



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE  
PREGRADO

# **DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE ESTIMULACIÓN CRÓNICA DE LINFOCITOS T CD8<sup>+</sup> PARA LA EVALUACIÓN DEL ROL DEL RECEPTOR DE ADENOSINA A2A (A2AR) EN EL ESTABLECIMIENTO DEL AGOTAMIENTO**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial  
delos requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

**José Luis Corrales Bermúdez**

**Directora del Seminario de Título**

Daniela Sauma Mahaluf

**Co directora**

María Rosa Bono

Julio 2023  
Santiago - Chile





## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile que el seminario de Título, presentado por el **Sr. José Luis Corrales Bermúdez**

**“Desarrollo de un protocolo de estimulación crónica de linfocitos T CD8<sup>+</sup> para la evaluación del rol del receptor de adenosina A2A (A2AR) en el establecimiento del agotamiento”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dra. Daniela Sauma  
**Directora Seminario de Título**

---

Dra. María Rosa Bono  
**Directora Seminario de Título**

---

### **Comisión Revisora y Evaluadora**

Dr. Mario Rosemblatt  
**Presidente Comisión**

---

Dr. Dante Miranda  
**Evaluador**

---

Santiago de Chile, marzo 2023

## Biografía



José Luis Corrales Bermúdez, nacido el 10 de marzo de 1997

Nacido y crecido en Maracay, Venezuela, de padre chileno y madre venezolana, llegó a Chile en octubre del 2014 luego de terminar su enseñanza media en el Instituto Escuela Maracay ese mismo año.

Siempre impulsado por el amor a sus mascotas, pasó su infancia rodeado de distintos animales en la ciudad de Apure, en Venezuela, y años después en su adultez temprana enfocó su amor a sus gatos: Federico, Celestina y Coco, quienes lo impulsaron y ayudaron durante su carrera universitaria.

En el año 2022, tras despertar su interés por la inmunología el año previo, hizo una unidad de investigación en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile bajo la tutoría de la Dra. Daniela Sauma, donde continuó trabajando para su seminario de título, ahora además con la guía de la Dra. María Rosa Bono como cotutora.

## Dedicatoria

*A mis gatos;*

*Federico, siempre en mi corazón*

*Celestina, siempre cuidándonos*

*Coco, siempre queriendo nuestra atención*

## **Agradecimientos**

Nunca pierdo la oportunidad de hablar de mis gatos, y los agradecimientos no solo de este trabajo, sino de haber seguido adelante durante todos estos años va para ellos. Cada uno se unió a mi familia en un momento determinante y, sin duda alguna, cambiaron la vida de todos los integrantes de esta de manera muy positiva, siempre siendo un centro común de amor para todos quienes los han conocido.

También he de agradecer a mi familia (humana) cuyo apoyo ha sido primordial para estar donde estoy. Mamá, papá, hermana y hermano, quienes me han impulsado de una manera u otra, directa o indirectamente, y quienes han creído en mí mucho más de lo que yo creía en mí durante este proceso.

No puedo no mencionar a las personas que me ayudaron a sentirme en casa por primera vez en este país en un principio tan ajeno; Ashley, Carla y Maite, me hicieron sentir querido y parte de un círculo de amistad increíble, que me sigue ayudando a día de hoy y sin el cual, sin duda, esto habrá sido muchísimo más difícil. A Kari, por compartir los altos y bajos que hemos vivido dentro de la carrera, a la cual le estoy eternamente agradecido por permitir ser amigos.

Por último, pero no menos importante, agradecer al equipo Inmunolab, en especial a la Dra. Daniela Sauma, por toda la guía, apoyo y enseñanza que me brindaron durante mi año como parte del laboratorio. Muy agradecido de haber sido parte, y feliz de haber tomado la decisión de hacer este trabajo en el laboratorio.

## Índice de contenido

<b>Biografía</b> .....	<b>ii</b>
<b>Dedicatoria</b> .....	<b>iii</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>iv</b>
<b>Índice de contenido</b> .....	<b>iv</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>vii</b>
<b>Índice de abreviaturas</b> .....	<b>viii</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>10</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>12</b>
<b>3. Introducción</b> .....	<b>14</b>
3.1 <i>Agotamiento de células T</i> .....	14
3.3 <i>La adenosina y su rol en el agotamiento</i> .....	19
<b>4. Materiales y métodos</b> .....	<b>22</b>
4.1 <i>Animales</i> .....	22
4.2 <i>Enriquecimiento de células T CD8<sup>+</sup></i> .....	22
4.3 <i>Cultivo celular</i> .....	23
4.4 <i>Anticuerpos</i> .....	25
4.5 <i>Citometría de flujo</i> .....	26
4.6 <i>Análisis de datos</i> .....	27
4.7 <i>Genotipificación ratones A2AR KO</i> .....	27
<b>5. Resultados</b> .....	<b>29</b>
5.1 <i>Estandarización del protocolo de cultivo de células T CD8<sup>+</sup> murinas incubadas con beads anti CD3/CD28</i> .....	29
5.2 <i>Análisis de expresión de marcadores de agotamiento con IL-7 e IL-15</i> .....	31
5.3 <i>Análisis de expresión de marcadores de agotamiento con IL-2 e IL-12</i> .....	33
5.4 <i>Análisis de expresión de marcadores de activación</i> .....	36
5.5 <i>Activación e inhibición farmacológica del A2AR</i> .....	38
5.6 <i>Agotamiento en ratones knockout condicionales para A2AR (A2ARKO)</i> .....	40

<b>6. Discusión .....</b>	<b>45</b>
<i>6.1 Estandarización del protocolo de cultivo de células T CD8<sup>+</sup> murinas incubadas con beads anti CD3/CD28.....</i>	<i>45</i>
<i>6.2 Inhibición y activación farmacológica de A2AR. ....</i>	<i>47</i>
<i>6.3 Agotamiento en ratones knockout condicionales para A2AR.....</i>	<i>48</i>
<b>7. Proyecciones .....</b>	<b>49</b>
<b>8. Conclusiones .....</b>	<b>50</b>
<b>9. Bibliografía.....</b>	<b>52</b>
<b>10. Anexo.....</b>	<b>58</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1. Estrategia de cultivo de células T CD8<sup>+</sup> para la diferenciación de células agotadas.</b> .....	<b>30</b>
<b>Figura 2. Análisis de marcadores PD1 y TIM3 en cultivos de agotamiento con IL-7/IL-15</b> .....	<b>32</b>
<b>Figura 3. Análisis de marcadores PD1 y TIM3 en cultivos de agotamiento con IL-2/IL-12.</b> .....	<b>35</b>
<b>Figura 4. Análisis de marcadores de activación CD25 y CD69 en cultivos de agotamiento.</b> .....	<b>37</b>
<b>Figura 5. Marcadores de agotamiento para cultivos con inhibición o activación farmacológica de A2AR</b> .....	<b>39</b>
<b>Figura 6. Genotipificación de ratones A2AR KO</b> .....	<b>41</b>
<b>Figura 7. Marcadores PD1 y TIM3 en cultivos de agotamiento utilizando células WT y A2ARKO</b> .....	<b>42</b>
<b>Figura 8. Análisis de factores de transcripción TCF1 y TOX en cultivos de células agotadas.</b> .....	<b>44</b>
<b>Figura suplementaria 1. Expresión de CD44 y CD62L y poblaciones de células T CD8<sup>+</sup> en ratones OT-I y A2ARKO (TCR WT)</b> .....	<b>58</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla I. Genotipificación de ratones A2AR KO.</b> .....	<b>27</b>
--	-----------

