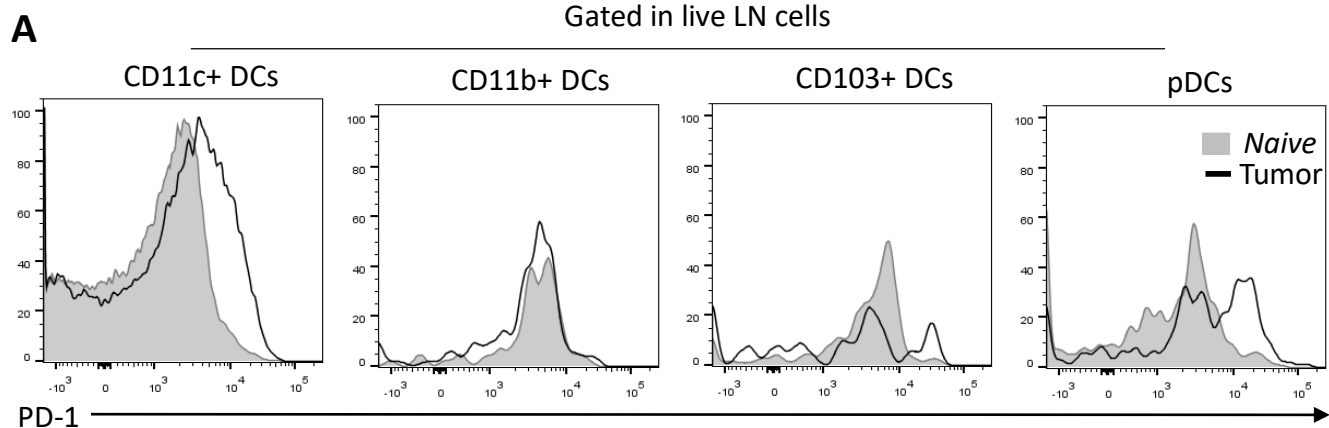
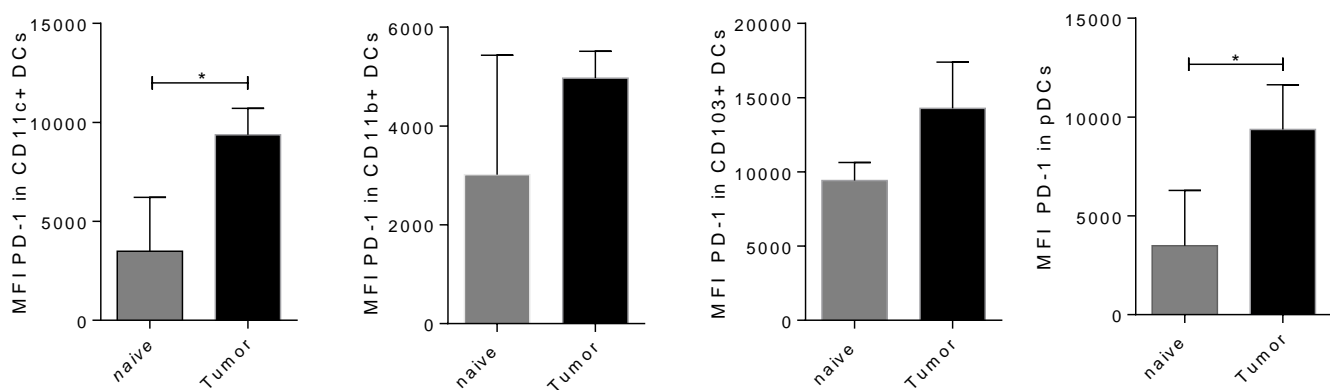
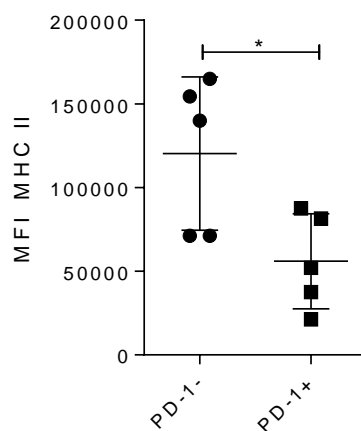
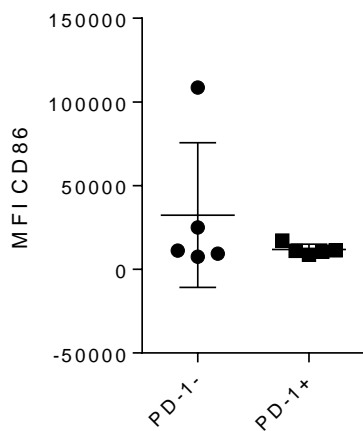
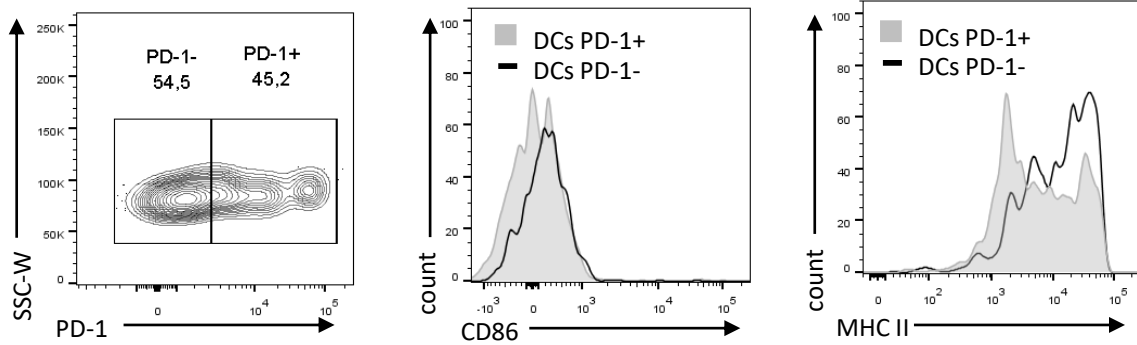
**B**

FIGURE 3

A

Gated in live CD45+CD11c+ cells

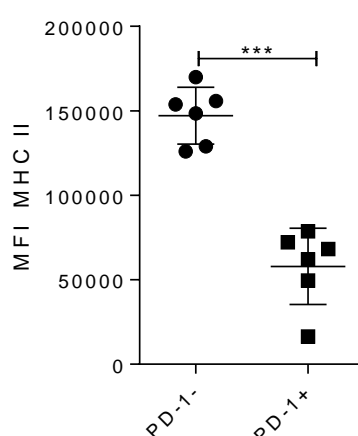
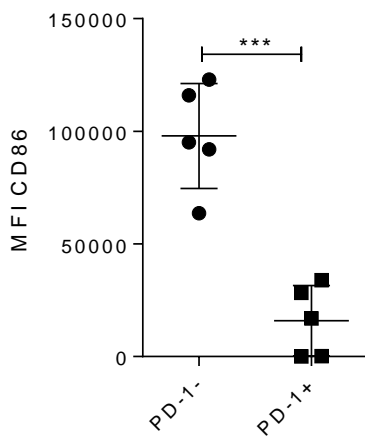
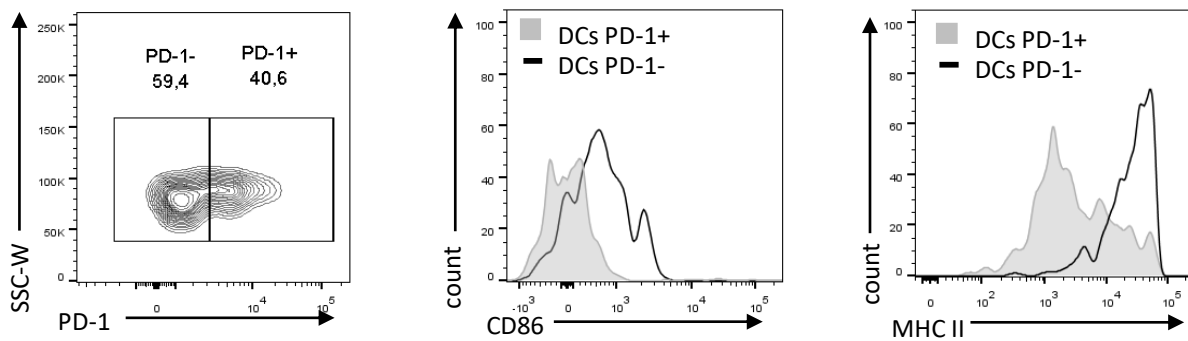


TDLN DCs

TDLN DCs

B

Gated in live CD45+CD11c+ cells



Tumor DCs

Tumor DCs

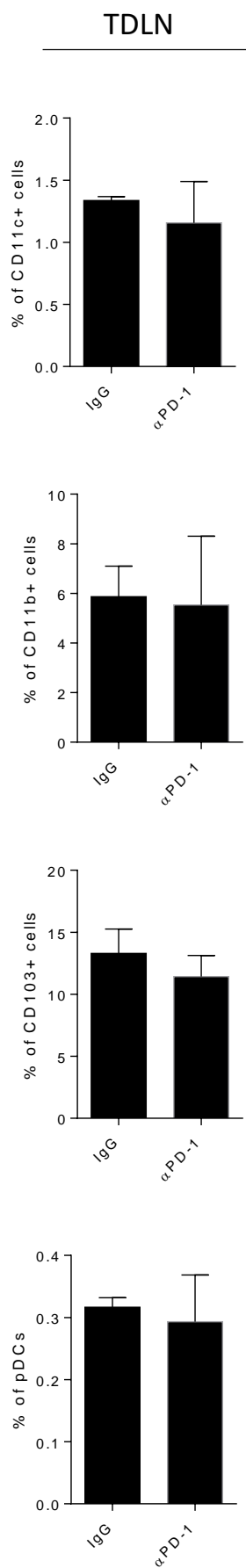
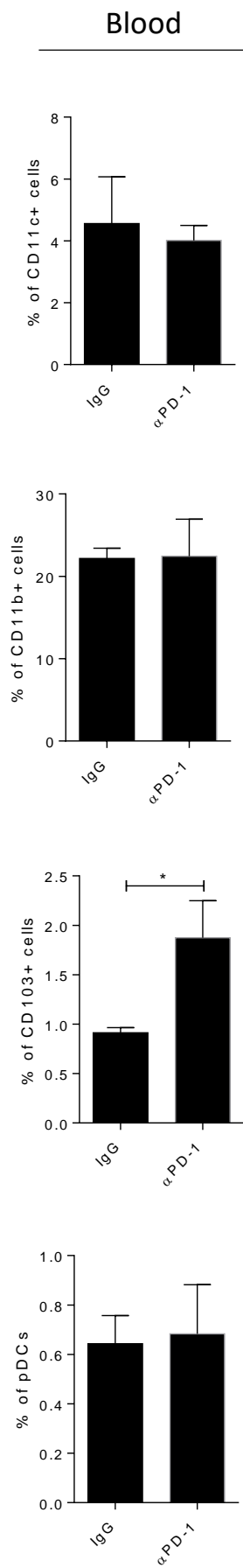
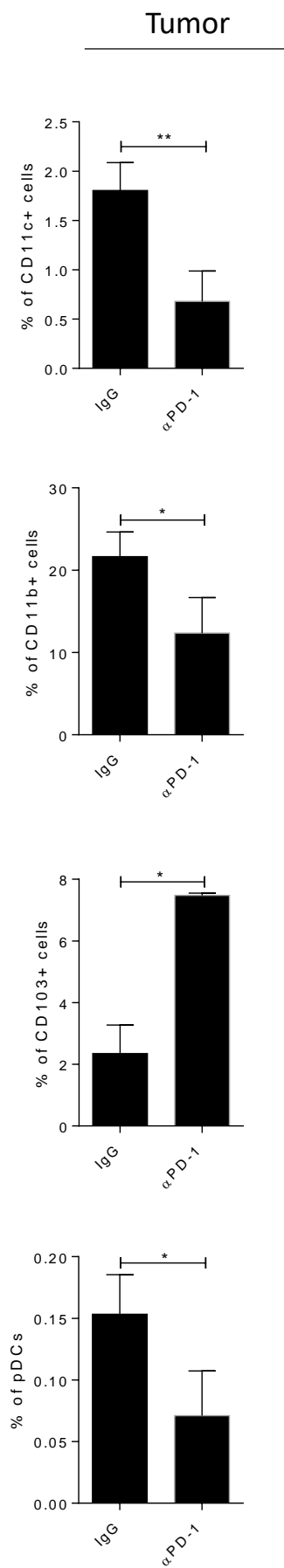
FIGURE 4**A****B****C**

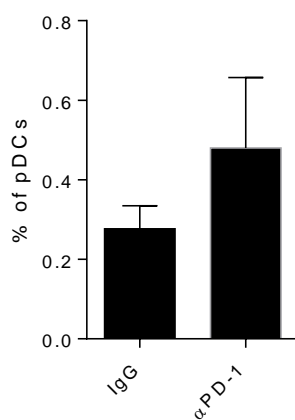
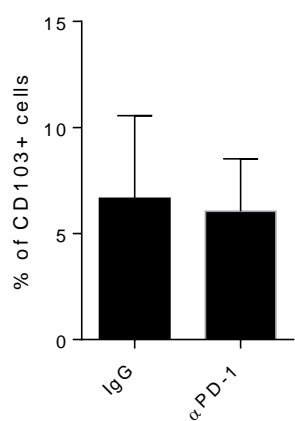
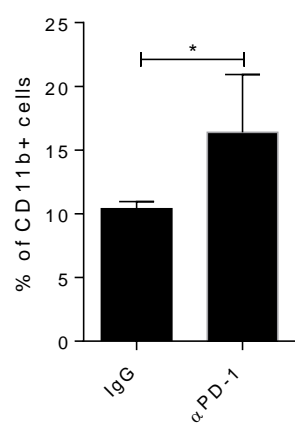
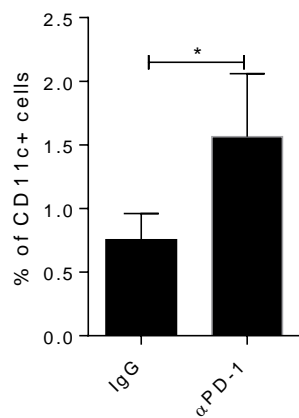
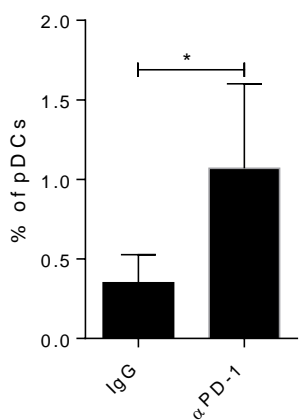
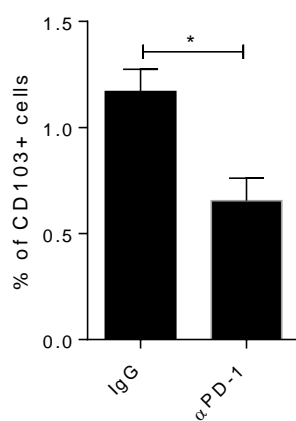
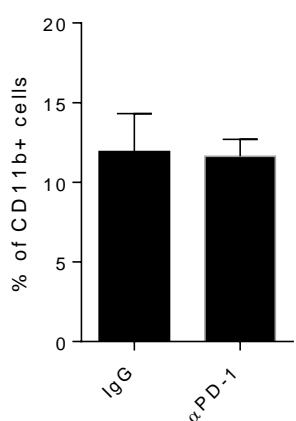
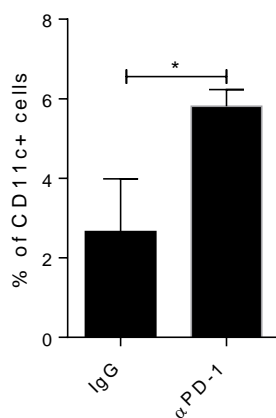
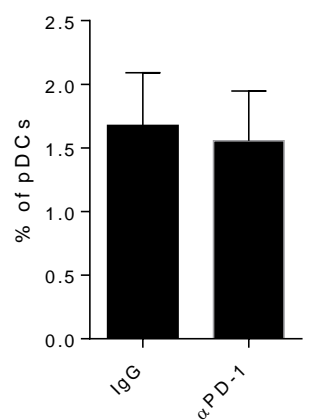
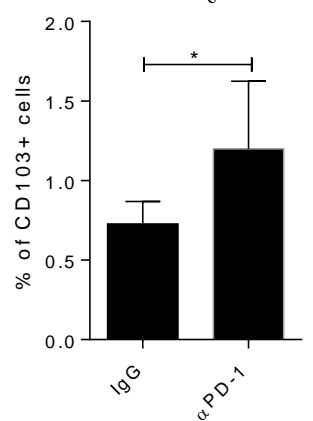
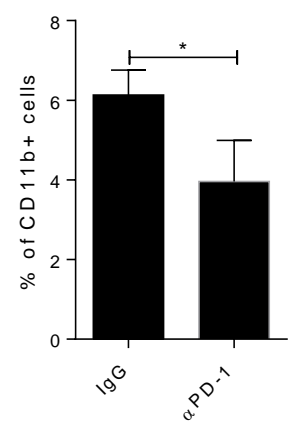
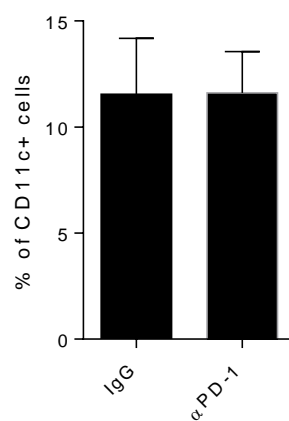
FIGURE 5**A****TDLN****B****Blood****C****Tumor**