## Índice de abreviaturas

ADP: Adenosín difosfato

AMP: Adenosín monofosfato

ATP: Adenosín trifosfato

FBS: Suero fetal bovino

FSC-A: Área de la señal de dispersión frontal

FSC-H: Altura de la señal de dispersión frontal

IFN- $\gamma$ : Interferón gama

IL-12: Interleuquina 12

IL-15: Interleuquina 15

IL-2: Interleuquina 2

IL-7: Interleuquina 7

KO: *knockout*

NK: *Natural Killer*

PBS: Tampón fosfato salino

PD1: *programmed death 1 molecule*

RPMI 1640: Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute 1640

SSC-A: Área de la señal de dispersión lateral

TCR: Receptor de células T

TIGIT: *T-Cell Immunoreceptor with Ig and ITIM Domains*

TIM3: *T cell immunoglobulin and mucin domain containing protein 3*

TNF: Factor de necrosis tumoral

## Resumen

Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> son células del sistema inmune adaptativo que, una vez activadas por células presentadoras de antígenos, se diferencian a células citotóxicas cumpliendo un rol importante en la respuesta inmune antitumoral. Sin embargo, en los tumores, las células T citotóxicas entran en un estado hipofuncional llamado agotamiento debido a la exposición crónica al antígeno. El microambiente tumoral además presenta una gran concentración de adenosina, molécula que promueve un entorno inmunosupresor. Al unirse al receptor A2A (A2AR), la adenosina suprime la actividad citotóxica y la capacidad de producir citoquinas por parte de las células T CD8<sup>+</sup>, desconociéndose aun si este nucleósido cumple un papel en la inducción del agotamiento. Así, el objetivo de este trabajo es desarrollar un protocolo de activación crónica *in vitro* de los linfocitos T CD8 de manera de intentar dilucidar el rol del A2AR en el establecimiento del agotamiento. Para esto, en primer lugar, se desarrolló un protocolo de activación crónica de células T CD8<sup>+</sup> utilizando *beads* conjugadas con anticuerpos anti CD3/CD28 para estimular al receptor del linfocito T en presencia de diferentes citoquinas. Utilizando este protocolo de activación en presencia de un medio suplementado con IL-7 e IL-15, pudimos obtener células que presentan un fenotipo de agotamiento pero que mantienen características de células troncales. Por el contrario, al suplementar el medio con IL-2 e IL-12, se obtuvo un mayor porcentaje de células con un fenotipo de terminalmente agotadas. A continuación, para evaluar el papel de A2AR en el establecimiento del agotamiento *in vitro*, se realizó una aproximación farmacológica utilizando un antagonista (SCH58621) y un agonista (NECA) del receptor A2A, obteniendo resultados que sugieren que la señalización a través de A2AR reduce el agotamiento. Finalmente, se utilizaron células T CD8<sup>+</sup> de ratones *knockout* condicionales para A2AR en los cultivos *in vitro* para evaluar la participación de A2AR en el

agotamiento de las células T CD8<sup>+</sup>. Sin embargo, utilizando esta estrategia no fue posible encontrar diferencias en el agotamiento en células T CD8<sup>+</sup> A2ARKO en comparación con células T CD8<sup>+</sup> WT, lo que sugiere que la delección del A2AR no afecta el establecimiento del agotamiento de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en las condiciones de diferenciación *in vitro* analizadas en este trabajo. En conclusión, en este trabajo se logró generar un protocolo de activación policlonal para la diferenciación de células T CD8<sup>+</sup> agotadas *in vitro*. Además, los resultados indican que el bloqueo farmacológico de los receptores de adenosina mediante la utilización del antagonista SCH58261, aumenta la frecuencia de células agotadas terminalmente diferenciadas, lo cual sugiere que la activación de los receptores A2AR reduce el agotamiento terminal *in vitro*.

## **Abstract**

CD8<sup>+</sup> T lymphocytes are cells of the adaptative immune system that once activated by antigen-presenting cells, differentiate into cytotoxic cells, fulfilling an essential role in the antitumor immune response. However, cytotoxic T cells enter a hypofunctional state in tumors called exhaustion due to the chronic exposure to tumor antigens. The tumor microenvironment also presents a high adenosine concentration, a molecule known to promote an immunosuppressive environment. By binding to the A2A receptor (A2AR), adenosine suppresses cytotoxic activity and the ability to produce cytokines by CD8<sup>+</sup> T cells, although it is not yet clear whether this nucleoside plays a role in inducing exhaustion. Thus, this work aims to develop a protocol to chronically activate CD8<sup>+</sup> T cells *in vitro* to elucidate the role of A2AR in establishing the differentiation of exhausted CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. First, a CD8<sup>+</sup> T cell chronic activation protocol was developed using anti-CD3/CD28 conjugated beads to stimulate the T lymphocyte receptor in the presence of different cytokines. Using this activation protocol in a medium supplemented with IL-7 and IL-15, we obtained cells that display an exhaustion phenotype but maintain stem cell characteristics.

On the other hand, when supplementing the medium with IL-2 and IL-12, a higher percentage of cells with a terminal exhaustion phenotype was obtained. Next, to evaluate the role of A2AR in the establishment of exhaustion *in vitro*, a pharmacological approach was carried out using an antagonist (SCH58621) and an agonist (NECA) of the A2A receptor, obtaining results that suggest that signaling through A2AR reduces CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion. Finally, CD8<sup>+</sup> T cells from A2AR conditional knockout mice were used in *in vitro* cultures to further assess the role of A2AR in CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion. However, using this approach, it was not possible to find differences in the exhaustion of CD8<sup>+</sup>

A2ARKO T cells compared to CD8<sup>+</sup> WT T cells, suggesting that A2AR deletion does not affect the establishment of CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion under the differentiation conditions analyzed in this work. In conclusion, in this work, it was possible to generate a polyclonal activation protocol for the differentiation of exhausted CD8<sup>+</sup> T cells *in vitro*. In addition, the results indicate that pharmacological blockade of adenosine receptors using the antagonist SCH58261 increases the frequency of differentiated terminally exhausted T cells, suggesting that A2AR activation reduces terminal exhaustion *in vitro*.

### **3. Introducción**

#### **3.1 Agotamiento de células T**

Cuando el sistema inmune se enfrenta a una infección o un estímulo agudo no persistente, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> se diferencian en una población de células efectoras o citotóxicas capaces de atacar y eliminar directamente los patógenos. Estas células se caracterizan por producir altos niveles moléculas efectoras como IFN- $\gamma$ , TNF, perforina y granzima B. Los linfocitos T citotóxicos tienen una alta capacidad proliferativa, pero son células de vida corta, disminuyendo rápidamente su número una vez que la infección ha sido eliminada (Kaech & Wherry, 2007). A diferencia de células efectoras de vida corta, las células de memoria persisten en el tiempo (Williams & Bevan, 2007) y pueden ser reactivadas rápidamente ante un nuevo encuentro con el patógeno. Las células de memoria pueden migrar a tejidos linfoides secundarios u otros tejidos, poseen un gran potencial proliferativo y de supervivencia sin la necesidad de estar presente el antígeno, representando así una protección inmune por parte de estas células en el tiempo (Lalvani y col., 1997 & Flynn y col., 1998).

Frente a una estimulación crónica debido a la presencia persistente en el tiempo del antígeno, las células T desarrollan un estado llamado agotamiento, caracterizado por pérdida o disminución de funciones efectoras por parte de las células T de manera progresiva en el tiempo de la infección (Wherry y col., 2003). El agotamiento fue originalmente estudiado en el contexto de infecciones virales, pero recientemente también ha sido estudiado en el cáncer, donde se ha reportado que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> infiltrantes presentan una actividad efectora baja ante un tumor en crecimiento (Hellström y col., 1968). En el tumor se han descrito poblaciones heterogéneas de células T con

diferentes niveles de sobrevida y actividad, pero que no son capaces de eliminar completamente el tumor (Zajac y col., 1998).

El agotamiento se caracteriza por la reducción gradual de las capacidades proliferativas, citotóxicas y de expresión de citoquinas por parte de las células T. De manera temprana en el establecimiento del agotamiento, se pierde la capacidad de producir interleuquina 2 (IL-2), importante factor de crecimiento y expansión para células T activadas (Gaffen & Liu, 2004) y el factor de necrosis tumoral (TNF), involucrado en la inflamación sistémica en la respuesta inmune (González-Flores y col., 2014), mientras que la producción de interferón- $\gamma$ , un importante activador de macrófagos (Kosmidis y col., 2018), se pierde de manera más tardía (Wherry y col., 2003). Cuando la carga antigénica presente es elevada, esta pérdida gradual de la secreción de citoquinas se traduce en una reducción casi completa de las capacidades citotóxicas y efectoras por parte de las células, seguida por la muerte o eliminación de éstas (Moskophidis y col., 1993). Es importante mencionar que, a pesar de que las células agotadas presentan una reducida capacidad efectora, éstas siguen manteniendo cierto grado de control sobre el crecimiento tumoral o replicación viral (Speiser y col., 2014; Philip & Schietinger, 2019).