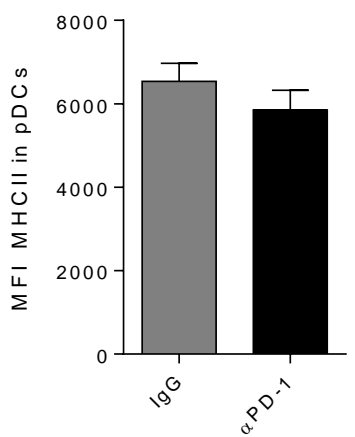
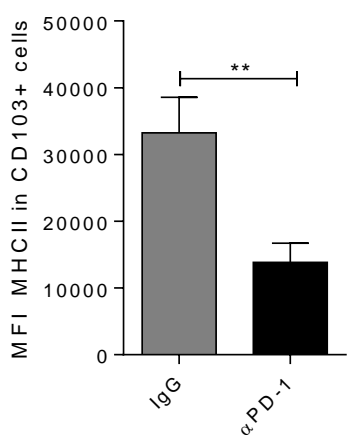
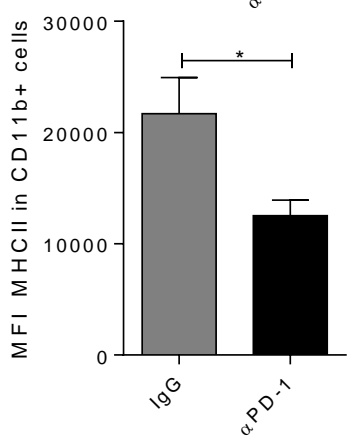
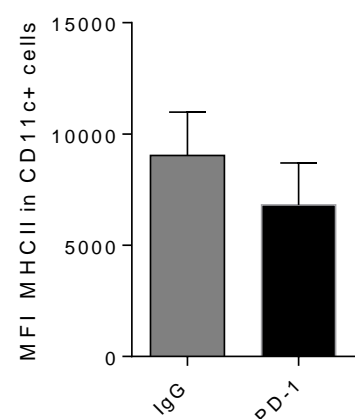
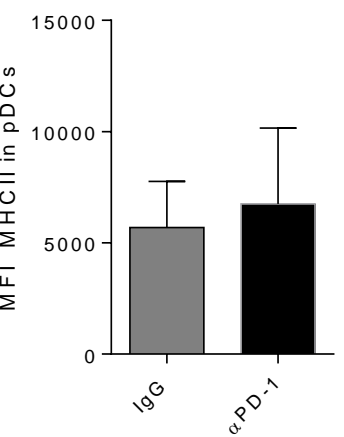
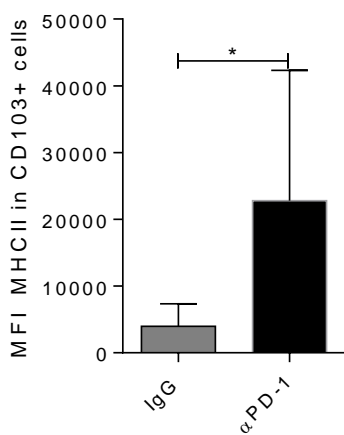
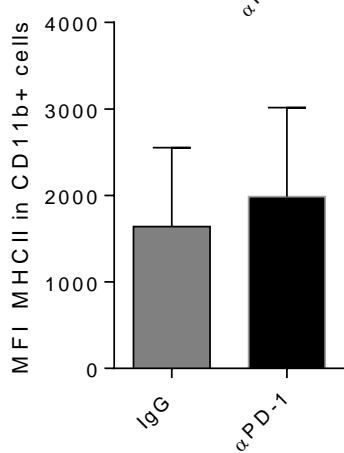
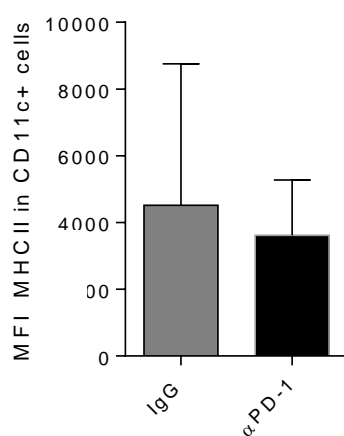
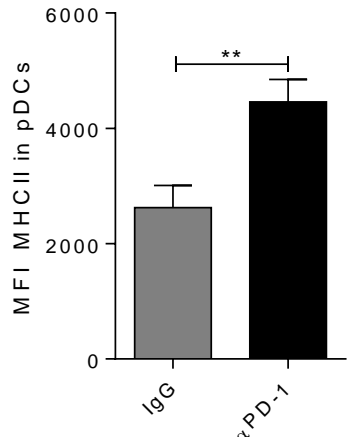
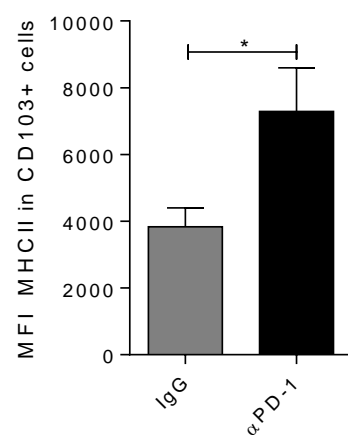
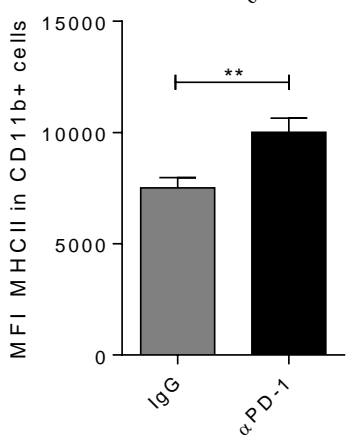
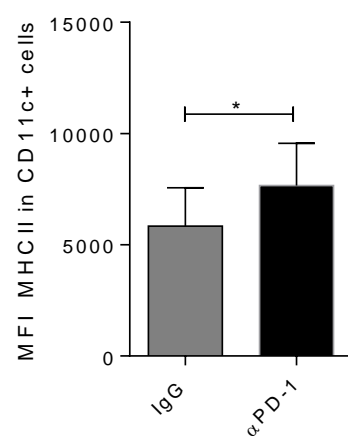
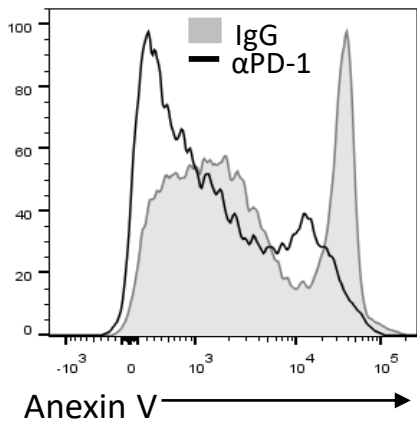
FIGURE 6**A****TDLN****B****Blood****C****Tumor**

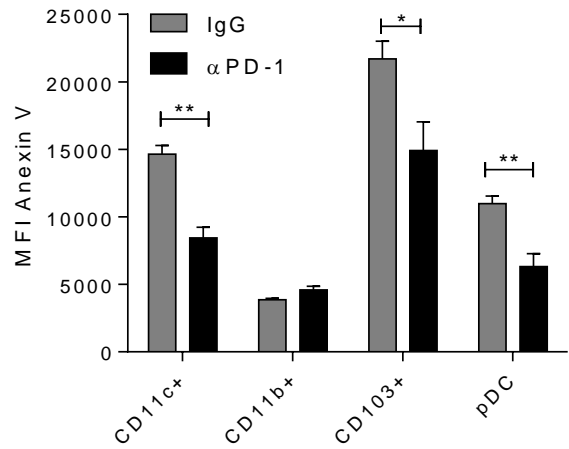
FIGURE 7

A

Gated in CD11c+ cells

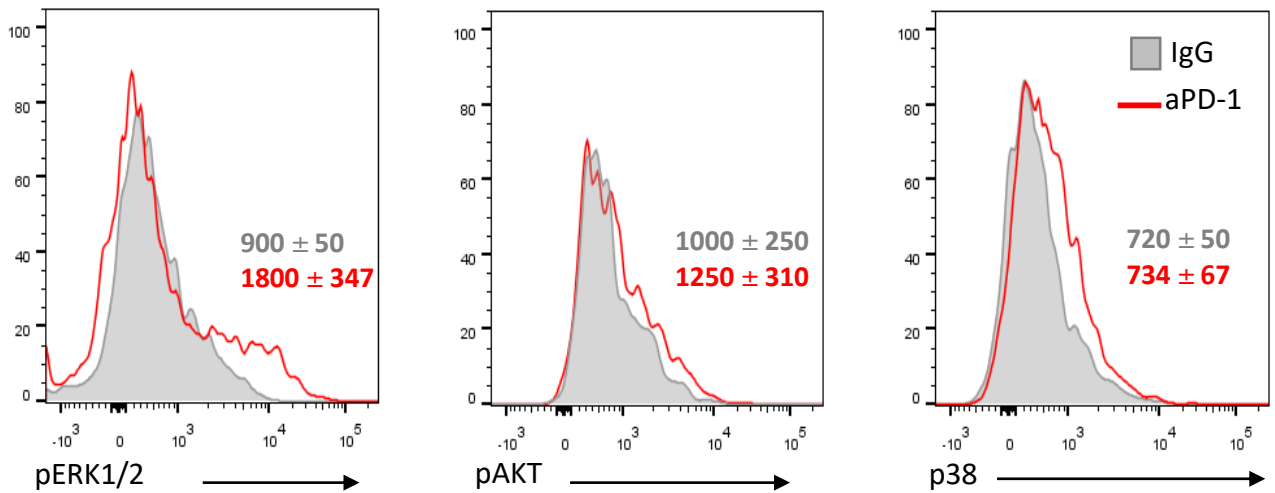


B



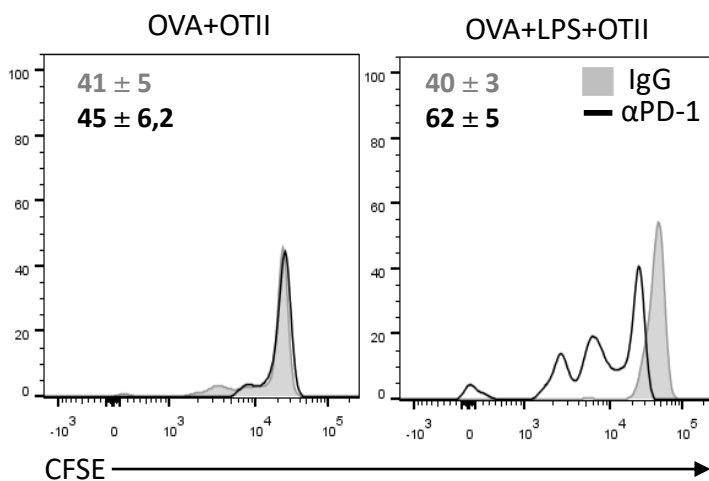
C

Gated in live CD11c+ cells

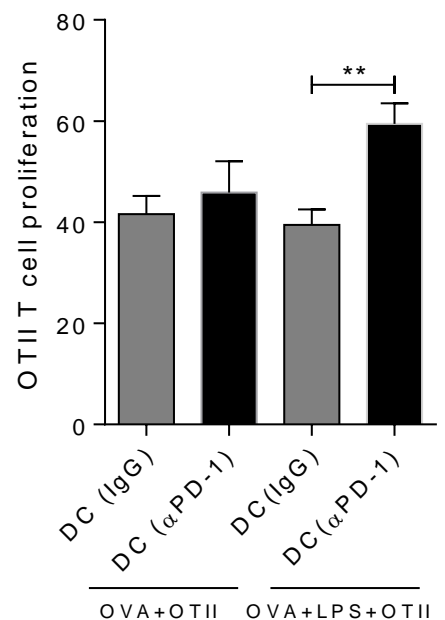


D

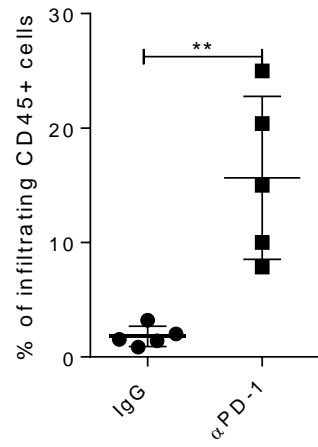
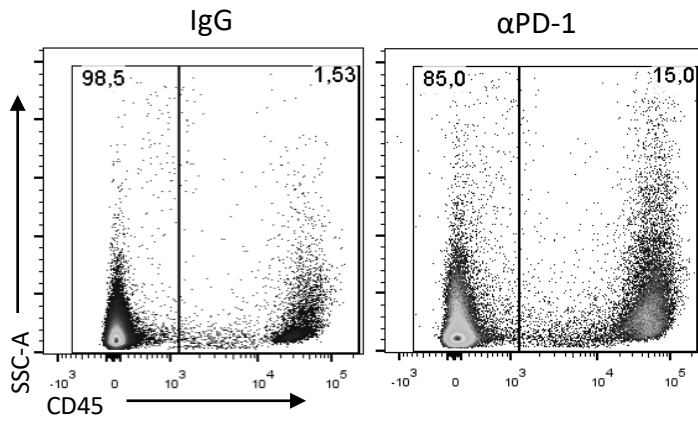
Gated in live CD4+ cells



E

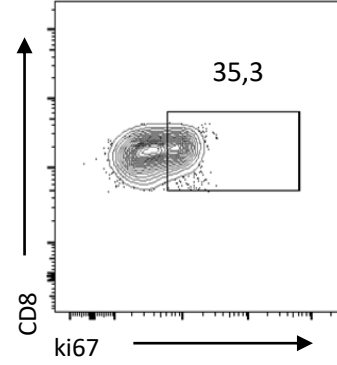
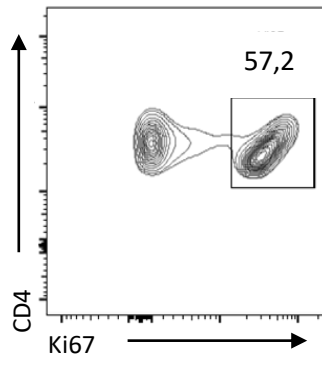
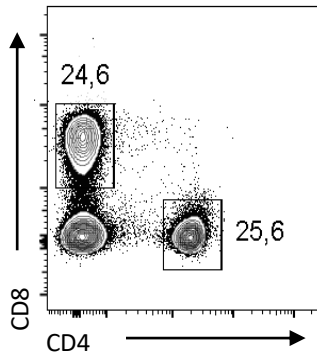


SUPPLEMENTARY FIGURE 1



SUPPLEMENTARY FIGURE 2

Gated in live CD45+ cells



SUPPLEMENTARY FIGURE 3

TDLN

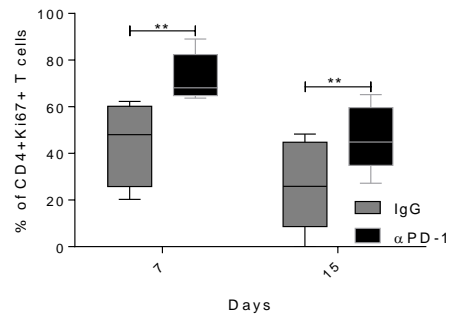
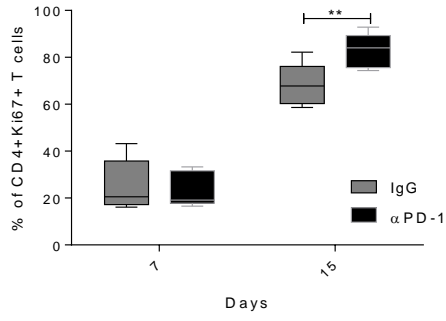
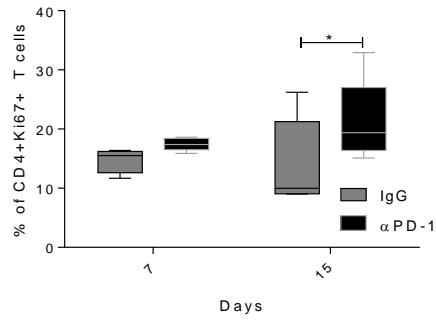
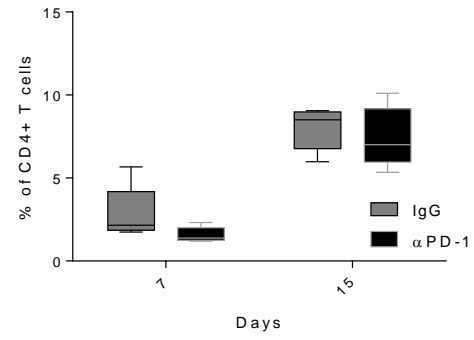
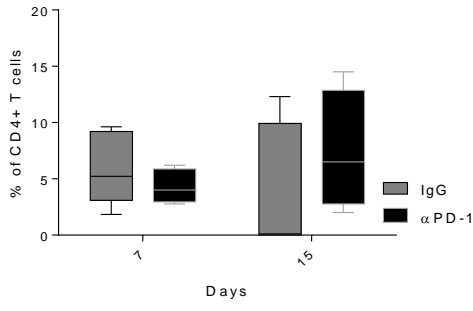
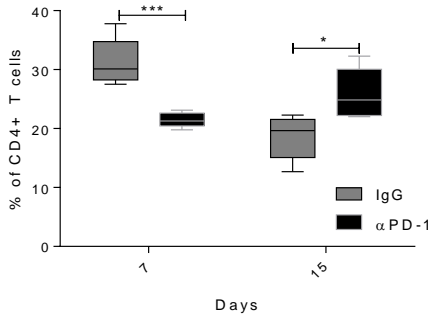
Blood

Tumor

A

C

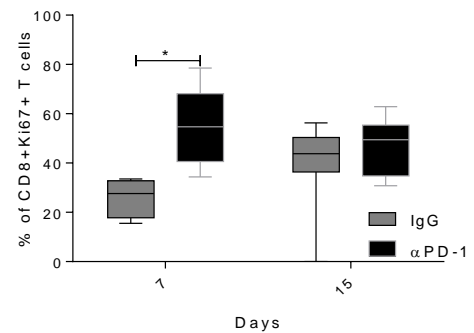
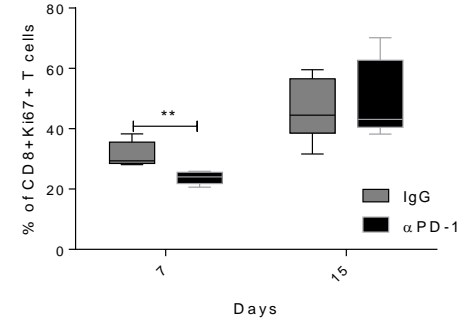
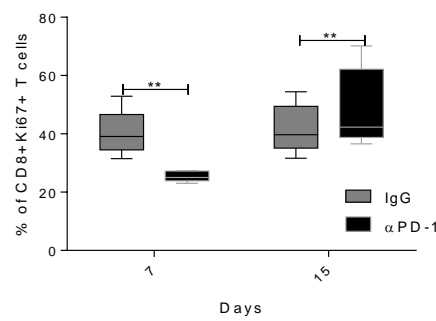
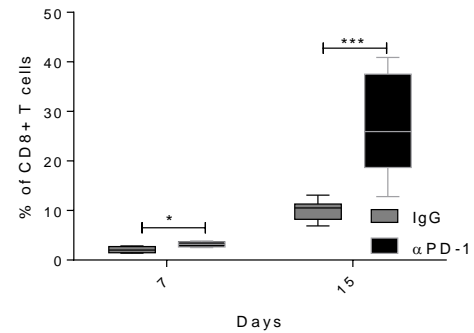
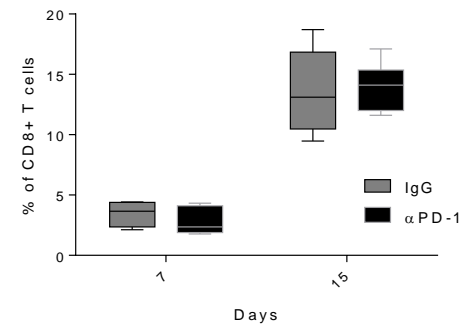
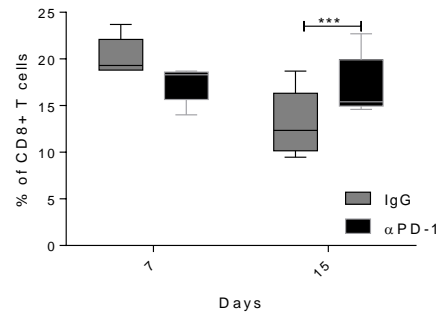
E



B

D

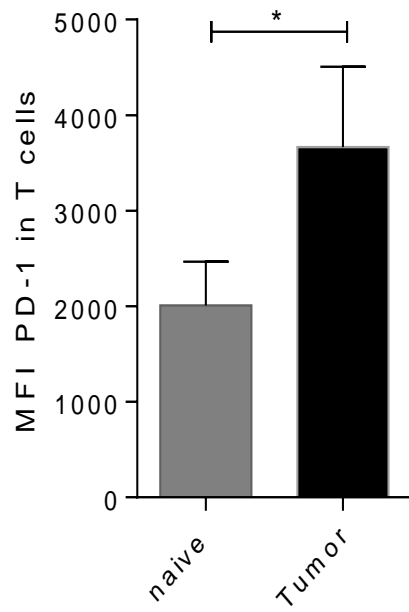
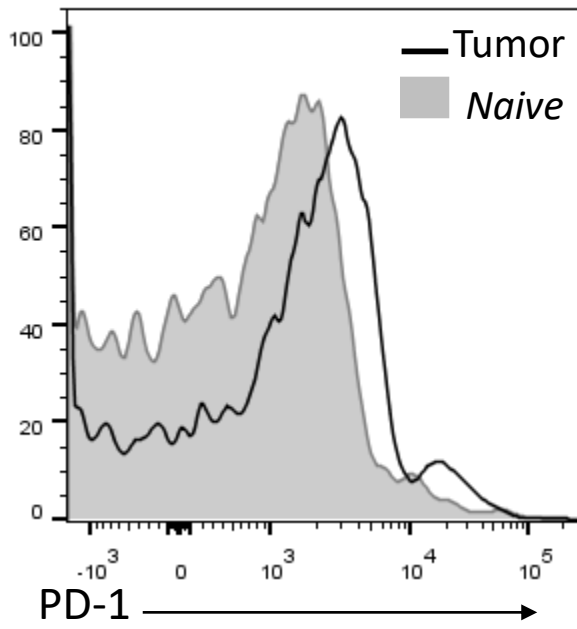
F



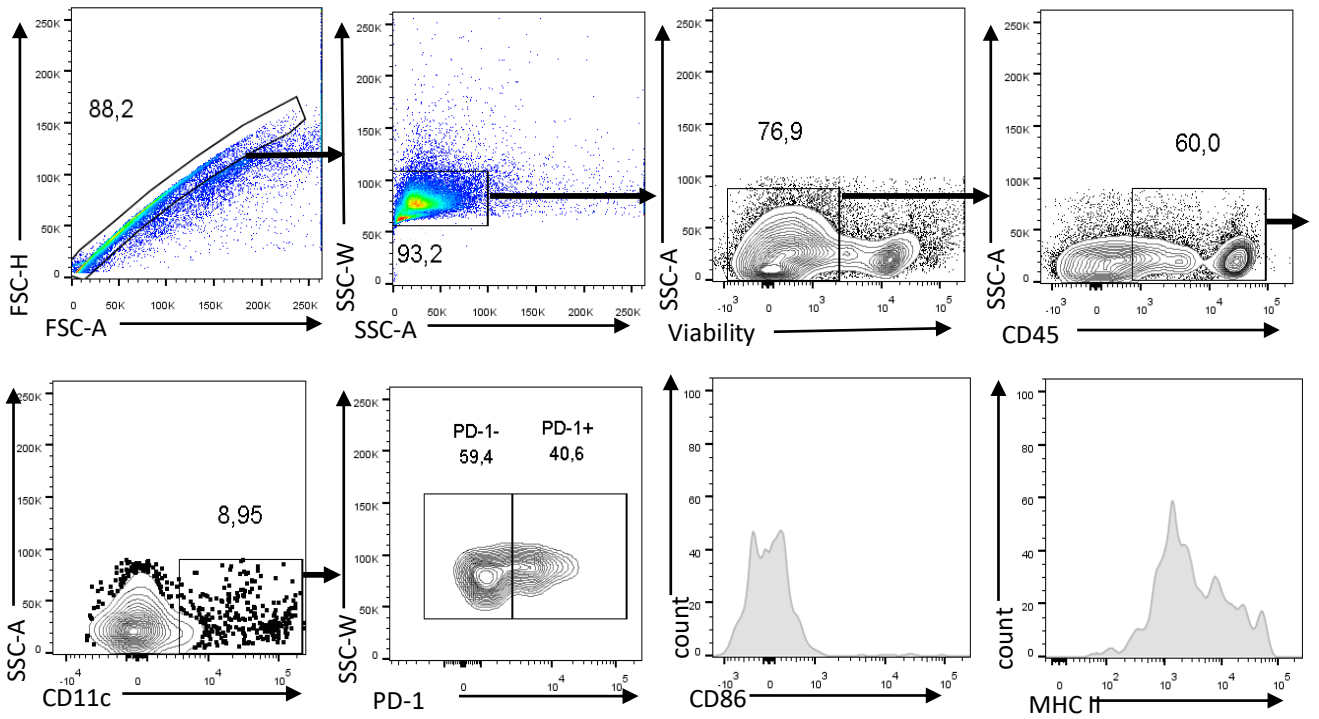
SUPPLEMENTARY FIGURE 4

A

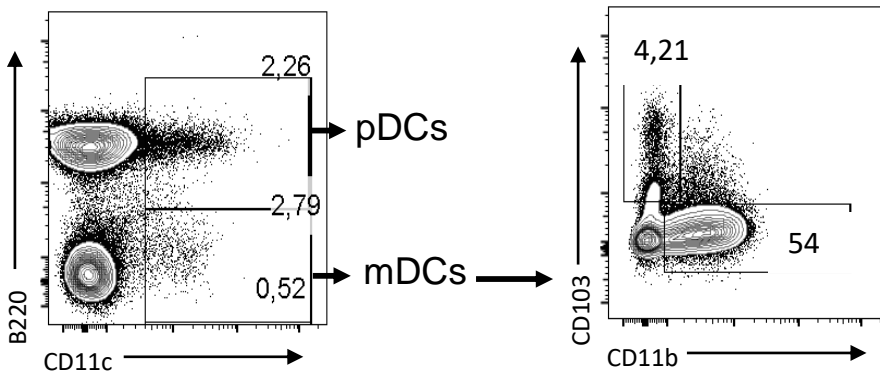
Gated in CD3+ live cells



SUPPLEMENTARY FIGURE 5



Gated in CD45+ live cells



ANEXO 2

RSV DOWNREGULATES IL-21/IL-21R ON TFH CELLS VIA PD-L1 INDUCTION IN APCS IMPAIRING PROTECTIVE HUMORAL RESPONSES

Rodrigo Benedetti Gassen^{1,2}; Tiago Fazolo^{1,2}; Deise Nascimento de Freitas², Thiago J. Borges^{1*}; Géssica L. Antunes², Fábio Maito³; Daniel A. G. Bueno Mendes⁵, André Báfica⁵, Douglas Muller⁴, Luiz Carlos Rodrigues Jr⁴, Ana Paula Duarte de Souza²; Cristina Bonorino^{1,4}.

1. Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul;
2. Laboratório de Imunologia Clínica e Experimental, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul;
3. Laboratório de Histologia, Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul;
4. Laboratório de Imunologia, Universidade Federal de Ciência da Saúde de Porto Alegre;
5. Laboratório de Imunobiologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

*Current location: Schuster Family Transplantation Research Center, Renal Division, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, 221 Longwood Ave, Boston, MA, 02115, USA

Corresponding Author:

Rodrigo Benedetti Gassen

Av. Ipiranga, 6690. 2nd floor, Labs 6-8. – São Lucas Hospital – IPB, PUCRS

Porto Alegre, RS – Brazil – 90610-900

Phone: (+55) 51-3320.3000 ext. 2725

Fax: (+55) 51-3320.3312

E-mail: rbgassen@gmail.com

ABSTRACT

Respiratory syncytial virus (RSV) is the major cause of premature children hospitalization. RSV vaccines are currently unavailable, and children suffering from multiple reinfections by the same viral strain fail to develop protective responses. Follicular helper T (TFH) cells are specialized in providing signals to B cells and help the production and affinity maturation of antibodies, mainly via IL-21 secretion. Although RSV-specific antibodies can be detected upon infection, these have limited neutralizing capacity. Therefore, a better understanding of the anti-RSV antibody response and its protective relevance is crucial for the development of a vaccine. In this study, we observed that RSV expands a functionally impaired TFH cells population, with decreased IL-21 production. RSV directly induces PD-L1 expression on DCs and indirectly on B cells, downregulating the expression of IL-21R. PD-L1 blockade during infection recovers IL-21R expression in TFH and B cells and increases the secretion of IL-21 in a DC-dependent manner. IL-21 treatment improves humoral responses in RSV infected-mice by decreasing follicular regulatory T (TFR) cells and increasing TFH cells, germinal center and memory B cells, antibody avidity and neutralization capacity. This treatment also protects mice from RSV infection, decreasing viral load and lung inflammation. Passive immunization with purified IgG from IL-21 treated RSV-infected mice protected against RSV infection. Our results unveil a pathway by which RSV affects TFH cells, reducing levels of IL-21 and its receptor, by increasing PD-L1 expression on APCs. These results highlight the PD-L1/IL-21 axis importance for the generation of protective responses to RSV infection.

Key words: respiratory syncytial virus; follicular helper T cells; IL-21; IL-21R, PD-L1 blockade

Abstract word count: 269

INTRODUCTION

Respiratory syncytial virus (RSV) is the leading cause of lower respiratory tract infection in infants, responsible for about three million hospitalizations and 74,500 deaths every year in children under two years of age (Shi et al., 2017). There is no effective vaccine available against RSV, and passive immunization with monoclonal antibodies is used only in high-risk infants. Elderly and pregnant women are also target populations (Anderson et al., 2013), reinforcing the need for the development of an effective vaccine.

In humans, neutralizing RSV-specific antibodies are formed in the upper respiratory tract, however, re-infection with the same RSV strain is frequent in healthy, immune competent individuals (DeVincenzo et al., 2010; Hall et al., 1991). A correlation of nasal preexisting RSV-specific humoral response with resistance to re-infection has been reported (Habibi et al., 2015). Other studies have correlated the presence of serum high avidity RSV-specific IgG with protection (Freitas et al., 2011), although these antibodies have a short life in children (Sande et al., 2013) and adults (Falsey et al., 2006). Nevertheless, RSV morbidity and mortality are increased in 2-4 months infants when titers of maternal antibodies are decreasing and have not yet been replaced by an endogenous antibody response (Jr, 2001). In mice, the RSV antibody response induced by formalin-inactivated RSV (FI-RSV) is non-protective (Polack et al., 2002). In addition, postfusion form of RSV F protein does induce a substantial neutralizing antibody response, however, RSV F pre-fusion form appears to be a more effective neutralization antigen than the postfusion in vaccine experimental models (McLellan et al., 2013; Tian et al., 2017).

Effective B cell responses require help from follicular helper T (TFH) cells. TFH cells are predominantly found in germinal centers (GC) of secondary lymphoid organs

(Bentebibel et al., 2011; Crotty, 2011; Weber et al., 2015) and produce high levels of IL-21. This cytokine is known to increase the affinity of antibodies and induce immunoglobulin class switching (Breitfeld et al., 2000; Cells et al., 2001). IL-21 acts on naive B cells along with co-stimulatory signals which drive differentiation of either GC B cells or plasma cells (Linterman et al., 2010). The specific provision of TFH cell-derived helper signals to GC B cells is proposed to be the major driver of antibody affinity maturation (Chan and Brink, 2012; Victora and Nussenzweig, 2012). GC B cells are able to increase the affinity of BCR by proliferating in the dark zone and undergoing somatic hypermutation to diversify the rearranged IgV genes (De Silva and Klein, 2015). B cells expressing high-affinity antibodies differentiate into antibody-secreting plasma cells and memory B cells that are responsible for protection against invading pathogens (Chan and Brink, 2012; Nutt and Tarlinton, 2011). GC reaction can also be regulated by regulatory follicular T (TFR) cells, downstream TFH and B cell responses (Sage and Sharpe, 2015). We hypothesized that RSV modulates TFH/TFR cells, preventing B cell help, targeting humoral immune response efficiency.

We found that RSV can induce PD-L1 (Programmed Death-ligand 1) in dendritic cells (DCs) and B cells, decreasing B and TFH cells functions. This correlated with a decreased ability of TFH cells to produce IL-21 and downregulation of IL-21R, leading to low avidity RSV-specific humoral immune response. Treatment with recombinant IL-21 reduced RSV-mediated impairment of GC and TFH cell functions as well as improved protection. Our results underline the importance of the PD-1/PD-L1 pathway and IL-21 adjuvant activity in the generation of effective anti-RSV protective antibody responses.

MATERIAL AND METHODS

Viruses and Cells

Vero cells (ATCC CCL81) were cultured in Dulbeccol's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco-BRL) containing 10% fetal calf serum (FCS, Gibco-BRL) and gentamicin (0.08 mg/ml, NOVAFARMA), maintained at 37°C with 5% of CO₂ and used to propagate RSV A2 strain. Viral plaque-forming units (PFU) were identified using an RSV F protein-specific antibody (Millipore, Billerica, MA, USA). Inactivation of the viruses was performed at UV light for 30 min, at room temperature.

Animals

Female BALB/c mice ranging from 6 to 8 weeks old were purchased from the Biological Center of Experimental Models (CEMBE) of PUCRS. Mice were housed in CEMBE facility with water and food *ad libitum*. All animal procedures were performed in accordance with the guidelines of the Federation of Brazilian Societies for Experimental Biology and approved by the Ethics Committee for the Use of Animals of PUCRS (CEUA-PUCRS; protocol number #13/00341).

Infection and treatment

For *in vitro* infection, splenocytes were isolated after lysis of red blood cells. Cells were seeded at 5×10^5 cells per well in a 96 well-plate and were stimulated either with 10^2 PFU/ml of RSV or the same virus inactivated by UV for 30 min. As negative controls, uninfected Vero cells were used and processed similarly to RSV infected cells. Alternatively, cells were treated with 0.5 µg of anti-PD-L1 antibody (clone MHI5, eBioscience) or control IgG (BioXcell) 1 hour before infection. In some experiments,

0,5 ng of IL-21 was added in culture. The supernatant was collected at 12, 24, 48, 72 and 96 hours post-infection for analysis. After four days, cells were labeled with specific antibodies and analyzed by flow cytometry.

For sorting, splenocytes were isolated after lysis of red blood cells and stained with specific antibodies for DCs (CD11c⁺ CD19⁻), B cells (CD19⁺CD11c) and TFH cells (CD4⁺CXCR5⁺). Cells were co-cultured (5x10³ DCs, 3x10⁴ TFH cells or 5x10⁴ B cell per well) in different combinations, and later infected with 10² PFU/ml of RSV for 4 days. Alternatively, cells were treated with 0.5 µg of anti-PD-L1 antibody (clone MHI5, eBioscience) or IgG (BioXcell), 1 hour before infection, and analyzed for IL-21R and PD-L1 expression.

For *in vivo* infection, mice were divided into 4 groups: two groups were infected intranasally with 10⁷ PFU of RSV, and one of this group received subcutaneous treatment with 0.5 µg of recombinant IL-21 (eBioscience) diluted in PBS. Two groups received PBS intranasally, and one of this group received treatment with recombinant IL-21 subcutaneously. IL-21 was administered on days: 4, 8, 14 and 18 post-infection. BAL and blood collection occurred on days 0, 7, 14 and 21 post-infection. Mice were euthanized at day 21 post-infection and spleens, lungs and LDLN were harvested for further analysis.

ELISA

IL-21 concentration in supernatant and serum was determined by capture ELISA (R&D Systems), according to manufacturer's instructions.

For the quantification of IgG and IgA RSV specific antibodies on mice serum, 96-well plates were sensitized overnight with RSV F protein (Sino Biological Inc.), blocked for 1 hour with blotto (5% milk, 0.05% tween in PBS 1X buffer) and serum or BAL was

added in dilutions of 1/10, 1/100, 1/500, 1/1000, 1/10000 and incubated for 2 hours at room temperature. Rabbit anti-mouse IgG or IgA antibody HRP-conjugated (Invitrogen) and TMB (Life Technologies) was used to development. Plates were read at 450nm in EZ Read 400 Microplate reader (Biochrom).

ELISA to measure the avidity of anti-RSV antibody was conducted in the same manner, however plates were washed with a 6M Urea PBS solution. The results were expressed as an Avidity Index (AI), which was calculated as previously described by (Freitas et al., 2011). The avidity of RSV-specific total IgG was classified according to values that had been predetermined arbitrarily defined as low (<50%), intermediate (50-70%), or high (>70%).

Neutralization assay

Antibody neutralization capacity assay was performed as previously described by (Zielinska et al., 2005), with modifications. Briefly, four-fold serial dilutions from 1:10 to 1:10240 were prepared in virus diluent (DMEM 0% FCS and 1% gentamicin, 0.08 mg/ml, NOVAFARMA). Serially diluted serum was challenged with an equal volume of the RSV-A2 strain, previously tittered to give ~150 PFU per 50 µl of inoculum. The serum/virus mixtures were incubated at 37°C, 5% CO₂ for 1 h.