Además de la disminución de las funciones efectoras, el establecimiento del agotamiento va acompañado de la expresión de receptores inhibitorios de superficie, los cuales determinan el funcionamiento de las células T CD8<sup>+</sup> (Virgin y col., 2009). Estos receptores inhibitorios, también llamados puntos de control inmune o *immune-checkpoints*, tienen una función en la restricción del funcionamiento y activación de las células T para evitar la sobre activación de la respuesta inmune, evitando así una excesiva inflamación o incluso el desarrollo de una respuesta autoinmune por parte de las células citotóxicas (Keir y col., 2007). Entre estos receptores inhibitorios se encuentra

PD1 (*programmed death 1 molecule*) o CD279, un inhibidor tanto de la respuesta inmune innata como de la respuesta adaptativa, que es expresado en células T, NK, B activadas, macrófagos, células dendríticas y monocitos, y de manera importante, es altamente expresado en células T específicas contra tumores (Ahmadzadeh y col., 2009). El ligando de PD1, PD-L1, puede expresarse en macrófagos, células T y B activadas, células dendríticas y algunas células epiteliales (Sharpe y col., 2007), pero también en células tumorales, actuando como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune (Ohaegbulam y col., 2015). De esta manera, PD1 puede llevar a cabo dos roles opuestos. Por un lado, limita la actividad de la respuesta inmune excesiva o que es ineficiente por parte de las células, ayudando a mantener la tolerancia y la homeostasis del sistema inmune, pero por otro lado, puede estar interfiriendo con la respuesta inmune que sí es necesaria, permitiendo la progresión tumoral y el avance de la infección o enfermedad (Salmaninejad y col., 2017).

Aunque caracterizadas por la expresión de PD1, las células agotadas no están limitadas a la expresión de este receptor, sino que es posible identificar poblaciones heterogéneas con distintos grados de agotamiento en función de los llamados receptores inhibitorios que expresen estas poblaciones. Así, se pueden encontrar poblaciones de células T terminalmente agotadas, las cuales expresan receptores inhibitorios adicionales a PD1, entre los que destacan: la inmunoglobulina de células T que contiene dominio de mucina-3 (TIM3), que juega un rol esencial inhibiendo la respuesta Th1 y la expresión de citoquinas como TNF e IFN- $\gamma$  y cuya desregulación de su expresión ha sido asociada con enfermedades autoinmunes (Das y col., 2017); el gen de activación de linfocitos 3 (LAG-3), un marcador de activación tanto de células T CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup> (Huard y col., 1994) y que en estudios con animales *knockout* para LAG-3 se confirmó

que cumple un rol regulando la proliferación de las células T CD8<sup>+</sup> (Workman y col., 2004; Grosso y col., 2007); 2B4 (o CD244) el cual es expresado en células NK y en células T CD8<sup>+</sup> activadas y su expresión es mantenida en células agotadas, donde disminuyen o incluso previenen la expresión de TNF e IFN- $\gamma$  (Vivier & Anfossi, 2004); y por último TIGIT, la inmunoglobulina de células T y dominio ITIM, expresada en células NK y células T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y células T reguladoras, un regulador negativo los linfocitos citotóxicos (Manieri y col., 2017) el cual cumple un rol central limitando la respuesta anti tumoral (Yu y col., 2008). Además de estas proteínas efectoras, estudios recientes han demostrado que TOX es un factor de transcripción fuertemente involucrado en el establecimiento del agotamiento en células T CD8<sup>+</sup> (Sekine y col., 2020), donde una expresión mantenida de TOX induce recombinación cromosómica y cambios en la transcripción del RNA, inhibiendo la diferenciación a células T efectoras y favoreciendo al estado agotado (Liang y col., 2021).

### **3.2 Células precursoras del agotamiento**

En los inicios del estudio del agotamiento se creía que todas las células agotadas presentaban el mismo grado de disfunción caracterizado por la disminución en la expresión de citoquinas efectoras, así como baja de la capacidad proliferativa (Zajac y col., 1998). Sin embargo, observaciones de que el pool de células agotadas podía mantenerse por un largo tiempo sin el reclutamiento *de novo* de células T sugería que la mantención a largo plazo se debía a mecanismos propios de estas células T (Miller y col., 2005). Es así que con experimentos de transferencia adoptiva de células se demostró que una subpoblación de células T agotadas podía sobrevivir por un largo tiempo y retenían la habilidad de llevar a cabo una respuesta al ser re-estimuladas (Utzschneider y col., 2013). Estos datos fueron los primeros en sugerir que la respuesta

por parte de las células T agotadas era mantenida en gran parte por una subpoblación de células con características de células de memoria, las cuales iban renovando el pool de células efectoras terminalmente agotadas (Speiser y col., 2014). Es así como se describió una población de células T que compartían algunas características de células agotadas, tales como la expresión de PD1, pero que no expresaban otros marcadores de agotamiento como TIM-3 o 2B4, a diferencia de las células terminalmente agotadas (Kallies y col., 2019). Otro aspecto importante de esta población de células T agotadas con características de células de memoria, era la expresión del factor de transcripción TCF1, el cual no es expresado en las células terminalmente agotadas (Utzschneider y col., 2016). Experimentos de transferencia adoptiva mostraron que las células agotadas TCF1<sup>+</sup> podían repoblar y mantener una respuesta en el caso de infecciones crónicas o tumores, mientras que las células agotadas TCF1<sup>-</sup> no eran capaces de mantener esta respuesta ni repoblar el *pool* de células T agotadas (Miller y col., 2019). Lo que es más, la descendencia de estas células T agotadas TCF1<sup>+</sup> consistía de células T con características de memoria y de células terminalmente agotadas indicando no solo la capacidad de auto renovación de estas células, sino que sirven de precursoras para las células agotadas (Utzschneider y col., 2016). Es así como nace el concepto de esta población de células T agotadas que co-expresan PD1 y TCF1, capaces de auto renovación y de dar origen a células T agotadas. Kallies y col., (2019) proponen la nomenclatura de células T precursoras de células T agotadas, o T<sub>pex</sub>, distinguiéndolas de las células T terminalmente agotadas, o T<sub>ex</sub>.

En nuestro laboratorio se ha desarrollado un protocolo adaptado de Zhao y col. para generar células T CD8<sup>+</sup> con un fenotipo agotado a partir de células T de ratones OT-I, cuyo receptor de células T (TCR) tiene especificidad para el péptido SIINFEKL de

la ovoalbúmina. Sin embargo, este protocolo, que está restringido a un TCR en particular, no permite el estudio del agotamiento en poblaciones de células T cuyos TCR son diferentes de las células OT-I.

### **3.3 La adenosina y su rol en el agotamiento**

En el medio extracelular, el ATP y la adenosina pueden actuar como moléculas mensajeras que terminan modificando de manera positiva o negativa la respuesta inmune. La concentración de ATP puede elevarse en el medio extracelular producto de la liberación de éste por parte de células dañadas, como respuesta al estrés o liberado por células del sistema inmune una vez que son activadas (Schenk y col., 2008). El ATP extracelular actúa como una fuerte señal de reclutamiento de fagocitos (Elliott y col., 2009) a la vez que induce la respuesta inflamatoria, la activación del inflamosoma y liberación de citoquinas inflamatorias (Trautmann, 2009), cumpliendo así una función inmunoestimulante. Sin embargo, una vez que se acumula en el medio extracelular, el ATP es rápidamente hidrolizado por la acción en conjunto de las ectonucleotidasas CD39 y CD73. El primer paso de esta hidrólisis es catalizado por CD39, que convierte el ATP a ADP y AMP (Robson y col., 2006) y en el segundo paso participa CD73, catalizando la hidrólisis del AMP a adenosina (Regateiro y col., 2012). Se ha demostrado que la adenosina extracelular actuaría como molécula señalizadora de un excesivo daño, con efectos principalmente antiinflamatorios, inhibiendo la respuesta inmune a modo de prevenir un daño mayor en los tejidos (Sitkovsky y col., 2004).

La señalización por adenosina está mediada por 4 receptores acoplados a proteínas G: A1, A2A, A2B y A3. Este Seminario de Título se centrará en el receptor A2A (A2AR), el principal receptor de adenosina expresado por las células T e inducido por la activación de éstas (Antonioli y col., 2013). La estimulación del receptor A2A ha sido

reportado como mediador en la supresión de células T, células dendríticas, neutrófilos y macrófagos (Stagg & Smyth, 2010), así como inhibidor de la expansión de las células T y de la citotoxicidad de éstas (Ohta y col., 2009). Se ha propuesto que la adenosina generada en el microambiente tumoral es uno de los factores que contribuyen al escape tumoral de la respuesta inmune, lo que puede ocurrir por inhibición de la activación y citotoxicidad de las células T, disminución de la actividad de las células T y NK, entre otros factores (Ohta y col., 2006; Ohta y col., 2009).

Al unirse la adenosina extracelular a su receptor A2A, se induce la vía de señalización del cAMP en las células T CD8<sup>+</sup> provocando la activación de la proteína quinasa A (PKA). Esta quinasa a su vez interfiere con la actividad de proteínas involucradas en activación y proliferación de las células T, regulando de manera negativa la vía AKT. De esta manera, la adenosina inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF, IL-6 o IL-17, a la vez que promueve la expresión de citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 (Bono y col., 2015; Linnemann y col., 2009). De la misma forma, en nuestro laboratorio hemos reportado que el uso de antagonistas para bloquear el receptor A2A reduce la expresión de tcf-7 (que codifica a TCF-1) en linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Flores-Santibáñez et al., Immunology, 2015). Por tanto, estos datos sugieren que la adenosina, que se encuentra en altas concentraciones en el microambiente tumoral, podría no solo estar reduciendo la capacidad efectora de las células T CD8<sup>+</sup> sino que además promoviendo la troncalidad de éstas.

De acuerdo con estos antecedentes, nace la **hipótesis** de este trabajo: **La adenosina, a través de su receptor A2A, promueve la diferenciación de las células T CD8<sup>+</sup> precursoras de las células agotadas (T<sub>pex</sub>) al restringir la diferenciación hacia estadios terminalmente agotados (T<sub>ex</sub>) en condiciones de estimulación**

**crónica *in vitro***. Es así como el **objetivo general** de este trabajo de título es desarrollar un protocolo de estimulación crónica de linfocitos T CD8<sup>+</sup> policlonales para determinar el papel del A2AR en la inducción del agotamiento.

Los objetivos específicos de este trabajo son:

- 1. Estandarizar un protocolo de estimulación crónica *in vitro* de células T CD8<sup>+</sup> policlonales.
- 2. Estudiar el papel del receptor A2A en la inducción del agotamiento *in vitro* en linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

## 4. Materiales y métodos

### 4.1 Animales

Se utilizaron ratones silvestres de la cepa (C57BL/6), ratones OT-I y ratones *knockout* condicionales para A2AR (A2AR fl/fl x CD8Cre<sup>+</sup>), de ahora en adelante A2ARKO. Los ratones OT-I poseen linfocitos T CD8<sup>+</sup> que expresan un TCR transgénico compuesto por cadenas V $\alpha$ 2 y V $\beta$ 5 con el que reconocen el péptido SIINFEKL de la ovoalbúmina en el contexto de la molécula H-2K<sup>b</sup> (Hogquist y col., 1994). Los ratones *knockout* condicionales para A2AR se generaron a partir de cruza de ratones floxeados homocigotos para el exón 2 del gen *adora* (*adora2a*) con ratones CD8Cre, ambos obtenidos de The Jackson Laboratory. La descendencia, heterocigotos para *adora2a* y CD8cre se cruzan con ratones homocigotos *adora2a*, para obtener ratones homocigotos para *adora2a* y heterocigotos para CD8cre. Los ratones se mantuvieron en el bioterio de la Fundación Ciencia & Vida con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, temperatura 21-23°C, con agua y alimento *ad libitum*. En los experimentos se usaron ratones machos y hembras de entre 6 y 16 semanas de edad. Toda manipulación de animales se llevó a cabo siguiendo las regulaciones institucionales de la Fundación Ciencia & Vida y de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, certificado N°: 22564 – FCS – UCH.

### 4.2 Enriquecimiento de células T CD8<sup>+</sup>

Las células T CD8<sup>+</sup> se enriquecieron a partir de bazo de ratones silvestres C57BL/6 (WT), OT-I o A2ARKO. Los bazos extraídos del animal fueron perfundidos con 10 mL de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS). Las células fueron posteriormente centrifugadas a 600 g por 7 minutos a 4°C y resuspendidas en 2 mL de buffer de lisis de glóbulos rojos (RBC, Biolegend) e incubadas por 5 minutos en hielo. Luego, se llevaron a 10 mL con medio RPMI + 10% FBS y se centrifugaron a

600 g por 7 minutos a 4°C. Las células se resuspendieron en 10 mL de medio RPMI + 10% FBS y se tomó una alícuota para conteo por hematocitómetro (cámara de Neubauer con tinción de azul de tripán). A continuación, las células T CD8<sup>+</sup> se enriquecieron con nanobeads utilizando el kit MojoSort™ Mouse CD8 T Cell Isolation Kit (Biolegend, REF 480007). Para esto, 100 millones de células de la suspensión preparada anteriormente se centrifugaron a 600 g durante 5 minutos a 4°C. El pellet obtenido se resuspendió en buffer MACS (Verseno + 2% FBS, 1 mL por cada 100x10<sup>6</sup> células) y se incubó durante 15 minutos a 4°C con un mix de anticuerpos acoplados a biotina en una proporción de 15 µL de anticuerpos cada 100x10<sup>6</sup> células. Posterior a la incubación con anticuerpos, la suspensión celular se incubó por 15 minutos a 4°C con perlas magnéticas de estreptavidina en una proporción de 15 µL cada 100x10<sup>6</sup> células. Al terminar la incubación, las células se lavaron con 2,5 mL de buffer MACS y llevadas al separador magnético (DynaL MPC™-1, Invitrogen) para retener la fracción marcada magnéticamente. Se recuperó la fracción negativa, la cual contiene las células T CD8<sup>+</sup> y se lavó con 3 mL de buffer MACS la fracción positiva, para terminar de recuperar las células T CD8<sup>+</sup>. Las células se centrifugaron a 600 g por 5 minutos a 4°C y resuspendidas en 10 mL de medio RPMI + 10% FBS para ser contadas mediante la cámara de Neubauer y tinción con azul de tripán. El porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> fue posteriormente evaluado por citometría de flujo mediante la expresión de los marcadores CD3 y CD8, siendo el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> obtenidas mediante MojoSort entre 60-70%.

#### **4.3 Cultivo celular**

Para el cultivo celular se aislaron células T CD8<sup>+</sup> desde bazo de ratones C57BL/6, de ratones OT-I o ratones *knockout* condicionales para el receptor A2AR en células T CD8<sup>+</sup> según el experimento. Las células T CD8<sup>+</sup> se cultivaron en placas de 96 pocillos a

una concentración de 100.000 células en 200uL de medio RPMI 1640 que contenía 2mM L-Glutamina, 10% FBS, 100 U/mL penicilina; 1% de aminoácidos no esenciales, HEPES (10mM), piruvato de sodio (1mM), beta mercaptoetanol (56µM). Los medios se suplementaron con las citoquinas IL-7 e IL-15 a 5 ng/ml, o con IL-2 e IL-12 a 10 ng/ml dependiendo del experimento. Para la inducción del agotamiento se generaron condiciones con estimulación repetida con beads anti CD3/CD28 o péptido SIINFEKL (10ng/ml). Además se incluyó como control la estimulación única con beads o péptido SIINFEKL al inicio del cultivo para simular la estimulación aguda. Las células se cultivaron por 6 días en un incubador a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. En algunos casos se les cambió el medio a las células al día 2 y 5 del cultivo, para lo cual las células se lavaron y posteriormente se recultivaron manteniendo la cantidad de pozos por condición y re-estimulando con péptido o con beads, según la condición.

Para la estimulación crónica con beads, las células en cultivo se estimularon cada 48 horas con Dynabeads® anti CD3/CD28 (REF 11456D y 114.11) utilizando 2 uL de Dynabeads® por cada 100.000 células según indicaciones del fabricante. Previo a su uso, las Dynabeads® se lavaron en 1 ml de buffer Verseno + 0,1% BSA. Para esto, las beads junto con el buffer se dejaron 1 minuto en un magneto para tubos de citometría y se retiró el sobrenadante. Para el cambio de medio o al finalizar el cultivo, las Dynabeads® se retiraron del medio. Para esto, los pozos que corresponden a una misma condición se juntaron en un tubo de citometría, el cual se dejó 2 minutos en el magneto, quedando las Dynabeads® en las paredes del tubo, y se utilizó el sobrenadante. Para la estimulación aguda con beads, posterior al primer cambio de medio (al segundo día de cultivo) las beads son retiradas y las células recultivadas sin beads.