96-well plates plated with Vero cell monolayers were infected with 50 µl/well (in triplicates) of the serum/virus mixture. Plates were blotted with 0.5% methyl cellulose, prepared in DMEM with 2% FBS and incubated at 37°C, 5% CO₂ for 3 days to allow plaque formation. To detect the syncytium formation, wells were incubated with primary anti-RSV antibodies (Millipore) and secondary antibody HRP-Rabbit anti-mouse IgG (Millipore) for 1 hour at 37°C. Blocking was done with blotto (5% milk, 0.05% tween in PBS 1X buffer). The assay was developed with 4-chloro-1-naphthol with 0.01% H₂O₂

for 20 min in dark. Syncytia were counted in an optical microscope and PFUs calculated by the ratio of the number of syncytia by multiplying the virus dilution by well plate volume.

Flow Cytometry

Cells were labeled with: anti-CD3 (APC-C7, 17A2 clone), anti-CD27 (APC, LG.3A10 clone), anti-FOXP3 (PE, MF23 clone), anti-B220 (PerCP, RA3-6B2 clone), anti-CD8a (APC-H7 536.7 clone), anti-IL-21R (PE, 4A9 clone) and anti-CD19 (APC-Cy7, ID3 clone) from BD Biosciences, anti-CD4 (eFluor710-PerCP, clone RM4-5), anti-PD-1 (PE-Cyanine7, clone J43), anti-Bcl-6 (PE mgl191E clone), anti- CXCR5 (APC, clone SPRCL5), anti-ICOS (FITC, clone 7E17G9), anti-CD45R (FITC, clone RA3-6B2) and anti-CD274 (PE, clone MIH5) from eBioscience, anti-CD25 (PE, PC61 clone), anti-GL7 (FITC, GL7 clone), anti-CD11c (PE/Cy7 N418 clone) and anti-Ki67 (PE or PerCP, clone 16A8) from BioLegend. Viability was determined with Fixable Viability Dye eFluor 780 or 450 from eBioscience. For intracellular staining, we used Foxp3 staining buffer Set (eBioscience). Cells were analyzed using a FACSCanto II (BD Biosciences) with the FACSDiva software (BD Biosciences). Sorting was performed in a FASCARIA (BD Biosciences).

Histology and Immunohistochemistry

Lungs and spleens were fixed with 10% formalin, embedded in paraffin and cut into 5 µm sections. Hematoxylin and eosin staining were performed on sections to evaluate inflammation scores. The score for peribronchial and perivascular inflammation was evaluated on a subjective scale of 0–3, as previously described (Pedrazza et al., 2017). A value of zero was assigned when no inflammation was detectable, a value of 1 was

adjudged for occasional cuffing with inflammatory cells, a value of 2 when most bronchi or vessels were surrounded by a thin layer (one to five cells thick) of inflammatory cells, and a value of 3 was given when most bronchi or vessels were surrounded by a thick layer (more than five cells thick) of inflammatory cells.

For immunohistochemistry, slides sections were deparaffinized with xylol and endogenous peroxidase activity was blocked by incubation with 3% H₂O₂ in methanol. Antigen unmasking was performed by incubating the slides in 0.1 mol/L citrate buffer, pH 6, for 30 min at 95°C, followed by cooling at room temperature for 1h. Sections were blocked in PBS with 4% bovine serum albumin (BSA), 5% mouse serum, and incubated with primary antibody anti-PD-L1 (clone MIH5, eBioscience) at 1:1000 dilution in PBS, 1% BSA, and 1.25% mouse serum. Biotinylated goat-derived secondary antibodies were detected by the avidin-biotin-horseradish peroxidase complex method (Dako Systems) using 3,3-diaminobenzidine-tetrahydrochloride (Sigma-Aldrich) as a substrate.

Real Time-PCR

Total RNA was extracted from the lungs of infected animals using Viral RNA/DNA Mini Kit (PureLink® - Invitrogen) following manufacturer's instructions. cDNA was synthesized with random primers using Sensiscript® Reverse Transcription kit (QIAGEN®). The quality of cDNA for each sample was tested by amplification of the endogenous β-actin gene using specific primers from TaqMan Assay (Applied Biosystems). Samples that did not amplify for β-actin were excluded. Real-time PCR was performed for the amplification of the RSV F protein gene using the primers and specific probes (forward-5'-AACAGATGTAAGCAGCTCCGTTATC-3', reverse-5'-GATTTTTATTGGATGCTGTACATTT-3' and probe 5'-FAM /

TGCCATAGCATGACACAATGGCTCCT-TAMRA / -3'). For standard curve a ten-fold serial dilutions of 6×10^7 copies of a plasmid with RSV F protein sequence were added to the same plate of qPCR in duplicate. The results were measured by StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) and used for further quantification of the samples viral load.

Passive immunization

Mice were separated into two groups; the first group received IgG serum from RSV-infected mouse and the second group, IgG serum from RSV-infected/IL-21 treated mouse. A Protein A-Sepharose column (Sigma) was used for IgG purification following manufacturer's instructions. Each mouse received 300 μ g of purified IgG intraperitoneally. After two days, animals were infected with 10^7 PFU of RSV intranasally. Mice were euthanized at day 5 post-infection and lungs were harvested for further analysis.

Statistical analysis

The significance for differences between the groups was analyzed with one-way ANOVA test followed by a Bonferroni post-test or t-test were applied to parametric data using GraphPad Prism software (San Diego, CA, USA). Values demonstrated in graphs are mean and standard deviation (S.D.) and a level of significance of $p < 0.05$ was established for the analyses.

RESULTS

RSV induces expansion of a non-functional TFH cell population *in vitro*.

To investigate whether RSV could modulate TFH cells *in vitro*, mice splenocytes were infected with 10^2 PFU of RSV for 4 days. We found that RSV increased the frequency

of total TFH (CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺) cells compared to uninfected controls (Fig. 1 A; Supplementary Figure 1 A). TFH cells induced by RSV also expressed ICOS and Bcl6 (Supplementary figure 1 B). We next investigated whether RSV could affect the function of TFH cells, measuring IL-21 production. No IL-21 levels were detected when RSV was added to splenocyte cultures, in contrast to what was observed for control (Fig. 1 B). Although RSV reduced IL-21R expression on total TFH cells (Fig. 1, C and D), the presence of IL-21 restored this impairment (Fig 1, C and D). In B cells, RSV did not modulate IL-21R expression without the presence of IL-21 (Supplementary figure 1 C). These data indicate that RSV could negatively modulate the function of TFH cells by downregulating IL-21R expression and impairing the production of IL-21.

PD-L1 blockade recovers IL-21R expression on total TFH and B cells and increases IL-21 secretion by TFH cells.

Previous studies demonstrated that RSV can upregulate PD-L1 expression on DCs (Wang et al., 2006). This leads to a decrease in humoral responses, affecting TFH viability (Hams et al., 2011). Both DCs (CD3⁻CD11c⁺) and B cells from RSV-exposed splenocytes were found to display upregulation of PD-L1 (Supplementary Fig. 2). To determine if RSV could directly induce PD-L1 upregulation in either of these cell populations, we sorted DCs and B cells and infected them *in vitro* with RSV. Only DCs upregulated PD-L1 expression as a direct effect of RSV, presenting higher PD-L1 levels compared to B cells (Fig. 2 A and B). These results led us to hypothesize that the reduction of IL-21 levels could be linked to the induction of PD-L1 in DCs following RSV infection. To test that, we blocked PD-L1 *in vitro* and infected mouse splenocytes with 10² PFU/ml of RSV for 4 days. Blocking PD-L1 increased IL-21 production by RSV-infected cells (Fig. 2 B). Two days post-infection, IL-21 levels began to decrease

in supernatants. At 96h post-infection, PD-L1 blockade significantly restored IL-21 secretion (Fig. 2 B). In sorted cells, PD-L1 blockade also recovered IL-21R expression on B cells (Fig. 2 C), however only when B cells were co-cultured with TFH cells and DCs. TFH cells also recovered IL-21R expression upon PD-L1 blockade (Fig. 2 D), in the presence of DCs only, but not solely B cells, demonstrating that reduction of IL-21R expression is linked to PD-L1 function in a DC-dependent manner.

In vivo, IL-21 serum levels were undetectable 4 days post-infection, again contrasting basal IL-21 levels of *naive* mice (Fig. 2 E). Upregulation of PD-L1 was also confirmed by immunohistochemistry of infected mice spleens on day 21 post-infection (Fig. 2 F). Thus, activation of PD-L1 pathway by RSV correlates with impaired IL-21 secretion by TFH cells.

IL-21 treatment increases TFH cells and decreases TFR cells in lung.

We hypothesized that the low levels of IL-21 observed upon RSV infection (Fig. 2 E) would lead to decreased humoral responses against the virus. To evaluate the IL-21 effect in TFH and TFR cells upon RSV infection *in vivo*, we infected mice with RSV and treated them with recombinant, endotoxin-free IL-21 (Supplementary figure 3 A). TFH and TFR cells gate strategy can be observed in supplementary figure 3 B. In lung draining lymph nodes (LDLN) of RSV-infected mice, IL-21 treatment did not affect percentages and proliferation of total TFH and TFH cells (Fig. 3 A, B and C). However, treatment with IL-21 induced a decrease in TFR cells numbers (Fig. 3 D) compared to infected mice without treatment. In lungs of infected mice, total TFH and TFH cells were decreased (Fig. 3 E, F and G), and IL-21 treatment restored the numbers and proliferation capacity. Furthermore, TFR cells had a notable increased in RSV-infected mice and IL-21 treatment was able to restore it (Fig. 3 E and H). Our data suggest that

RSV presence can negatively modulate TFH/TFR cells in LDLN and lungs, and IL-21 treatment recovers mice from this impairment.

IL-21 treatment increases GC B cells in lung draining lymph node and memory B cells in lung.

We analyze the capacity of IL-21 treatment to increase B cells, GC B cells and memory B cells in LDLN and lungs after RSV infection. Neither RSV presence or IL-21 treatment increased B cells percentages in LDLN (Fig. 4 A; Supplementary Figure 3 C) and lungs (Fig. 4 B) 21 days after infection. IL-21 was able to increase B cells proliferation in RSV-infected mice (Fig. 4 A and B) in both tissues. In addition, GC B cells were increased only in LDLN, but not in lungs (Fig. 4 C, D and E). Proliferating memory B cells were decreased by RSV infection in LDLN and increased in RSV-infected treated with IL-21 (Fig. 4 C, F and G) in both LDLN and lungs. These results indicate that IL-21 was sufficient to increase B cells proliferation in RSV-infected mice.

IL-21 treatment increases B cell follicle size, IgA/IgG production, antibody avidity and neutralization capacity.

Accordingly, we observed that animals infected with RSV showed undeveloped B cell follicles in the spleen compared to uninfected controls (Fig. 5 A). This was reversed by IL-21 treatment. Exogenous IL-21 led to increase in sizes of splenic B cell follicles during RSV infection (Fig. 5 B) as well as increased frequencies of B and TFH cells (Supplementary Figure 4 A and B) in the spleen. Finally, treatment with IL-21 also improved titers of IgA (Fig. 5 C) and IgG (Fig. 5 D) in bronchoalveolar lavage (BAL). IL-21 also increased titers of IgG in serum (Supplementary Figure 4 C), as well as avidity (Fig. 5 E) and neutralization capacity (Fig. 5 F) of anti-F protein specific antibodies.

IL-21 treatment protects RSV infected animals and decreases lung inflammation by specific humoral immune response

To evaluate the protective roles of IL-21 *in vivo*, similar experimental design was performed (Supplementary figure 3 A). While pulmonary injury was observed in lungs from untreated RSV-infected mice (Fig. 6 A and B), treatment with IL-21 reduced peribronchial and perivascular inflammation (Fig. 6 A and B) and weight loss (Fig. 6 C) in infected animals compared to untreated infected mice. IL-21 treatment also decreases numbers of RSV copies in lungs in RSV-infected mice (Fig. 6 D). These results suggest that IL-21 is essential for protection from RSV infection by activating TFH and B cells function.

To further investigate the immunologic mechanisms of protection, we pre-treated mice with purified IgG from serum of RSV-infected mice, either treated or not with IL-21, two days prior to RSV infection. The results indicate that protection can be mediated by IgG alone elicited by IL-21 treatment in infected mice, (Fig. 6 E). Thus, low production of IL-21 during RSV infection affect GC reactions, dramatically impairing the generation of a protective anti-RSV humoral response.

DISCUSSION

In this study, we unveil a pathway by which RSV can evade effector immune responses, interfering with TFH and TFR cells function, and consequently impairing the generation of protective antibodies. Recent studies report that impairing TFH cells differentiation and/or function constitute a major virulence strategy for different viruses. Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) negatively modulates antibody responses by killing TFH cells via NK cells cytotoxicity (Cook et al., 2015). Human Immunodeficiency virus (HIV) infection is associated with decrease of T follicular regulatory cells (TFR) function, leading to TFH cells proliferation, which is the major HIV producer cells and consequently increase viral replication (Chowdhury et al., 2015). Until now, there had been no reports on RSV modulation of TFH cells.

The GC reaction and the generation of high-affinity antibodies are coordinated via production of IL-21 by TFH cells, and such antibodies have been shown to confer protection in infants under 3 months old against RSV infection (Freitas et al., 2011). However, the influence of IL-21 in GC reaction and antibody avidity during RSV infection was so far unexplored. Our studies demonstrated that IL-21 production by TFH cells is inhibited by RSV. In line with our findings, in a cohort study that characterized the primary and secondary cytokine response to RSV infection, IL-21 was not detected in swab nasal secretion samples from infants recruited during two consecutive winters (Ugonna et al., 2016). Another (Dodd et al., 2013) demonstrated that IL-21 depletion during priming exacerbates immunopathology after RSV challenge and reduces antibody production, showing the importance of IL-21 in RSV infection.

Inhibition of IL-21 expression is a strategy employed by different pathogens to evade

effector immune responses. In HCV patients, serum IL-21 levels and the frequency of IL-21-producing TFH cells in blood was lower compared to healthy individuals (Spaan et al., 2015). Lower frequencies of IL-21-producing CD4⁺ T cells were also associated with reduced proliferation and increased expression of the inhibitory receptors like CTLA-4, Tim-3 and PD-1 on HCV-specific CD8⁺ T cells in a viral persistence state (Kared et al., 2013). In fact, IL-21 has potent and specific effects on mucosal antiviral responses, assisting viral clearance and regulating pulmonary T and B cell responses (Spolski and Leonard, 2014). IL-21 treatment has been tested against several types of viral pathogens, HBV (Li et al., 2013), HCV (Kared et al., 2013) and HIV (Pallikkuth and Pahwa, 2013; Yue et al., 2010). IL-21 KO mice are profoundly impaired in B cell responses, with reduced plasma cell formation and GC function, decreased B cell proliferation, transition into memory B cells, and antibody affinity maturation (Rankin et al., 2011; Zotos et al., 2010). In addition, IL-21 induces IL-21R expression on activated B cells and TFH cells (Avery et al., 2010; Caprioli et al., 2008; Nojima et al., 2011). All these studies underline the relevance of IL-21 in the generation of protective antibodies. In our study, while IL-21 was decreased by RSV infection, IgG antibodies generated upon IL-21 treatment in infected mice were highly protective upon transfer to naïve animals that were challenged *in vivo* by RSV. Our data highlight the importance of not only IL-21, but also of mucosal IgG in the protection against RSV infection, while revealing inhibition of TFH cells as the cellular target for this inhibitory strategy.

We observed that IL-21R was downregulated on TFH and B cells in RSV-infected splenocytes *in vitro*, consistently with the impairment of IL-21 production. In humans, IL-21R defects cause severe primary immunodeficiency, reduced NK, T and B cell activity and leading to multiple infections (Kotlarz et al., 2014). Our results indicate that

downregulation of IL-21R is another important mechanism associated with the impairment of B cell responses against RSV in mice, evidencing the relevance of the IL-21/IL-21R axis in the generation of protection to this virus.

Finally, we found that inhibition of IL-21 production during RSV infection depended on PD-L1 induction. TFH cells naturally express PD-1 (Crotty, 2011), and PD-L1, one of the classic PD-1 ligands, is responsible for immune response homeostasis, negatively modulating PD-1-expressing T cells (Wherry, 2011). PD-1-PD-L1 interactions reduce Akt phosphorylation in PD-1 expressing cells, leading to decreases in function and cell survival (Okazaki and Honjo, 2006). PD-L1 has been previously reported to be increased in DCs (Sow et al., 2011; Wang et al., 2006) and B cells (Yao et al., 2015) of mice infected with RSV. Our findings showed that RSV could directly upregulate PD-L1 expression in DCs but in not B cells. Similarly to our findings regarding the role of PD-L1 and IL-21 in RSV infection, Cubas *et al* demonstrated that HIV infection increased PD-L1 frequency in GC B cells leading to reduction of TFH cells proliferation and IL-21 production (Cubas et al., 2013). Upregulation of PD-L1 in B cells mediated by RSV depended on DCs and T cells. It is possible that the mechanism by which PD-1/PD-L1 interactions inhibit TFH cells function is by downregulation of c-Maf expression in these cells, a transcriptional factor involved in transactivation of both the promoter and enhancer of the IL-21 gene, and inversely associated with PD-L1 expression (Hiramatsu et al., 2010; Jogdand et al., 2016).

Several studies have also suggested that blockade of PD-1 or PD-L1 may lead to a reversion of T cell dysfunction in the context of chronic infection (Dyck and Mills, 2017). PD-L1 blockade in regulatory B cells can recover TH1 cell activity in visceral leishmaniasis in a canine model (Schaut et al., 2016). When we blocked PD-L1 *in vitro* during RSV infection, IL-21 secretion was increased. A previous study demonstrated

that PD-L1 expression on lung DCs controls inflammation, and anti-PD-L1 treatment of RSV-infected animals induced pro-inflammatory cytokines, exacerbating pulmonary inflammation and host disease (Yao et al., 2015). In that study, anti-PD-L1 treatment led only to a moderate enhancement of TFH cells numbers, and no improvement of antibody responses at day 6 post-infection (Yao et al., 2015). We believe that an early course of IL-21 therapy, rather than anti-PD-L1, might constitute an interesting approach to circumvent the TFH cell function impairment that ensues upon RSV infection.