Para la estimulación crónica con el péptido SIINFEKL las células se cultivaron (100.000 células por pozo) y fueron estimuladas cada 24 horas con el péptido a una concentración de 10 ng/ml en el medio de cultivo. A los días 2 y 5, las células se re estimularon posterior al cambio de medio de cultivo. Para la estimulación aguda con el péptido las células se estimularon con 10 ng/ml de péptido solo al inicio de cultivo.. Similar a la condición con beads, para cambiar de medio a los días 2 y 5, y al final del experimento, los pozos correspondientes se juntan en un mismo tubo y se procede con el protocolo de marcaje.

Para la inhibición farmacológica del A2AR, a los cultivos de estimulación crónica se les agregó al primer día el antagonista del receptor A2A SCH58261 (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 0,1 $\mu$ M y 1 $\mu$ M, mientras que para la estimulación de los receptores de adenosina se utilizó el agonista NECA (Sigma-Aldrich) a 1 $\mu$ M y 10 $\mu$ M, utilizando ambos compuestos el dimetilsulfóxido (DMSO) como vehículo. Estos compuestos son suplementados nuevamente en cada cambio de medio.

#### **4.4 Anticuerpos**

Se utilizaron los anticuerpos contra las siguientes moléculas: 2B4 (Biolegend, clon m2B4, dilución 1/400), A2AR (NovusBio, clon 7F6-G5-A2, dilución 1/200), CD127 (Biolegend, A7R34, dilución 1/200), CD25 (Biolegend, dilución 1/200; BD Pharmingen, dilución 1/400, clon PC61), CD3 (Biolegend, clon 17A2 dilución 1/400 (FITC) y 1/100 (BV711)), CD39 (BD Bioscience, clon Y23-1185, dilución 1/400), CD44 (Biolegend, clon IM7, dilución 1/100 y IM8, dilución 1/800), CD62L (Biolegend, dilución 1/2000, eBioscience, dilución 1/400, clon MEL-14), CD69 (Biolegend, clon H1.2F3, dilución 1/100), CD73 (Biolegend, clon TY11.8, dilución 1/100), CD8 (Biolegend, clon 53-6.7, dilución 1/400), KI67 (Biolegend, clon 11F6, dilución 1/400), KLRG1 (Biolegend, clon

2F1/KLRG1, dilución 1/800), LAG3 (Biolegend, clon C9B7W, dilución 1/200), Ly108 (Biolegend, clon 330-AJ, dilución 1/200), PD1 (Biolegend, clon RMP1-30, dilución 1/400 y 29F.1A12, dilución 1/800), PDL1 (Biolegend, clon 10F.9G2, dilución 1/400), TCF1 (Cell signaling, clon C63D9, dilución 1/200), TIGIT (Biolegend, clon VSI9, dilución 1/100), TIM 3 (Biolegend, clon RMT3-23, dilución 1/100 (PECy7) y 1/200 (BV785)), TOX (Miltenyi, clon REA473, dilución 1/100) y Viability Dye (eBioscience/Invitrogen, dilución 1/1000).

#### **4.5 Citometría de flujo**

Para analizar las poblaciones celulares por medio de citometría de flujo se utilizó el citómetro BD FACSCanto II. Para la separación de poblaciones celulares se utilizó el cell sorter BD FACSAriaIII, utilizando anticuerpos monoclonales específicos para antígenos de interés, tanto de superficie como intracelulares, descritos en la sección anterior. Para la tinción de superficie las células se incubaron durante 20 minutos a 4°C en oscuridad con un mix de los anticuerpos conjugados con distintos fluorocromos. Los receptores Fc se bloquearon con anticuerpos contra CD16/CD32 (*Fc block*, Biolegend), en presencia de un marcador de viabilidad (Viability Dye). Pasado este período las células se lavaron con 1 mL de PBS + 2% FBS, se centrifugaron a 600 g por 5 minutos a 4°C y se resuspendieron en 300 µL de buffer de permeabilización y fijación (Cytofix/cytoperm, Invitrogen). Las células se fijaron durante la noche a 4°C, para luego ser centrifugadas a 700 g por 8 minutos a 4°C y resuspendidas en el mix de anticuerpos preparado en el buffer de permeabilización e incubadas durante la noche a 4°C. Al día siguiente las muestras se lavaron con buffer de permeabilización por centrifugación a 700 g por 8 minutos a 4°C y luego resuspendidas en PBS + 2% FBS y analizadas por citometría de flujo.

#### 4.7 Genotipificación ratones A2AR KO

Para la genotipificación de los ratones A2AR KO se realizaron 3 reacciones de PCR y análisis mediante geles de agarosa: el primero para verificar el genotipo homocigoto para los sitios loxP en el exón 2 del gen para adora, el segundo para comprobar la presencia de la recombinasa Cre, y finalmente un PCR para comprobación de la delección del exón 2 del gen adora. Se utilizaron los siguientes sets de partidores:

**Tabla I.** Genotipificación de ratones A2AR KO.

	<b>Partidores</b>	<b>Bandas (bp)</b>
Determinación del genotipo para los sitios loxP en el exón 2 del gen para adora (agarosa 3%)	Forward 5'-GGGCAAGATGGG AGTCATT-3' Reverse 5'-ATTCTGCATCTCCCGAAACC-3'	220 alelo floxeado 182 alelo WT
Determinación de la presencia de la recombinasa Cre (agarosa 2%)	Forward transgén 5'-CAATGGAAGGAAGTCGTGGT-3' Forward silvestre 5'-CACACATGCAAGTCTAAATCAGG-3' Partidor común para transgén y silvestre 5'-TGGGATTTACAGGGCATACTG-3'	198
Determinación de la escisión del exón 2 del gen para adora (agarosa al 3%)	Forward 5'-GGGCAAGATGGG AGTCATT-3' Reverse 5'-ATTCTGCATCTCCCGAAACC-3' Partidor R1 (escisión) 5'-CCTCATCATTCTACCCGCT-3' (Bastia y col., 2005)	306

#### 4.6 Análisis de datos

Posteriormente, los datos de citometría fueron procesados y analizados en el software FlowJO. Para el análisis estadístico se utilizó el software GraphPad Prism v 9.1.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Los datos entre los ratones controles y los del grupo de interés (A2AR KO o estimulados con beads) fueron analizados mediante un t-test no pareado tras verificación de distribución gaussiana o normal mediante la

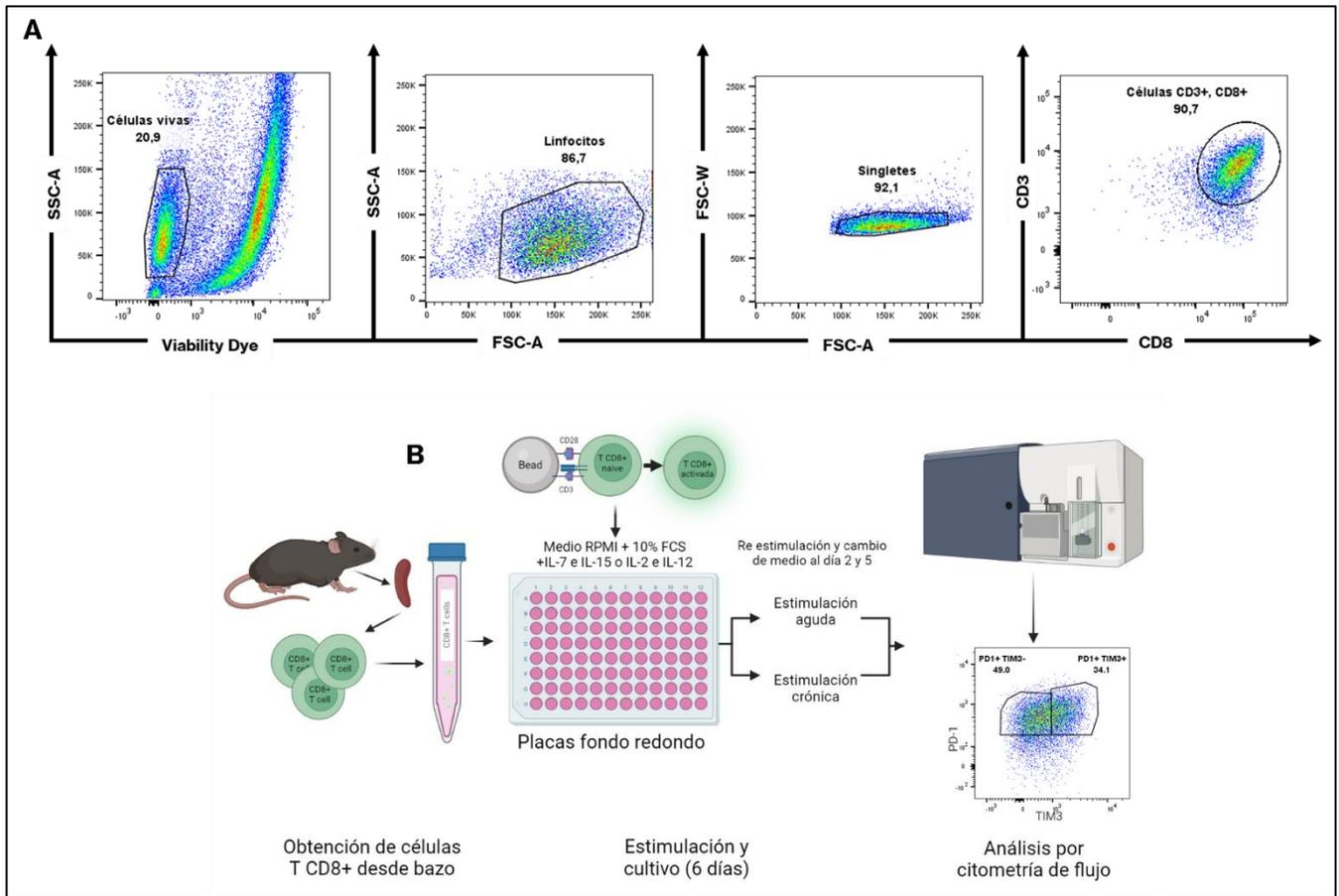
prueba de Shapiro-Wilk. De no seguir una distribución normal, se usó el t-test no paramétrico de Mann-Whitney de dos colas. Los análisis se realizaron con un intervalo de confianza de 95%.

## **5. Resultados**

### **5.1 Estandarización del protocolo de cultivo de células T CD8<sup>+</sup> murinas incubadas con beads anti CD3/CD28**

Con el propósito de evaluar el potencial de inducción de agotamiento con las beads anti CD3/CD28 en células T CD8<sup>+</sup> murinas, se adaptó el protocolo de cultivo desarrollado en el laboratorio para el agotamiento de células T CD8<sup>+</sup>. Para esto, a partir del bazo de animales C57BL/6 WT, se obtuvieron células T CD8<sup>+</sup> mediante aislamiento inmunomagnético (MojoSort) siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones (ver Materiales y Métodos. sección 4.2). Mediante citometría de flujo se analizó el porcentaje y pureza de la población de células T CD8<sup>+</sup> aisladas utilizando los marcadores de superficie CD3 y CD8, como se muestra en la figura 1A. Los porcentajes de células T CD8<sup>+</sup> representan entre 60% a 70%.

A continuación, con base en la literatura y antecedentes del laboratorio, se evaluó la combinación óptima de compuestos para mantener las células en las mejores condiciones durante el cultivo de inducción de agotamiento (ver detalles en Materiales y Métodos, sección 4.3). Para el cultivo celular a ser estimuladas con las beads se probaron dos combinaciones de citoquinas: IL-7/IL-15, ambas a 5 ng/ml, según el protocolo ya presente en el laboratorio y otra condición donde el medio de cultivo fue suplementado con las citoquinas IL-2/IL-12, ambas a 10 ng/ml. Esto último, con el fin de estudiar si el uso de estas citoquinas facilita la diferenciación del cultivo celular a un fenotipo terminalmente agotado. Es importante mencionar que estos cultivos se realizaron en placas de cultivo de 96 pozos fondo redondo.



**Figura 1. Estrategia de cultivo de células T CD8<sup>+</sup> para la diferenciación a células agotadas.** Células T CD8<sup>+</sup> enriquecidas mediante Mojosort a partir de esplenocitos extraídos de bazo de ratones C57BL/6. (A) Estrategia de selección de células T CD8<sup>+</sup> mediante citometría de flujo con el uso del software FlowJO, identificando las células T CD8<sup>+</sup> como las positivas para los marcadores CD3 y CD8. (B) Protocolo de inducción de agotamiento de células T CD8<sup>+</sup> incubadas con beads anti CD3/CD28. Esquema realizado con BioRender.com

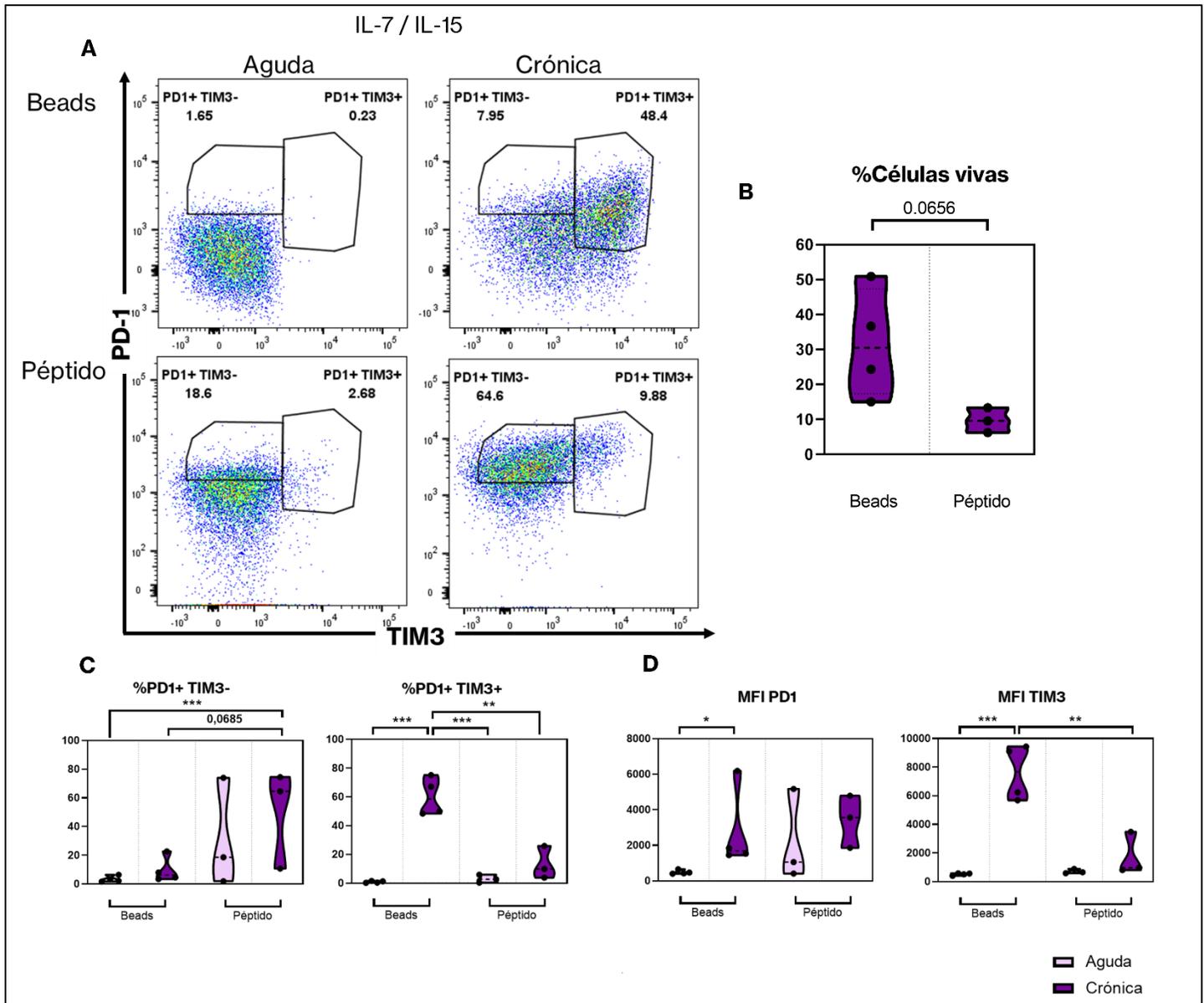
Posteriormente, se determinó el número óptimo de estimulaciones (crónicas) teniendo presente dos aspectos: que el protocolo no fuera mucho mayor en duración al ya existente (5 días) y que las estimulaciones fueran, según el manual de uso de las beads, cada 48 horas. Así se determinó que las re-estimulaciones con las beads y el

cambio de medio se harían los días 2 y 5 de cultivo, terminando este el día 6, como se esquematiza en la figura 1B. Como control, siempre se realizó en paralelo un cultivo donde las células se estimularon tan solo una vez, de manera de replicar las condiciones de estimulación aguda. Durante el cultivo las células permanecían en cámara de CO<sub>2</sub> y 37°C y eran observadas a diario bajo microscopio.