In summary our data describes the importance of IL-21 and the PD-1/ PD-L1 axis in regulation TFH and TFR cells function and humoral response in RSV infection. This mechanism could be explored to development of new vaccines strategies or immunotherapy against respiratory infection.

DECLARATION OF CONFLICTING INTERESTS

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

FINANCIAL SUPPORT

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), and Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

REFERENCES

- Anderson, L.J., Dormitzer, P.R., Nokes, D.J., Rappuoli, R., Roca, A., and Graham, B.S. (2013). Strategic priorities for respiratory syncytial virus (RSV) vaccine development. *Vaccine* 31.
- Avery, D.T., Deenick, E.K., Ma, C.S., Suryani, S., Simpson, N., Chew, G.Y., Chan, T.D., Palendira, U., Bustamante, J., Boisson-Dupuis, S., et al. (2010). B cell-intrinsic signaling through IL-21 receptor and STAT3 is required for establishing long-lived antibody responses in humans. *J. Exp. Med.* 207, 155–171.
- Bentebibel, S.-E., Schmitt, N., Banchereau, J., and Ueno, H. (2011). Human tonsil B-cell lymphoma 6 (BCL6)-expressing CD4⁺ T-cell subset specialized for B-cell help outside germinal centers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, E488-97.
- Breitfeld, B.D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M., and Förster, R. (2000). Follicular B Helper T Cells Express CXC Chemokine Receptor 5, Localize to B Cell Follicles, and Support Immunoglobulin Production. 192.
- Caprioli, F., Sarra, M., Caruso, R., Stolfi, C., Fina, D., Sica, G., MacDonald, T.T., Pallone, F., and Monteleone, G. (2008). Autocrine regulation of IL-21 production in human T lymphocytes. *J. Immunol.* 180, 1800–1807.
- Cells, C.T., Kim, B.C.H., Rott, L.S., Clark-lewis, I., Campbell, D.J., Wu, L., and Butcher, E.C. (2001). Subspecialization of CXCR5⁺ T Cells: B Helper Activity Is Focused in a Germinal Center – localized Subset of. 193.
- Chan, T.D., and Brink, R. (2012). Affinity-based selection and the germinal center response. *Immunol. Rev.* 247, 11–23.
- Chowdhury, A., Del Rio, P.M.E., Tharp, G.K., Tribble, R.P., Amara, R.R., Chahroudi, A., Reyes-Teran, G., Bosinger, S.E., and Silvestri, G. (2015). Decreased T Follicular Regulatory Cell/T Follicular Helper Cell (TFH) in Simian Immunodeficiency Virus-Infected Rhesus Macaques May Contribute to Accumulation of TFH in Chronic Infection. *J. Immunol.* 195, 3237–3247.
- Cook, K.D., Kline, H.C., and Whitmire, J.K. (2015). NK cells inhibit humoral immunity by reducing the abundance of CD4⁺ T follicular helper cells during a chronic virus infection. *J. Leukoc. Biol.* 98.
- Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu. Rev. Immunol.* 29, 621–663.
- Cubas, R. a, Mudd, J.C., Savoye, A.-L., Perreau, M., van Grevenynghe, J., Metcalf, T., Connick, E., Meditz, A., Freeman, G.J., Abesada-Terk, G., et al. (2013). Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nat. Med.* 19, 494–499.
- DeVincenzo, J.P., Wilkinson, T., Vaishnav, A., Cehelsky, J., Meyers, R., Nochur, S., Harrison, L., Meeking, P., Mann, A., Moane, E., et al. (2010). Viral load drives disease in humans experimentally infected with respiratory syncytial virus. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 182, 1305–1314.
- Dodd, J.S., Clark, D., Muir, R., Korpis, C., and Openshaw, P.J.M. (2013). Endogenous IL-21 regulates pathogenic mucosal CD4 T-cell responses during enhanced RSV disease in mice. *Mucosal Immunol.* 6, 704–717.
- Dyck, L., and Mills, K.H.G. (2017). Immune checkpoints and their inhibition in cancer

and infectious diseases. *Eur. J. Immunol.* 1–37.

Falsey, A.R., Singh, H.K., and Walsh, E.E. (2006). Serum antibody decay in adults following natural respiratory syncytial virus infection. *J. Med. Virol.* 78, 1493–1497.

Freitas, G.R.O., Silva, D.A.O., Yokosawa, J., Paula, N.T., Costa, L.F., and Carneiro, B.M. (2011). Antibody Response and Avidity of Respiratory Syncytial Virus-Specific Total IgG , IgG1 , and IgG3 in Young Children. *1833*, 1826–1833.

Habibi, M.S., Jozwik, A., Makris, S., Dunning, J., Paras, A., DeVincenzo, J.P., De Haan, C.A.M., Wrammert, J., Openshaw, P.J.M., and Chiu, C. (2015). Impaired antibody-mediated protection and defective iga b-cell memory in experimental infection of adults with respiratory syncytial virus. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 191, 1040–1049.

Hall, C.B., Walsh, E.E., Long, C.E., and Schnabel, K.C. (1991). Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.* 163, 693–698.

Hams, E., McCarron, M.J., Amu, S., Yagita, H., Azuma, M., Chen, L., and Fallon, P.G. (2011). Blockade of B7-H1 (programmed death ligand 1) enhances humoral immunity by positively regulating the generation of T follicular helper cells. *J. Immunol.* 186, 5648–5655.

Hiramatsu, Y., Suto, A., Kashiwakuma, D., Kanari, H., Kagami, S., Ikeda, K., Hirose, K., Watanabe, N., Grusby, M.J., Iwamoto, I., et al. (2010). c-Maf activates the promoter and enhancer of the IL-21 gene, and TGF-beta inhibits c-Maf-induced IL-21 production in CD4+ T cells. *J. Leukoc. Biol.* 87, 703–712.

Jandl, C., Liu, S.M., Cañete, P.F., Warren, J., Hughes, W.E., Vogelzang, A., Webster, K., Craig, M.E., Uzel, G., Dent, A., et al. (2017). IL-21 restricts T follicular regulatory T cell proliferation through Bcl-6 mediated inhibition of responsiveness to IL-2. *Nat. Commun.* 8.

Jogdand, G.M., Mohanty, S., and Devadas, S. (2016). Regulators of Tfh cell differentiation. *Front. Immunol.* 7, 1–14.

Jr, J.C. (2001). Respiratory syncytial virus vaccine development. *Vaccine* 10, 1415–1433.

Kared, H., Fabre, T., B??dard, N., Bruneau, J., and Shoukry, N.H. (2013). Galectin-9 and IL-21 Mediate Cross-regulation between Th17 and Treg Cells during Acute Hepatitis C. *PLoS Pathog.* 9.

Kotlarz, D., Zięta, N., Milner, J.D., and Klein, C. (2014). Human IL-21 and IL-21R deficiencies. *Curr. Opin. Pediatr.* 26, 704–712.

Li, L., Liu, M., Cheng, L.-W., Gao, X.-Y., Fu, J.-J., Kong, G., Feng, X., and Pan, X.-C. (2013). HBcAg-specific IL-21-producing CD4+ T cells are associated with relative viral control in patients with chronic hepatitis B. *Scand. J. Immunol.* 78, 439–446.

Linterman, M. a, Beaton, L., Yu, D., Ramiscal, R.R., Srivastava, M., Hogan, J.J., Verma, N.K., Smyth, M.J., Rigby, R.J., and Vinuesa, C.G. (2010). IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J. Exp. Med.* 207, 353–363.

McLellan, J.S., Chen, M., Joyce, M.G., Sastry, M., Stewart-Jones, G.B.E., Yang, Y., Zhang, B., Chen, L., Srivatsan, S., Zheng, A., et al. (2013). Structure-Based Design of a Fusion Glycoprotein Vaccine for Respiratory Syncytial Virus. *Science* (80-.). 342, 592–598.

- Nojima, T., Haniuda, K., Moutai, T., Matsudaira, M., Mizokawa, S., Shiratori, I., Azuma, T., and Kitamura, D. (2011). In-vitro derived germinal centre B cells differentially generate memory B or plasma cells in vivo. *Nat. Commun.* 2, 465.
- Nutt, S.L., and Tarlinton, D.M. (2011). Germinal center B and follicular helper T cells: siblings, cousins or just good friends? *Nat. Immunol.* 131, 472–477.
- Okazaki, T., and Honjo, T. (2006). The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol.* 27, 195–201.
- Pallikkuth, S., and Pahwa, S. (2013). Interleukin-21 and T follicular helper cells in HIV infection: research focus and future perspectives. *Immunol. Res.* 57, 279–291.
- Pedrazza, L., Cubillos-Rojas, M., De Mesquita, F.C., Luft, C., Cunha, A.A., Rosa, J.L., and De Oliveira, J.R. (2017). Mesenchymal stem cells decrease lung inflammation during sepsis, acting through inhibition of the MAPK pathway. *Stem Cell Res. Ther.* 8, 1–14.
- Polack, F.P., Teng, M.N., Collins, P.L., Prince, G. a, Exner, M., Regele, H., Lirman, D.D., Rabold, R., Hoffman, S.J., Karp, C.L., et al. (2002). A role for immune complexes in enhanced respiratory syncytial virus disease. *J. Exp. Med.* 196, 859–865.
- Rankin, A.L., MacLeod, H., Keegan, S., Andreyeva, T., Lowe, L., Bloom, L., Collins, M., Nickerson-Nutter, C., Young, D., and Guay, H. (2011). IL-21 Receptor Is Critical for the Development of Memory B Cell Responses. *J. Immunol.* 186, 667–674.
- Renegar, K.B., Small, P.A., Boykins, L.G., and Wright, P.F. (2004). Role of IgA versus IgG in the Control of Influenza Viral Infection in the Murine Respiratory Tract. *J. Immunol.* 173, 1978–1986.
- Sage, P.T., and Sharpe, A.H. (2015). T Follicular Regulatory Cells in the Regulation of B cell Responses. *Trends Immunol.* 1–9.
- Sande, C.J., Mutunga, M.N., Okiro, E.A., Medley, G.F., Cane, P.A., and Nokes, D.J. (2013). Kinetics of the Neutralizing Antibody Response to Respiratory Syncytial Virus Infections in a Birth Cohort. *J. Med. Virol.* 85, 2020–2025.
- Schaut, R.G., Lamb, I.M., Toepf, A.J., Scott, B., Mendes-Aguiar, C.O., Coutinho, J.F. V., Jeronimo, S.M.B., Wilson, M.E., Harty, J.T., Waldschmidt, T.J., et al. (2016). Regulatory IgD^{hi} B Cells Suppress T Cell Function via IL-10 and PD-L1 during Progressive Visceral Leishmaniasis. *J. Immunol.* 196, 4100–4109.
- Shi, T., McAllister, D.A., O'Brien, K.L., Simoes, E.A.F., Madhi, S.A., Gessner, B.D., Polack, F.P., Balsells, E., Acacio, S., Aguayo, C., et al. (2017). Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet.*
- De Silva, N.S., and Klein, U. (2015). Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 137–148.
- Sow, F.B., Gallup, J.M., Krishnan, S., Patera, A.C., Suzich, J., and Ackermann, M.R. (2011). Respiratory syncytial virus infection is associated with an altered innate immunity and a heightened pro-inflammatory response in the lungs of preterm lambs. *Respir. Res.* 12, 106.
- Spaan, M., Kreefft, K., de Graav, G.N., Brouwer, W.P., de Knecht, R.J., ten Kate, F.J.W., Baan, C.C., Vanwollegem, T., Janssen, H.L. a, and Boonstra, A. (2015).

CD4⁺ CXCR5⁺ T cells in chronic HCV infection produce less IL-21, yet are efficient at supporting B cell responses. *J. Hepatol.* 62, 303–310.

Spolski, R., and Leonard, W.J. (2014). Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 379–395.

Tian, D., Battles, M.B., Moin, S.M., Chen, M., Modjarrad, K., Kumar, A., Kanekiyo, M., Graepel, K.W., Taher, N.M., Hotard, A.L., et al. (2017). Structural basis of respiratory syncytial virus subtype-dependent neutralization by an antibody targeting the fusion glycoprotein. *Nat. Commun.* 8, 1–7.

Ugonna, K., Douros, K., Bingle, C.D., and Everard, M.L. (2016). Cytokine responses in primary and secondary respiratory syncytial virus infections. *Pediatr. Res.*

Victora, G.D., and Nussenzweig, M.C. (2012). Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 30, 429–457.

Vissers, M., Ahout, I.M.L., De Jonge, M.I., and Ferwerda, G. (2016). Mucosal IgG Levels Correlate Better with Respiratory Syncytial Virus Load and Inflammation than Plasma IgG Levels. *Clin. Vaccine Immunol.* 23, 243–245.

Wang, H., Peters, N., and Schwarze, J. (2006). Plasmacytoid dendritic cells limit viral replication, pulmonary inflammation, and airway hyperresponsiveness in respiratory syncytial virus infection. *J Immunol* 177, 6263–6270.

Weber, J.P., Fuhrmann, F., Feist, R.K., Lahmann, A., Al Baz, M.S., Gentz, L.-J., Vu Van, D., Mages, H.W., Haftmann, C., Riedel, R., et al. (2015). ICOS maintains the T follicular helper cell phenotype by down-regulating Krüppel-like factor 2. *J. Exp. Med.* 212, 217–233.

Wherry, E.J. (2011). T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* 131, 492–499.

Yao, S., Jiang, L., Moser, E.K., Jewett, L.B., Wright, J., Du, J., Zhou, B., Davis, S.D., Krupp, N.L., Braciale, T.J., et al. (2015). Control of pathogenic effector T-cell activities in situ by PD-L1 expression on respiratory inflammatory dendritic cells during respiratory syncytial virus infection. *Mucosal Immunol.* 8, 746–759.

Yue, F.Y., Lo, C., Sakhdari, A., Lee, E.Y., Kovacs, C.M., Benko, E., Liu, J., Song, H., Jones, R.B., Sheth, P., et al. (2010). HIV-specific IL-21 producing CD4⁺ T cells are induced in acute and chronic progressive HIV infection and are associated with relative viral control. *J. Immunol.* 185, 498–506.

Zielinska, E., Liu, D., Wu, H.-Y., Quiroz, J., Rappaport, R., and Yang, D.-P. (2005). Development of an improved microneutralization assay for respiratory syncytial virus by automated plaque counting using imaging analysis. *Viol. J.* 2, 84.

Zotos, D., Coquet, J.M., Zhang, Y., Light, A., D'Costa, K., Kallies, A., Corcoran, L.M., Godfrey, D.I., Toellner, K.-M., Smyth, M.J., et al. (2010). IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J. Exp. Med.* 207, 365–378.

FIGURES

FIGURE 1. RSV expand total TFH cell and decreases IL-21 secretion as well as IL-21R expression in total TFH and B cells *in vitro*. Splenocytes were incubated with 10^2 PFU of RSV, RSV treated with IL-21 or Vero cells supernatant for 4 days. **(A)** Representative and total TFH (CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺) cells percentages. **(B)** IL-21 in supernatant of cultured infected splenocytes. **(C)** Representative histogram and **(D)** MFI of IL-21R expression in total TFH cells. Results are the mean of one representative experiment of three performed. *P <0.05; **P<0.01; ***P<0,001.

FIGURE 2. PD-L1 blockade recovers IL-21R expression in total TFH and B cells and increases IL-21 secretion by TFH cells. DCs (CD11c⁺ CD19⁻) and B cells (CD11c⁻ CD19⁺) from BALB/c mice splenocytes were sorted and incubated with RSV for 4 days. **(A)** MFI of PD-L1 in sorter DCs and B cells. **(B)** IL-21 levels in supernatant of infected splenocytes, with or without α PD-L1 treatment. **(C)** MFI from IL-21R in coculture sorted B cells. **(D)** MFI from IL-21R in coculture sorted TFH cells. **(E)** Serum IL-21 levels in mice (three per group) infected or not with RSV, measured by ELISA. **(F)** Spleen PD-L1 immunohistochemistry 21 days after infection (three mice per group) with 10^7 PFUs of RSV, 40x magnification. Bar scale: 200 μ m. Zoom black dotted square: 100x magnification. Results are the mean of one representative experiment of three performed. *P <0.05; **P<0.01; ***P<0,001.

FIGURE 3. *In vivo* IL-21 treatment increases TFH cell and decrease TFR cells in lung. BALB/c mice were intranasally infected with 10^7 PFU of RSV and treated subcutaneously with 4 doses of 0.5 μ g of IL-21. **(A and E)** Representative gate of total TFH cells (CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺), TFH cells (CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺ FOXP3⁻) and TFR cells (CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺ FOXP3⁻) in LDLN and lung, respectively. **(B)** Total TFH cells percentages and total TFH cells proliferation (Ki67⁺) in LDLN. **(C)** TFH cells percentages and TFH cells proliferation (Ki67⁺) in LDLN. **(D)** TFR cells percentages and TFR cells proliferation (Ki67⁺) in LDLN. **(F)** Total TFH cells percentages and total TFH cells proliferation (Ki67⁺) in lung. **(G)** TFH cells percentages and TFH cells proliferation (Ki67⁺) in lung. **(H)** TFR cells percentages and TFR cells proliferation (Ki67⁺) in lung. Results are the mean of one representative experiment of three performed using three mice per experiment. *P <0.05; **P<0.01; ***P<0,001.

FIGURE 4. *In vivo* IL-21 treatment increases GC B cells in lung draining lymph node and memory B cells in lung. BALB/c mice were intranasally infected with 10^7 PFU of RSV and treated subcutaneously with 4 doses of 0.5 μ g of IL-21. **(A)** B cells percentages and B cells proliferation (Ki67⁺) in LDN. **(B)** B cells percentages and B cells proliferation (Ki67⁺) in lung. **(C)** Representative gate of GC B (CD19⁺CD27⁻GL7⁺) cells and memory B (CD19⁺CD27⁺GL7⁻) cells in LDN and lung, respectively. **(D-E)** GC B cells percentages and proliferation (Ki67⁺) in LDN and lung, respectively. **(F-G)** Memory B cells percentages and proliferation (Ki67⁺) in LDN and lung, respectively.

Results are the mean of one representative experiment of three performed using three mice per experiment. *P <0.05; **P<0.01; ***P<0,001.

FIGURE 5. *In vivo* IL-21 treatment increases B cell follicles size, IgA and IgG production, avidity and neutralization capacity. BALB/c mice were intranasally infected with 10^7 PFU of RSV and treated subcutaneously with 4 doses of 0.5 μ g of IL-21. **(A)** Spleen HE histology, 40x magnification. Bar scale: 200 μ m. **(B)** Quantification of B follicle size, by fold increase. **(C)** Anti-F IgA titers measured by ELISA in BAL. **(D)** Anti-F IgG titers measured by ELISA in BAL. **(E)** Total IgG avidity index on days 18 and 21 after infection. **(F)** Neutralization capacity assay. Results are the mean of one representative experiment of three performed using three mice per experiment. *P <0.05; **P<0.01; ***P<0,001.

FIGURE 6. *In vivo* IL-21 treatment protects RSV infected animals and decreases lung inflammation. BALB/c mice were intranasally infected with 10^7 PFU of RSV and treated subcutaneously with 4 doses of 0.5 μ g of IL-21. **(A)** Lung HE histology (200x and 1000x magnification), 21 days post-infection. **(B)** Peribronchial and perivascular inflammation score. **(C)** Weight loss plotted over time. **(D)** RT-PCR quantification of RSV copies in the lungs, 21 days after infection. **(E)** Passive immunization with purified IgG from RSV-infected mice or IL-21 treated RSV-infected mice measured of RSV copies in lungs by RT-PCR. Results are the mean of one representative experiment of three performed using three mice per experiment. *P <0.05; **P<0.01; ***P<0,001.

SUPPLEMENTARY FIGURE 1. *In vitro* gate strategy to total TFH cells. Cells were incubated with RSV or Vero cells supernatant for 4 days. **(A)** Representative gate strategy for single cells live CD4⁺ T cells in *in vitro* experiments. **(B)** Bcl-6 and ICOS expression on total TFH cells in RSV infected splenocytes. **(C)** MFI of IL-21R expression in B (CD3⁺CD19⁺) cells. Results are the mean of one representative experiment of three performed. *P <0.05; **P<0.01; ***P<0,001.

SUPPLEMENTARY FIGURE 2. Representative histogram and MFI of PD-L1 in infected splenocytes. Cells were incubated with either RSV, UV inactivated RSV or Vero cells supernatant for 4 days. **(A-B)** in DC's (CD3⁺CD11c⁺). **(C-D)** in B cells (CD3⁺CD19⁺). (RSV, black line; RSV UV, black dotted line; negative control, hatched gray histogram). Results are the mean of one representative experiment of three performed. *P <0.05; **P<0.01; ***P<0,001.

SUPPLEMENTARY FIGURE 3. (A) Experimental design: mice were divided into 4 groups: two groups were infected intranasally with 10⁷ PFU of RSV, and one of this group received subcutaneous treatment with 0.5 µg of recombinant IL-21 (eBioscience) diluted in PBS. Two groups received PBS intranasally, and one of this group received treatment with recombinant IL-21 subcutaneously. IL-21 was administered on days: 4, 8, 14 and 18 post-infection. The blood collection and bronchoalveolar lavage (BAL) occurred on days 0, 7, 14 and 21 post-infection. Mice were euthanized at day 21 post-infection and LDLN, spleens and lungs were harvested for further analysis. **(B) *In vivo* gate strategy to analyses total TFH, TFH and TFR cells.** Representative gate strategy of single cells lives total TFH cells (CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺), TFH cells (CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺ FOXP3⁻) and TFR cells (CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺ FOXP3⁻) in LDLN and lung. The measurement (Ki67⁺) of proliferation was also checked in this three populations. **(C) *In vivo* gate strategy to analyses B, GC B and memory B cells.** Representative gate strategy of single cells lives B cells (CD3⁺CD19⁺), GC B (CD19⁺CD27⁺GL7⁺) cells and memory B (CD19⁺CD27⁺GL7⁻) cells in LDLN and lung. The measurement of proliferation (Ki67⁺) was also checked in this three populations.

SUPPLEMENTARY FIGURE 4. Percentage of total TFH cells (A) and B cells (B) in spleen of RSV infected mice treated or not with IL-21 and anti-F IgG titers (C) measured by ELISA in serum. Mice were divided into 4 groups: two groups were infected intranasally with 10⁷ PFU of RSV, and one of this group received subcutaneous treatment with 0.5 µg of recombinant IL-21. Results are the mean of one representative experiment of three performed using three mice per experiment. *P <0.05; **P<0.01; ***P<0,001.

FIGURE 1

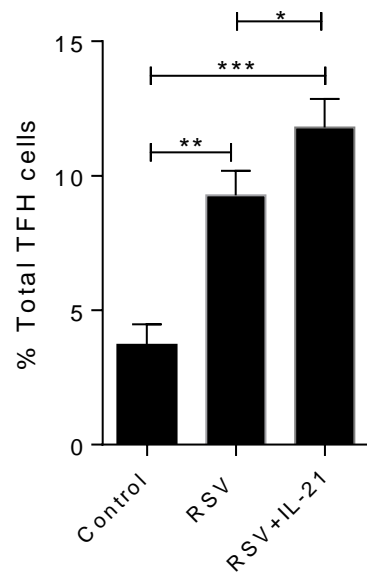
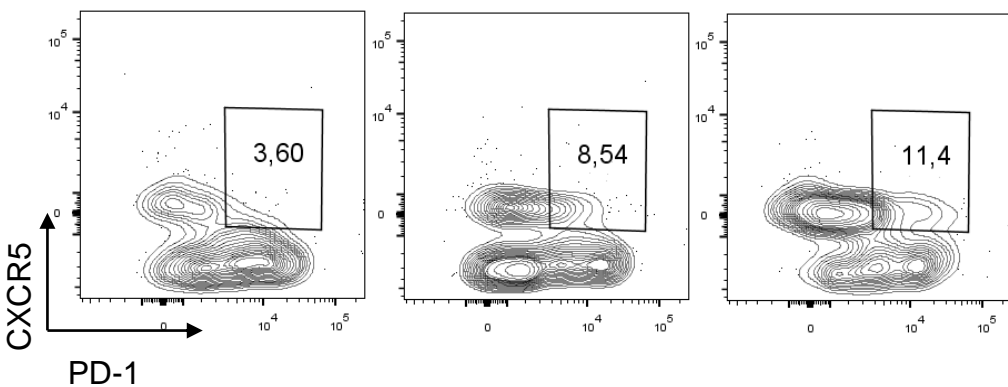
A