## **5.2 Análisis de expresión de marcadores de agotamiento con IL-7/IL-15**

Luego de determinar las condiciones óptimas para la sobrevivencia de las células durante el protocolo de agotamiento con beads, se comparó la expresión de los marcadores de agotamiento PD1 y TIM3 en células obtenidas usando el protocolo de diferenciación de agotamiento de células OT-I con el péptido SIINFEKL desarrollado previamente en el laboratorio. En la figura 2A se muestra un resultado representativo de citometría de flujo, donde es posible evidenciar un aumento en la intensidad media de fluorescencia (o expresión) de PD1 y TIM3 en la condición de estimulación crónica con IL-7/IL-15 con respecto a la estimulación aguda. Asimismo, en las condiciones de estimulación crónica con IL-7/IL-15, se pueden distinguir dos poblaciones de células agotadas, una población con características de células terminalmente agotadas o Tex (PD1<sup>+</sup>TIM3<sup>+</sup>, de ahora en adelante: Tex) y otra con características de células agotadas troncales o Tpex (PD1<sup>+</sup>TIM3<sup>-</sup>, de ahora en adelante: Tpex). Al comparar los resultados de la estimulación crónica con beads y con el péptido (IL-7/IL-15), se observa en general porcentajes mayores de células terminalmente agotadas o Tex con las beads que con el péptido (figura 2C), mientras que la población Tpex obtenida luego de la estimulación con las beads presenta una menor expresión de PD1 al ser comparadas con las células estimuladas con péptido, resultando también en una menor frecuencia de éstas. Respecto a la sobrevivencia de las células, en la figura 2B es posible notar un mayor

porcentaje de células totales vivas posterior al cultivo cuando estas son estimuladas con beads, en comparación a cuando se utiliza el péptido como estímulo.



**Figura 2. Análisis de los marcadores PD1 y TIM3 en cultivos de agotamiento con IL-7/IL-15.** Células T CD8<sup>+</sup> de ratones OT-I fueron enriquecidas mediante Mojosort a partir de esplenocitos extraídos de bazo, luego sometidas al protocolo de agotamiento con beads y péptido SIINFEKL como control. (A) Citometría de flujo representativa de las poblaciones T<sub>pex</sub> y T<sub>ex</sub> luego de estimulaciones agudas o crónicas con el medio

enriquecido con IL-7/IL-15. (B) Análisis estadístico utilizando T test no pareado para el porcentaje de células vivas totales posterior al cultivo. (C) Análisis estadístico utilizando T test no pareado de los porcentajes de poblaciones T<sub>pex</sub> y T<sub>ex</sub> para los ensayos realizados *in vitro* y (D) Intensidad media de fluorescencia para PD1 y TIM3. Beads n=4, péptido OT-I n=3. \*: p-value < 0,05; \*\*: p-value < 0,005; \*\*\*: p-value < 0,0005).

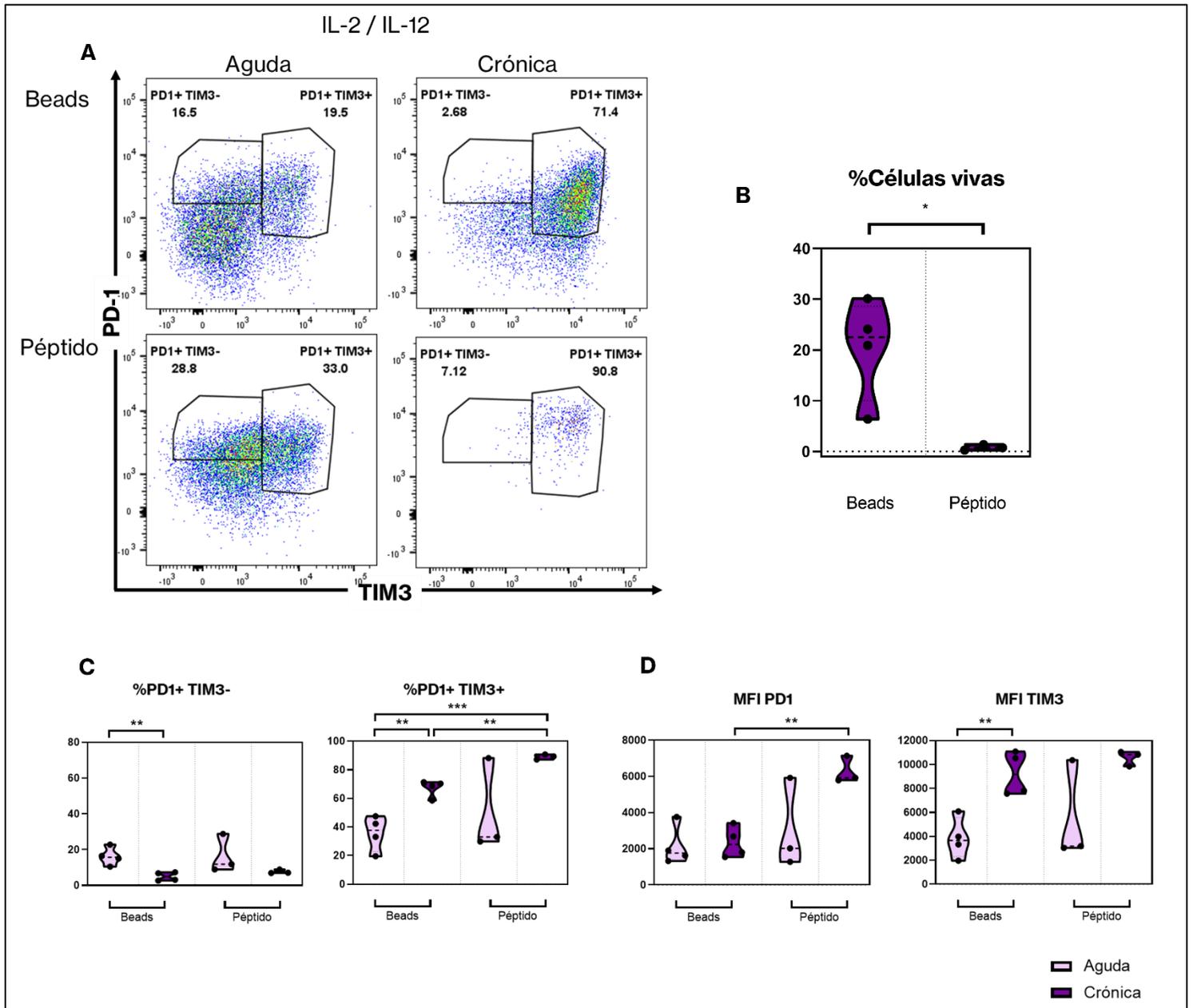
### 5.3 Análisis de expresión de marcadores de agotamiento con IL-2 e IL-12

En el caso de las células cultivadas en medio suplementado con IL-2/IL-12, estimuladas con beads o péptido OT-I, se observan células principalmente con fenotipo terminalmente agotado (T<sub>ex</sub>) incluso cuando las células son estimuladas en forma aguda, como se muestra en la figura 3A. Es importante destacar además, que tanto con beads como con el péptido, cuando el medio de cultivo se hace en presencia de IL-2/IL-12, las células T<sub>pex</sub> aparecen con la estimulación aguda, pero cuando se hacen estimulaciones repetidas, la población T<sub>pex</sub> desaparece y da lugar a células TIM3<sup>+</sup> (figura 3A, 3C). Estos datos en conjunto sugieren que las citoquinas IL-7/IL-15 favorecen la diferenciación de células CD8<sup>+</sup> a T<sub>pex</sub>, mientras que las citoquinas IL-2/IL-12 favorecen estadios de diferenciación más terminales como son los T<sub>ex</sub>. Es importante mencionar que, como se observa en la figura 3B, la sobrevivencia de las células con IL-2/IL-12 cuando se utiliza el péptido como estímulo es muy baja (1%) en comparación a cuando el medio es suplementado con IL-7/IL-15 (10%), como se muestra en la figura 2B.