Gated on live CD4⁺

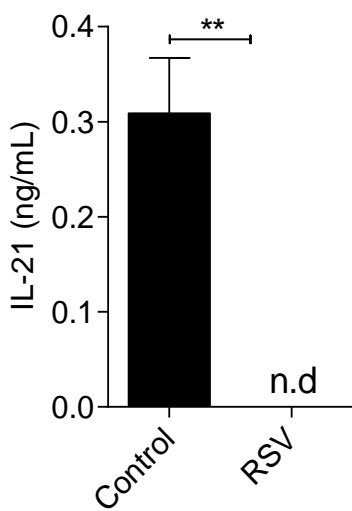
control

RSV

RSV+ IL-21

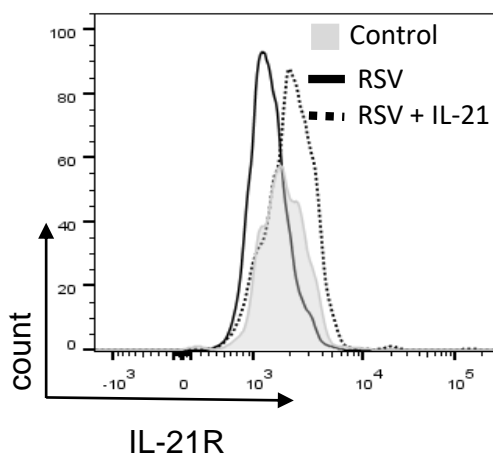


B



C

Gated on live CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺



D

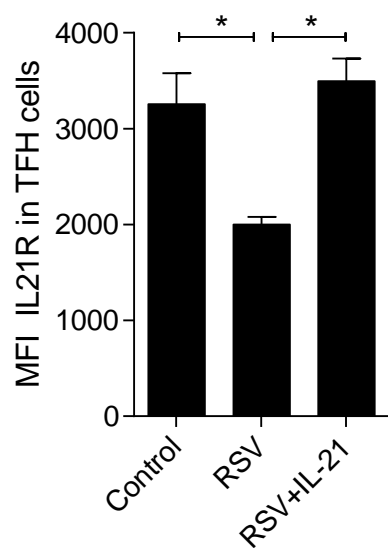


FIGURE 2

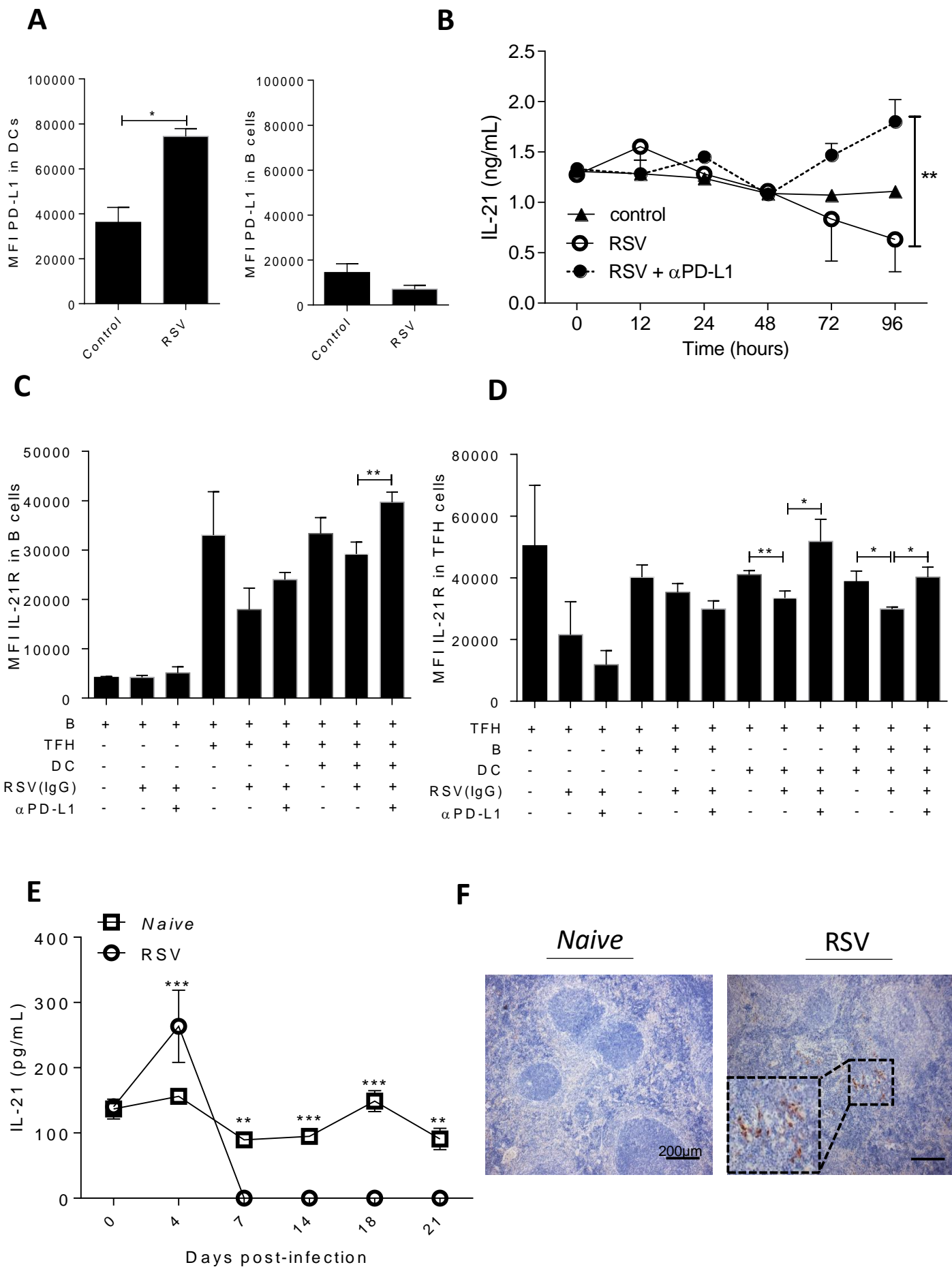


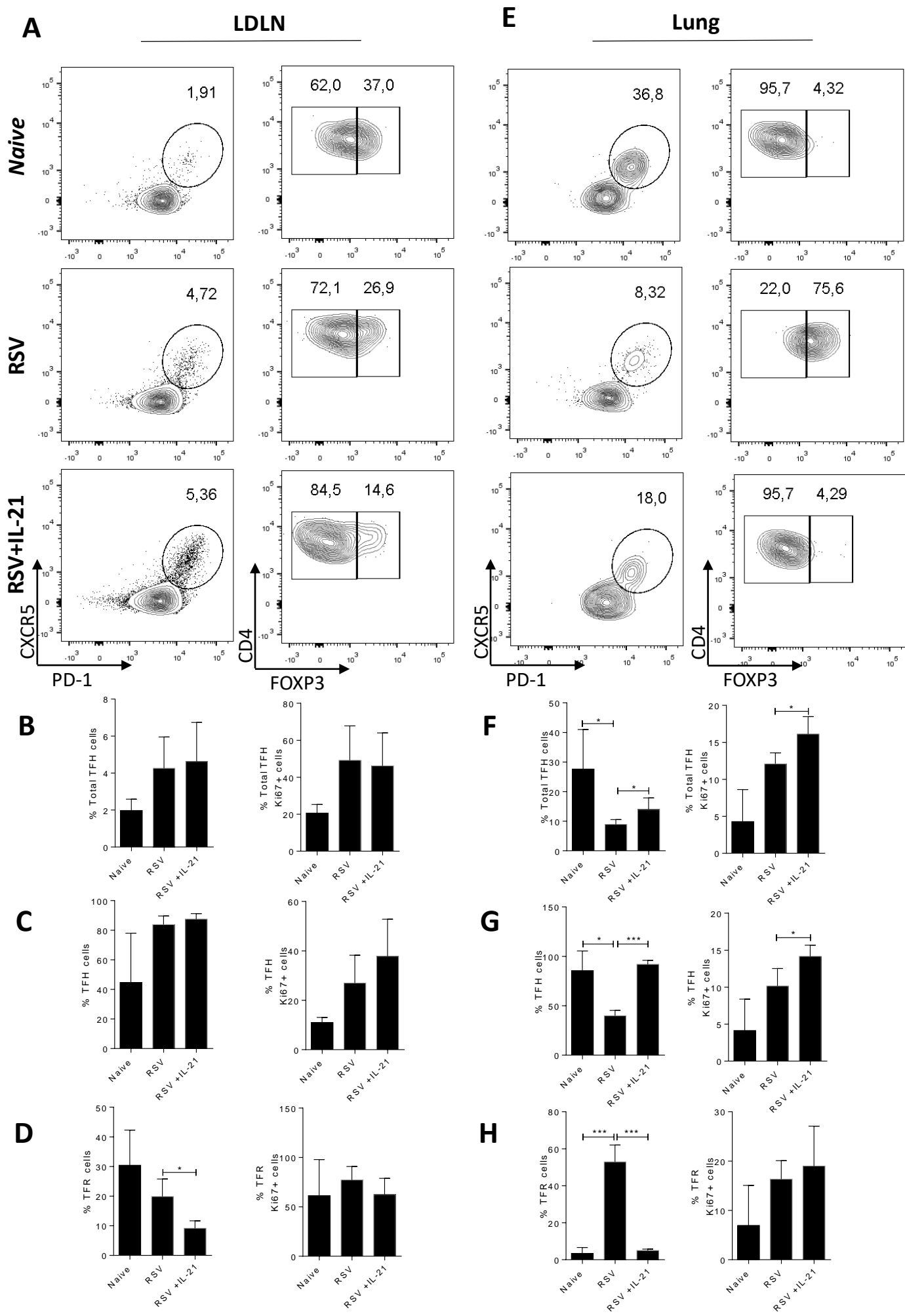
FIGURE 3

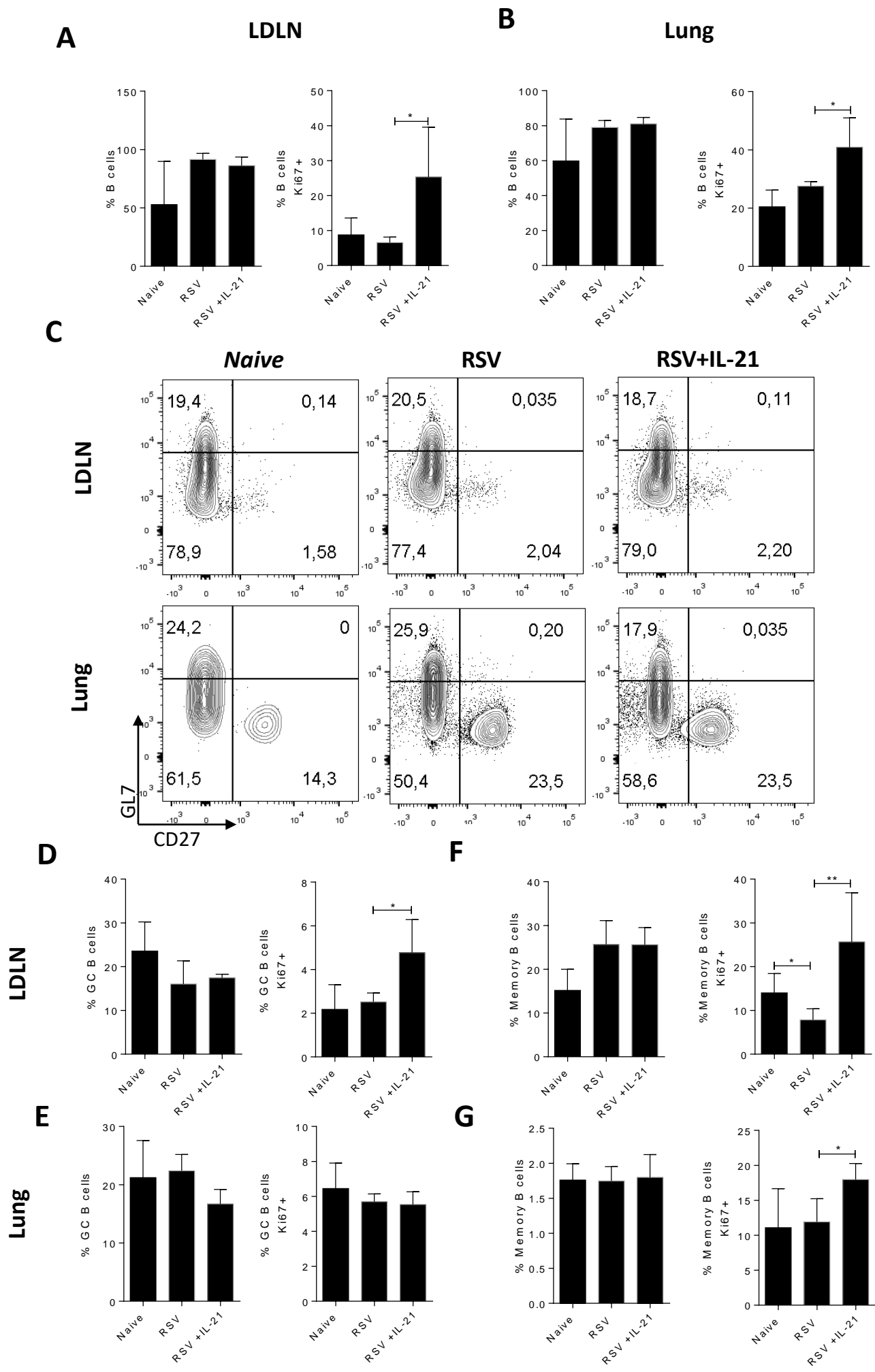
FIGURE 4

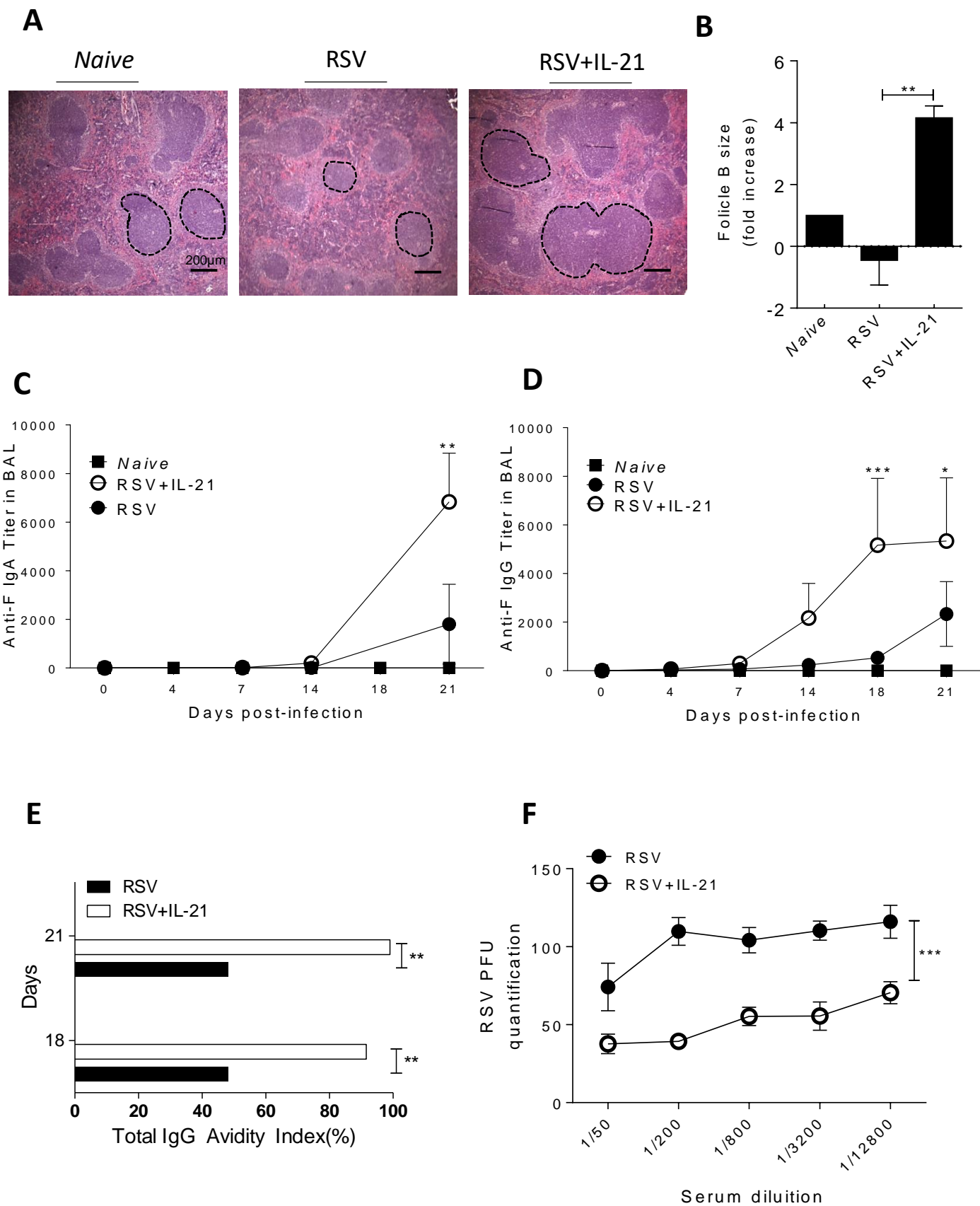
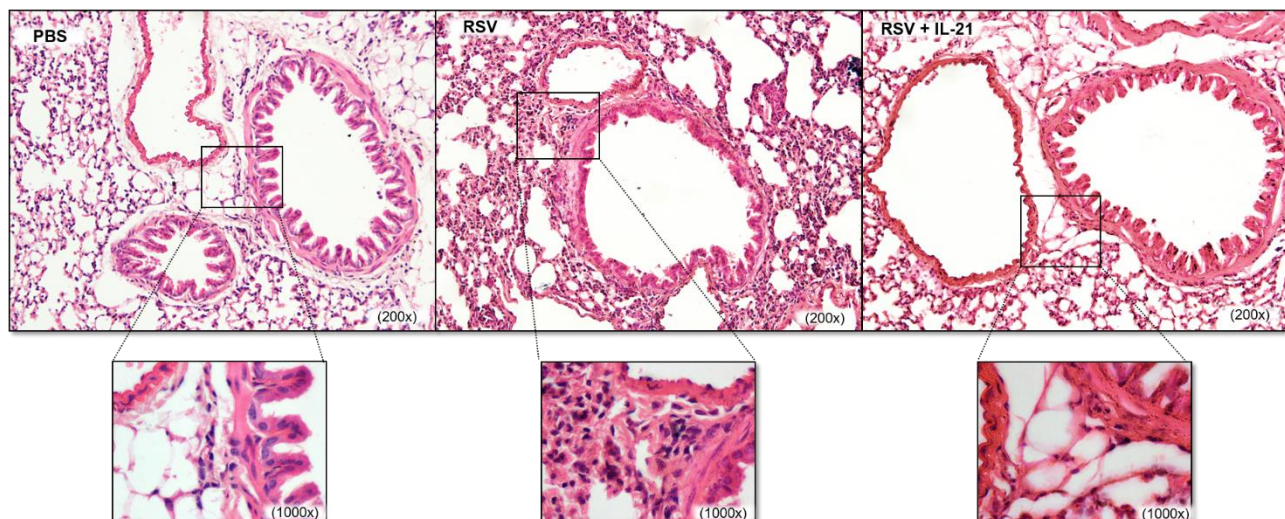
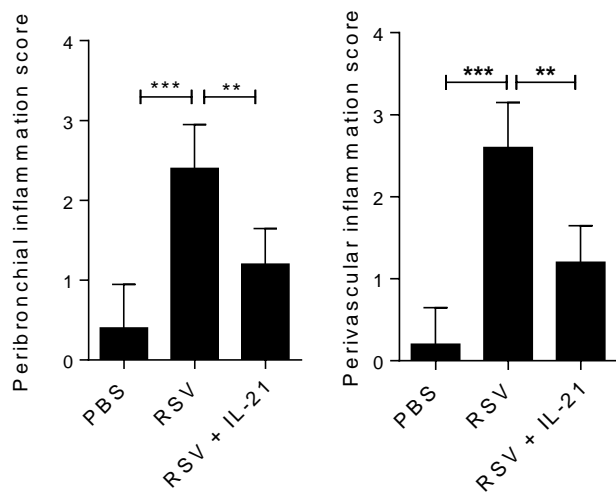
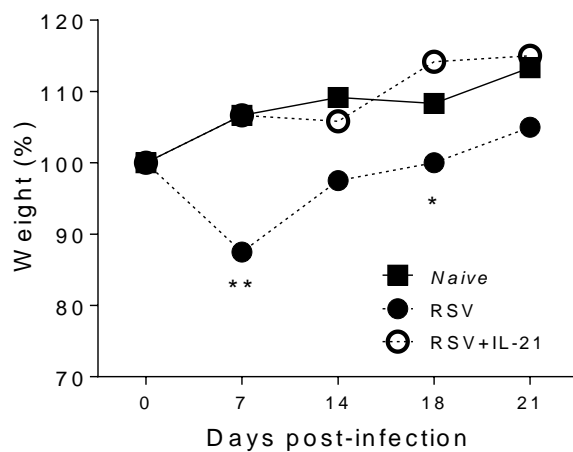
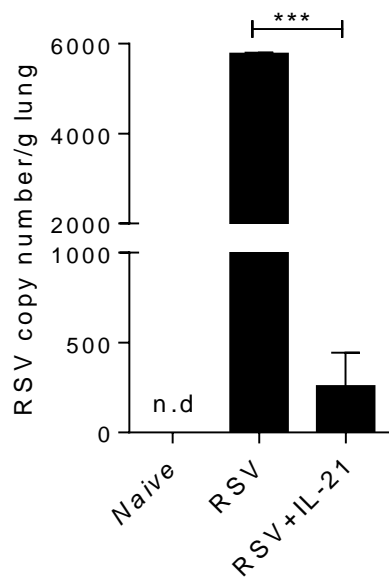
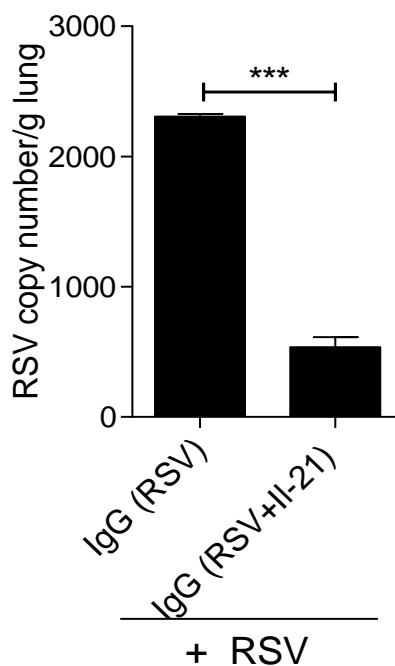
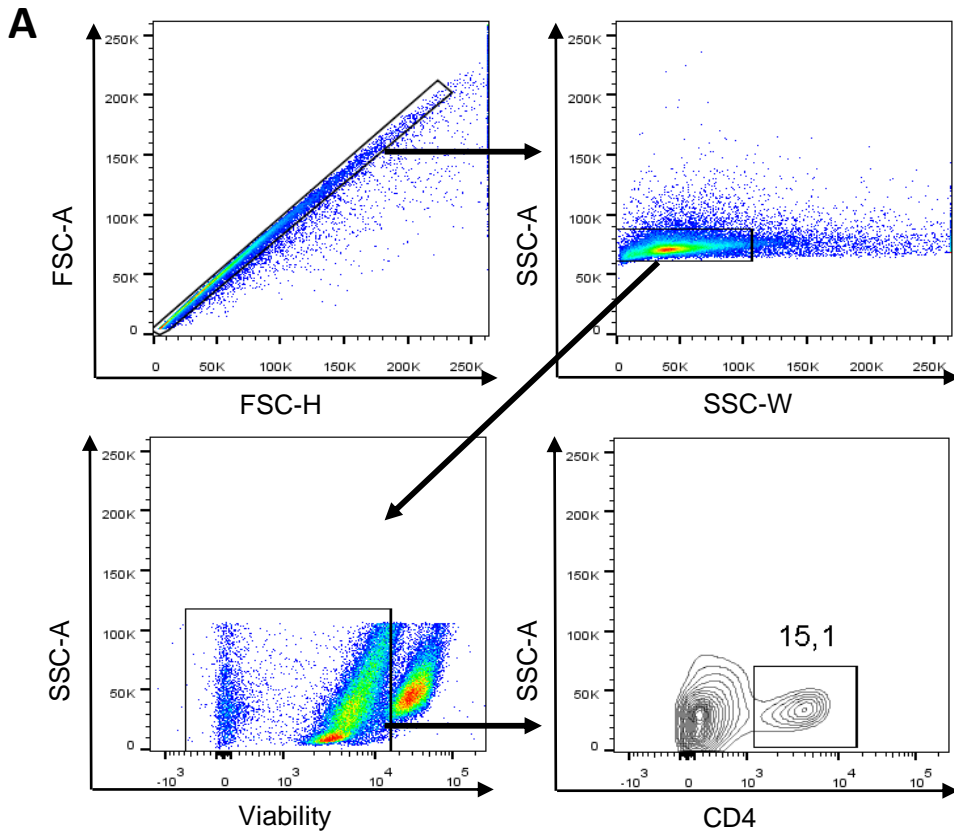
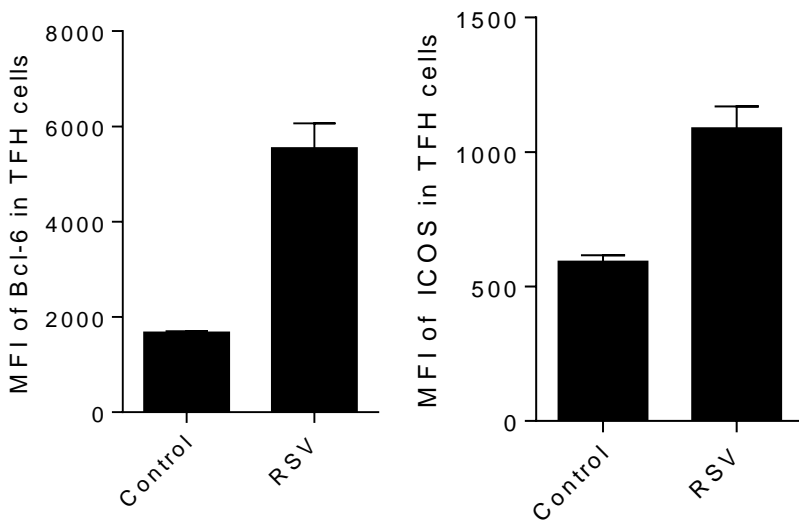
FIGURE 5

FIGURE 6**A****B****C****D****E**

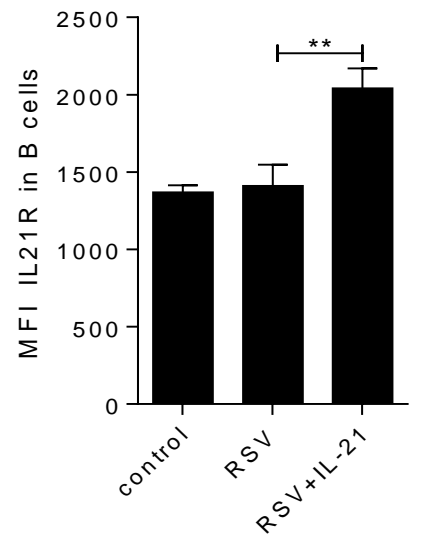
SUPPLEMENTARY 1



B

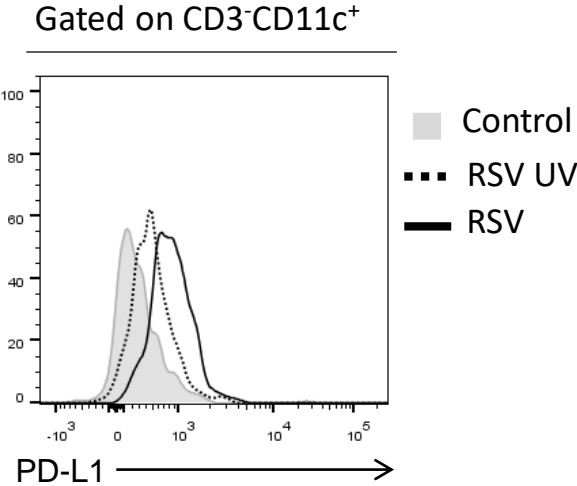


C

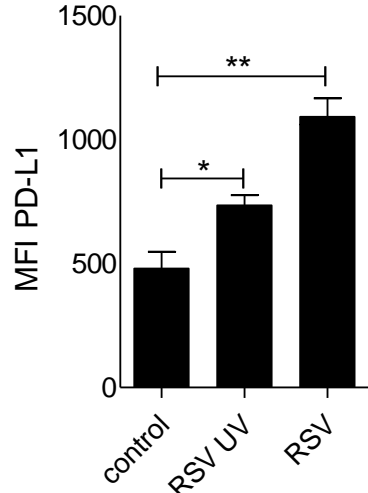


SUPPLEMENTARY 2

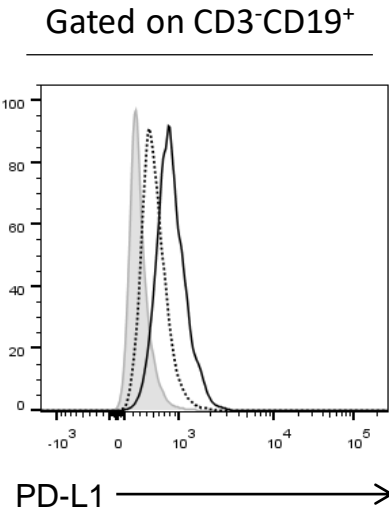
A



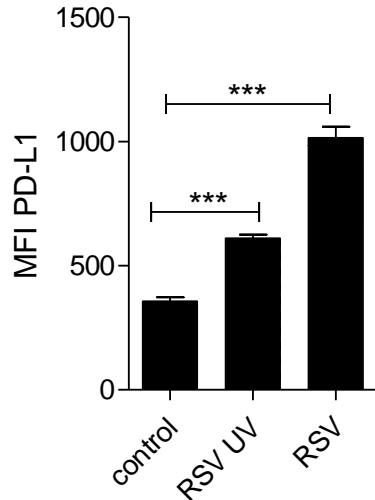
B



C

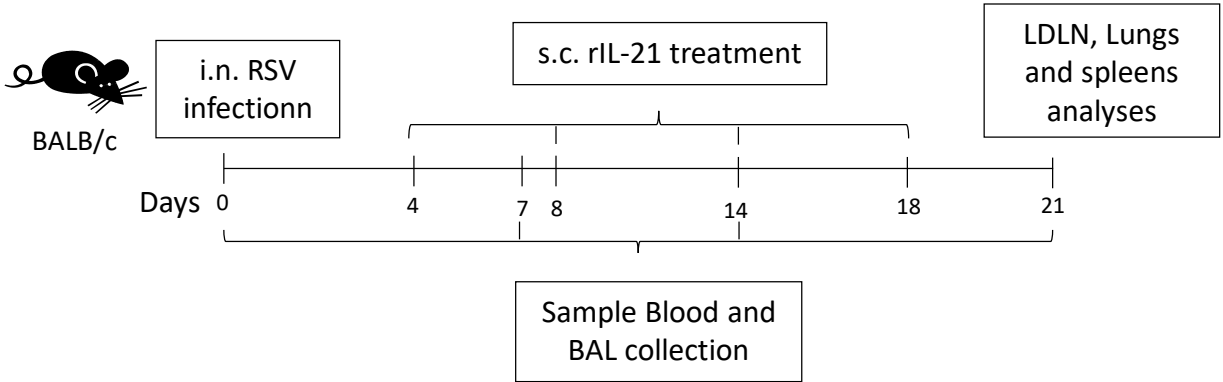


D

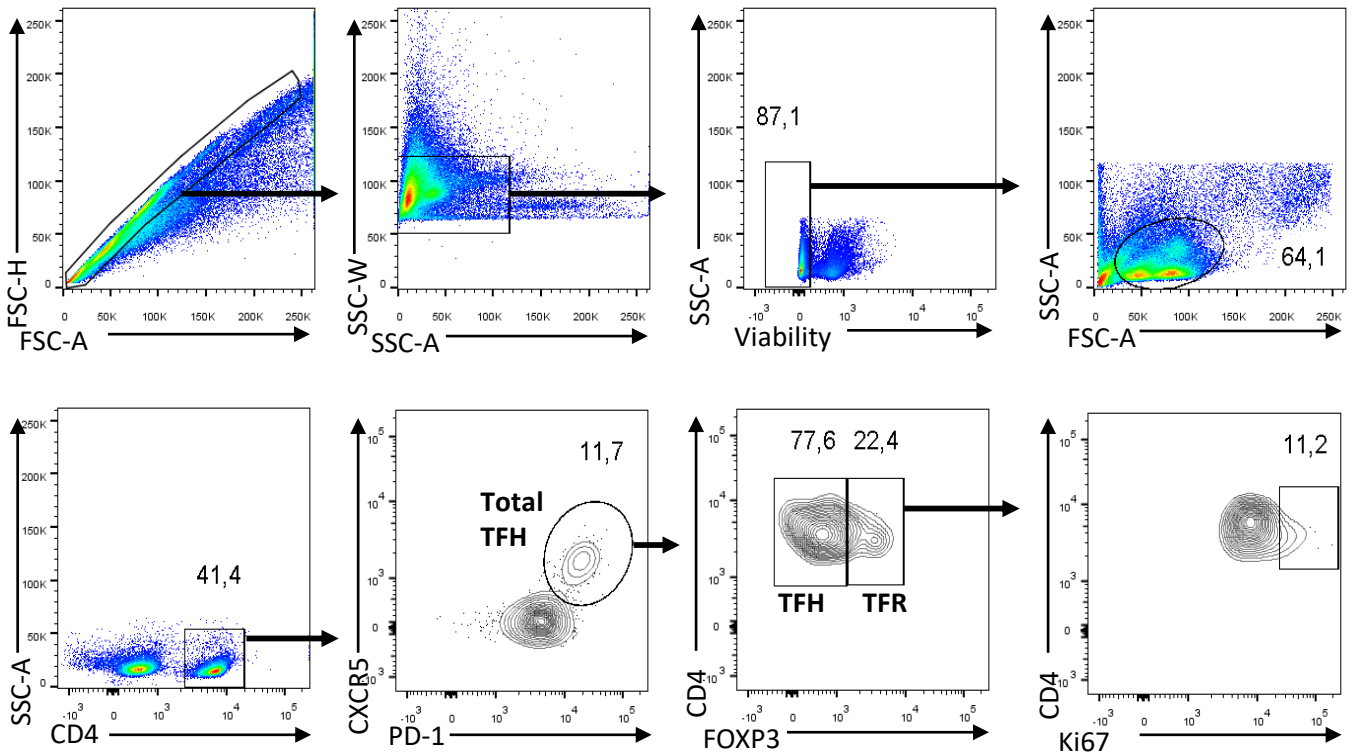


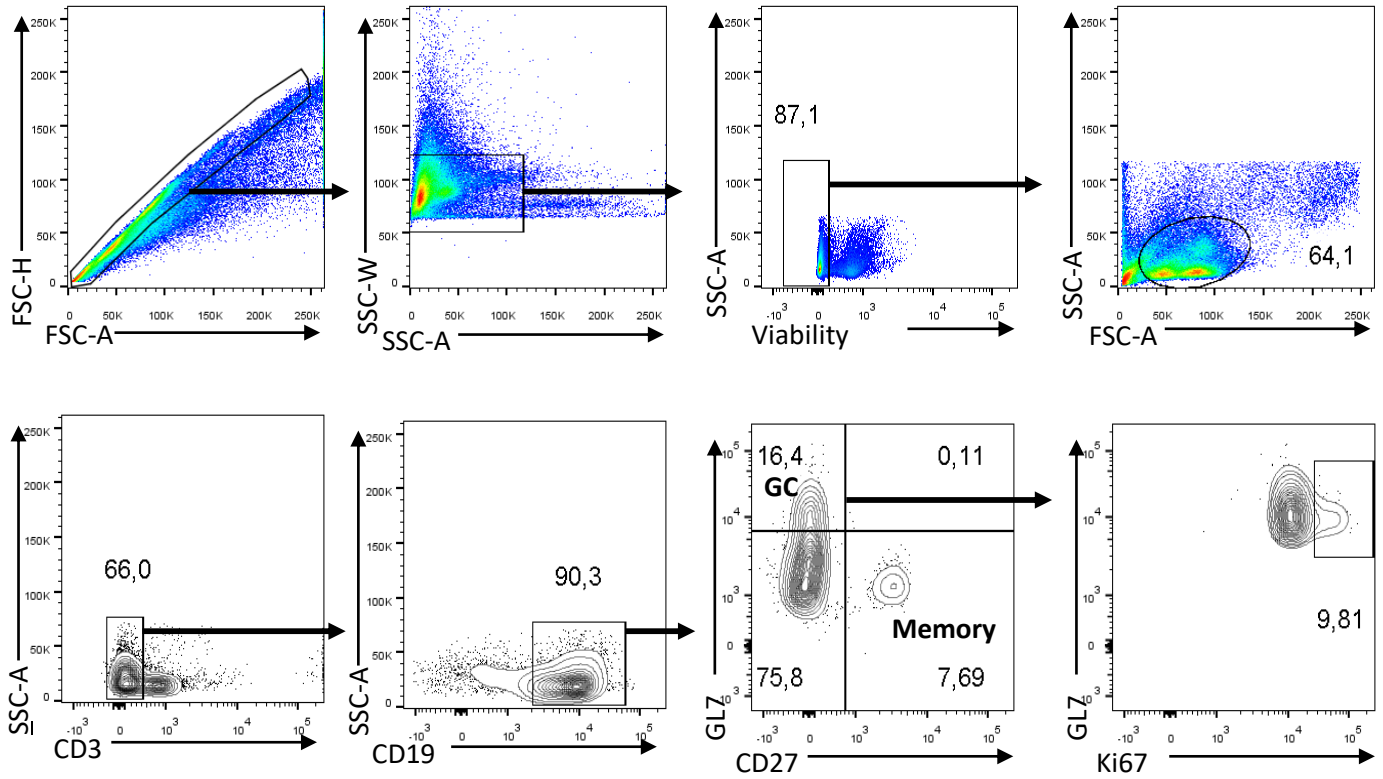
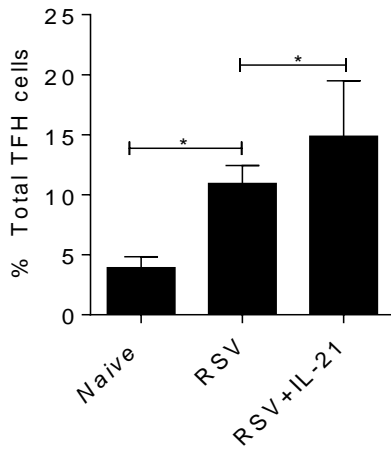
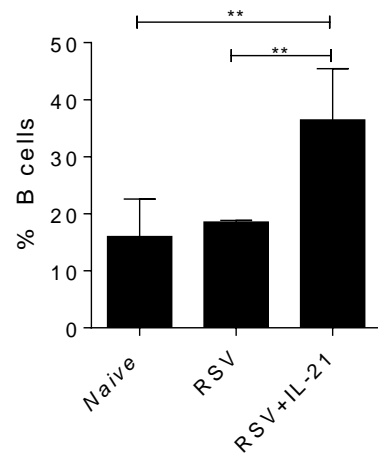
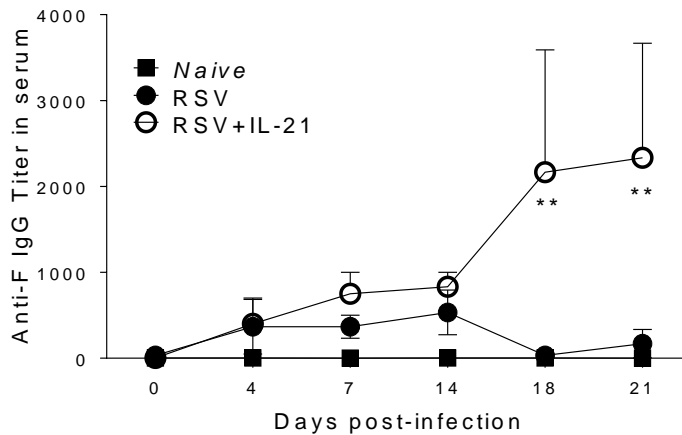
SUPPLEMENTARY 3

A



B



C**SUPPLEMENTARY 4****A****B****C**

ANEXO 3



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

CEUA –COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO: Aprovado

1) PROTOCOLO Nº: 228/18

Parecer 562/18

2) DATA DO PARECER:9 de maio de 2018

3) TÍTULO DO PROJETO:

Análise da resposta de mucosa em camundongos infectados com o vírus sincicial respiratório e tratados com interleucina 21

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Luiz Carlos Rodrigues Júnior



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 14/2014 - CEUA

Porto Alegre, 12 de março de 2014.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),


A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 13/00379, intitulado **“Estudo do papel da especificidade na diferenciação do fenótipo dos linfócitos T CD4+ Anti-tumorais”**.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está **autorizada** a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Nº de Animais	Espécie	Duração do Projeto
270	Mus musculus	03/2014 – 03/2016

Atenciosamente.


Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber
Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilma. Sra.
Profa. Cristina Bonorino
FABIO
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6681 – P. 99 – Portal Tecnopuc – sala 1512
CEP: 90619-900 – Porto Alegre/RS
Fone: (51) 3353-6365
E-mail: ceua@pucrs.br

ANEXO 4

1. FAZOLO, TIAGO ; **GASSEN, RODRIGO BENEDETTI** ; DE FREITAS, DEISE NASCIMENTO ; BORGES, THIAGO J. ; RIGO, MAURÍCIO MENEGATTI ; DA SILVA, RODRIGO DORNELLES ; MAITO, FÁBIO ; CUNHA, ALINE ; GASPARIN BUENO MENDES, DANIEL AUGUSTO ; BÁFICA, André ; VARGAS, JOSÉ EDUARDO ; DE SOUZA, ANA PAULA DUARTE ; BONORINO, CRISTINA . Vaccination with RSV M 209-223 peptide promotes a protective immune response associated with reduced pulmonary inflammation. *ANTIVIRAL RESEARCH*, v. 157, p. 102 - 110, 2018.
2. DA LUZ DIAS, RAQUEL ; BASSO, BRUNO ; DONADIO, MÁRCIO VINÍCIUS FAGUNDES ; PUJOL, FRANCESC VENTURA ; BARTRONS, RAMÓN ; HAUTE, GABRIELA VIEGAS ; **GASSEN, RODRIGO BENEDETTI** ; BREGOLIN, HENRIQUE DIAS ; KRAUSE, GABRIELE ; VIAU, CASSIANA ; SAFFI, JENIFER ; NUNES, FERNANDA BORDIGNON ; ROSA, JOSÉ LUIS ; DE OLIVEIRA, JARBAS RODRIGUES . Leucine reduces the proliferation of MC3T3-E1 cells through DNA damage and cell senescence. *TOXICOLOGY IN VITRO*, v. 48, p. 1-10, 2018.
3. LIMA, KELLY GOULART ; KRAUSE, GABRIELE CATYANA ; DA SILVA, ELISA FELLER GONÇALVES ; XAVIER, LÉDER LEAL ; MARTINS, LÉO ANDERSON MEIRA ; ALICE, LAURA MANZOLI ; DA LUZ, LUIZA BUENO ; **GASSEN, RODRIGO BENEDETTI** ; FILIPPICHIOLA, EDUARDO CREMONESE ; HAUTE, GABRIELA VIEGAS ; GARCIA, MARIA CLAUDIA ROSA ; FUNCHAL, GISELLE AFONSO ; PEDRAZZA, LEONARDO ; REGHELIN, CAMILLE KIRINUS ; DE OLIVEIRA, JARBAS RODRIGUES . Octyl gallate reduces ATP levels and Ki67 expression leading HepG2 cells to cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis. *TOXICOLOGY IN VITRO*, v. 48, p. 11-25, 2018.
4. PEDRAZZA, LEONARDO ; CUNHA, ALINE ANDREA ; LUFT, CAROLINA ; NUNES, NAILÊ KARINE ; SCHIMITZ, FELIPE ; **GASSEN, RODRIGO BENEDETTI** ; BREDÁ, RICARDO VAZ ; DONADIO, MARCIO VINÍCIUS FAGUNDES ; DE SOUZA WYSE, ANGELA TEREZINHA ; PITREZ, PAULO MARCIO CONDESSA ; ROSA, JOSE LUIS ; DE OLIVEIRA, JARBAS RODRIGUES . Mesenchymal Stem Cells Improves Survival in LPS-induced Acute Lung Injury Acting through Inhibition of NETs Formation. *Journal of Cellular Physiology (Print)*, v. 232, p. (12):3552-3564 , 2017.
5. KRAUSE, GABRIELE CATYANA ; LIMA, KELLY GOULART ; DIAS, HENRIQUE BREGOLIN ; DA SILVA, ELISA FELLER GONÇALVES ; HAUTE, GABRIELA VIEGAS ; BASSO, BRUNO SOUZA ; **GASSEN, RODRIGO BENEDETTI** ; MARCZAK, ELISA SIMON ; NUNES, RAFAELA SOLE BACH ; DE OLIVEIRA, JARBAS RODRIGUES . Liraglutide, a glucagon-like peptide-1 analog, induce autophagy and senescence in HepG2 cells. *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY*, v. 15, p. 809:32-41, 2017.
6. ANDRADE VOLKART, PRISCYLLA ; **BENEDETTI GASSEN, RODRIGO** ; MÜHLEN NOGUEIRA, BETTINA ; NERY PORTO, BÁRBARA ; EDUARDO VARGAS, JOSÉ ; ARIGONY SOUTO, ANDRÉ . Antitumor activity of resveratrol is independent of

Cu(II) complex formation in MCF-7 cell line. *BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS*, v. 15., p. 3238-3242, 2017.

7. DE SOUZA, ANA PAULA DUARTE ; DE FREITAS, DEISE NASCIMENTO ; FERNANDES, KRIST ELEN ANTUNTES ; DA CUNHA, MARIANA D'AVILA ; FERNANDES, JHEINI LIS ANTUNES ; **GASSEN, RODRIGO BENEDETTI** ; FAZOLO, TIAGO ; PINTO, LEONARDO A. ; SCOTTA, MARCELO ; MATTIELLO, RITA ; PITREZ, PAULO M. ; BONORINO, CRISTINA ; STEIN, RENATO T. . Respiratory Syncytial Virus induces phosphorylation of mTOR at ser2448 in CD8 T cells from nasal washes of infected infants. *Clinical and Experimental Immunology (Print)*, v.183 (2) p. 248-257, 2016.
8. DO NASCIMENTO DE FREITAS, DEISE ; **GASSEN, RODRIGO BENEDETTI** ; FAZOLO, TIAGO ; DE SOUZA, ANA PAULA DUARTE . Rapamycin increases RSV RNA levels and survival of RSV-infected dendritic cell depending on T cell contact. *Toxicology in Vitro*, v. 36, p. 114-119, 2016.
9. FREITAS, DEISE NASCIMENTO DE ; ISAÍÁ, HENRIQUE ATAÍDE ; HENZEL, ANDRÉIA ; SIMÃO, EDER ; **GASSEN, RODRIGO BENEDETTI** ; RODRIGUES JUNIOR, LUIZ CARLOS . Comparative study of lymphocytes from individuals that were vaccinated and unvaccinated against the pandemic 2009-2011 H1N1 influenza virus in Southern Brazil. *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Revista*, v. 48, p. 514-523, 2015.
10. **GASSEN, RODRIGO BENEDETTI**; ROMÃO, PEDRO ROOSEVELT T. ; FREITAS, DEISE NASCIMENTODE ; JUNIOR, LUIZ CARLOS RODRIGUES. Construction and Functional Characterization of a Fusion Protein Interleukin-21/Immunoglobulin for Long-Term In Vivo Biodisponibility. *DNA and Cell Biology*, v. 35(3), p. 146-55, 2015.

ANEXO 5

Submission Confirmation



Thank you for your submission

Submitted to International Immunology

Manuscript ID INTIMM-19-0013

Title RSV DOWNREGULATES IL-21/IL-21R ON TFH CELLS VIA PD-L1 INDUCTION IN APCS IMPAIRING PROTECTIVE HUMORAL RESPONSES

Authors Benedetti Gassen, Rodrigo
Fazolo, Tiago
Nascimento de Freitas, Deise
Borges, Thiago Jesus
Antunes, Gessica
Maito, Fábio
Mendes, Daniel A. G. Bueno
Báfica, André
Muller, Douglas
Rodrigues Junior, Luiz Carlos
Duarte de Souza, Ana Paula
Bonorino, Cristina

Date Submitted 15-Jan-2019

[Author Dashboard](#) >