Los resultados utilizando el medio con IL-2/IL-12, indican que PD1 no presenta mayores cambios en su intensidad media de fluorescencia para el caso de la activación con beads entre la estimulación aguda y crónica pero sí en el caso de la estimulación con el péptido (Figura 3D). Pese a que no hay diferencias significativas entre estimulación aguda y crónica dentro de la condición de activación con péptido, sí hay diferencias significativas al comparar la estimulación crónica con beads y péptido (Figura

3D). Para el caso de TIM3 se obtiene una diferencia significativa entre estimulación aguda y crónica con las beads, observando un comportamiento similar para el caso de las células estimuladas con péptido, aunque no presenten diferencias significativas.

De acuerdo con estos resultados, es posible inducir la diferenciación de células Tex terminalmente agotadas y Tpex en cultivo *in vitro* utilizando las beads anti CD3/CD28 según el protocolo desarrollado. Además, la frecuencia de cada una de estas poblaciones depende de las citoquinas que se utilizan en su diferenciación (IL-7/IL-15 vs IL-2/IL-12).



**Figura 3. Análisis de marcadores PD1 y TIM3 en cultivos de agotamiento con IL-2/IL-12.** Células T CD8<sup>+</sup> de ratones OT-I fueron enriquecidas mediante Mojosort a partir de esplenocitos extraídos de bazo, luego sometidas al protocolo de agotamiento con beads y péptido SIINFEKL como control. (A) Citometría de flujo representativa de las poblaciones T<sub>pex</sub> y T<sub>ex</sub> luego de estimulaciones agudas o crónicas con el medio enriquecido con IL-2/IL-12. (B) Análisis estadístico utilizando T test no pareado para el porcentaje de células vivas totales posterior al cultivo. Análisis estadístico utilizando T test no pareado de (C) los porcentajes de poblaciones T<sub>pex</sub> y T<sub>ex</sub> para los ensayos *in*

*vitro* realizados y (D) Intensidad media de fluorescencia para PD1 y TIM3. Beads n=4, péptido OT-I n=3. \*: p-value < 0,05; \*\*: p-value < 0,005; \*\*\*: p-value < 0,0005).

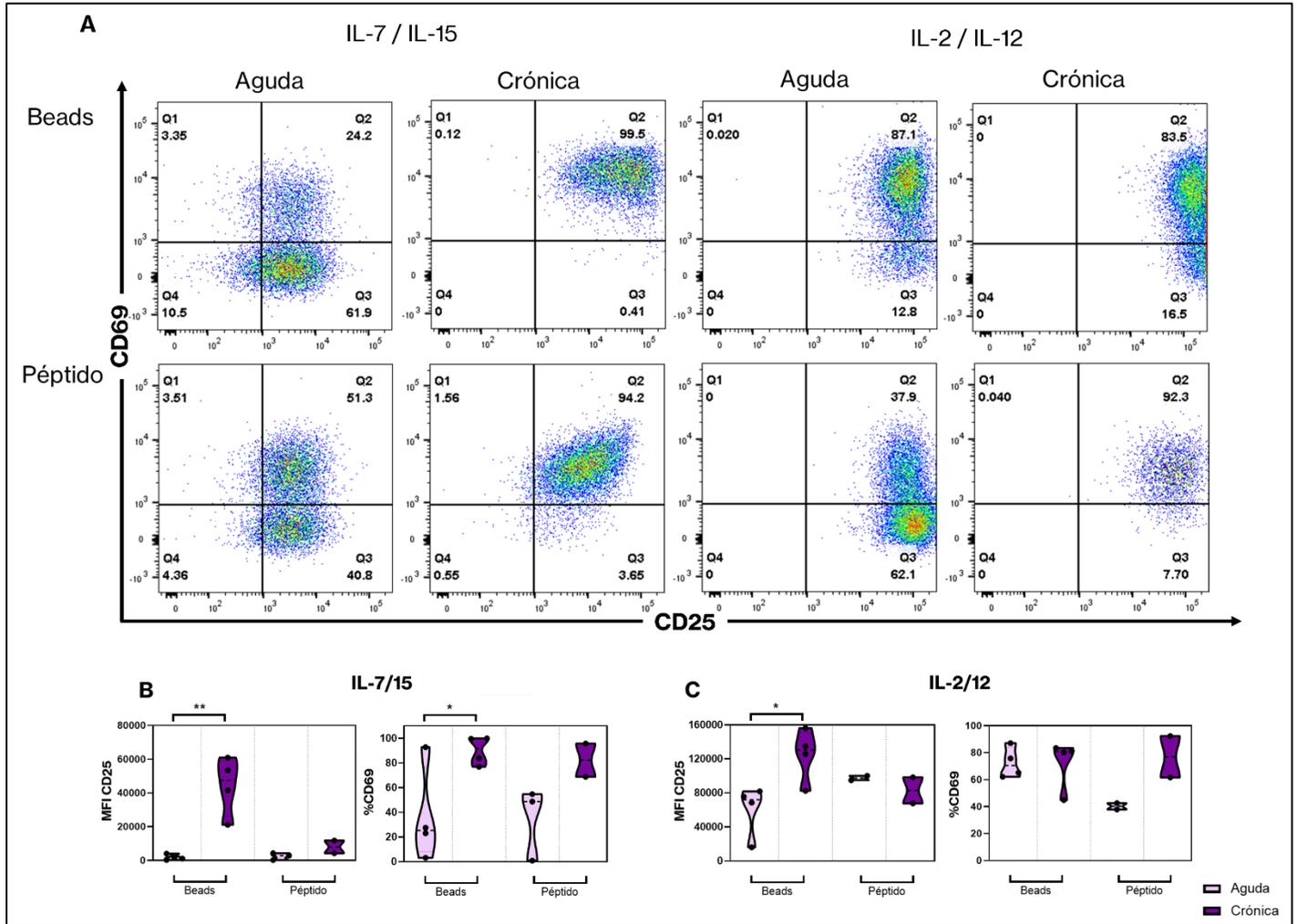
#### **5.4 Análisis de expresión de marcadores de activación**

Los datos de la figura 3 sugieren que los resultados de la estimulación con el péptido y con las beads en presencia de IL-2/IL-12 son diferentes, por lo tanto, analizamos adicionalmente la expresión de los marcadores de activación CD25 y CD69 con el fin de evaluar diferencias en la activación de estas células de acuerdo con el estímulo y medio utilizado.

En la figura 4A-B, se puede observar que en general en la condición de activación crónica se obtiene una mayor expresión de los marcadores de activación CD69 y CD25 que en la condición de activación aguda, utilizando las diferentes mezclas de citoquinas.

La figura 4B muestra diferencias en la intensidad media de fluorescencia de CD25 y el porcentaje de células CD69<sup>+</sup> según el estímulo y frecuencia de éste. Para el medio con IL-7/IL-15, tanto en las condiciones con péptido como con beads se aprecia un aumento en la expresión de ambos marcadores, destacando que las células estimuladas con beads son las que presentan un aumento significativo en la expresión tanto de CD69 como de CD25 cuando están bajo estimulaciones repetidas mientras que en el caso del péptido las diferencias no fueron significativas. Respecto de las células estimuladas con IL-2/IL-12, para CD69 no se aprecian diferencias significativas en ninguno de los casos, mientras que CD25 presenta un aumento significativo en el caso de las beads con estimulaciones repetidas. En conjunto, estos resultados confirman que; 1) la estimulación crónica induce un mayor nivel de activación que la estimulación aguda; 2) que la adición de IL-2/IL-12 en los cultivos induce una mayor activación que la adición

de IL-7/IL-15 y 3) que la estimulación crónica con beads induce un mayor nivel de activación que la estimulación con péptido.



**Figura 4. Análisis de marcadores de activación CD25 y CD69 en cultivos de agotamiento.** Células T CD8<sup>+</sup> de ratones OT-I fueron enriquecidas mediante Mojosort a partir de esplenocitos extraídos de bazo, luego sometidas al protocolo de agotamiento con beads y péptido SIINFEKL como control. (A) Resultados de citometría de flujo representativos de los porcentajes de poblaciones que expresan CD69 y CD25 luego de estimulaciones únicas o repetidas, con medios suplementados con IL-7/IL-15 o IL-2/IL-12. Análisis estadístico utilizando T test no pareado de (B) expresión de CD25 y CD69 para las células en medio con IL-7/IL/15 y (C) expresión de CD25 y CD69 para las células en medio con IL-2/IL12. Beads n=4, péptido OT-I n=2 y n=3 (estimulación aguda, B); \*: p-value < 0,05; \*\*: p-value < 0,005).

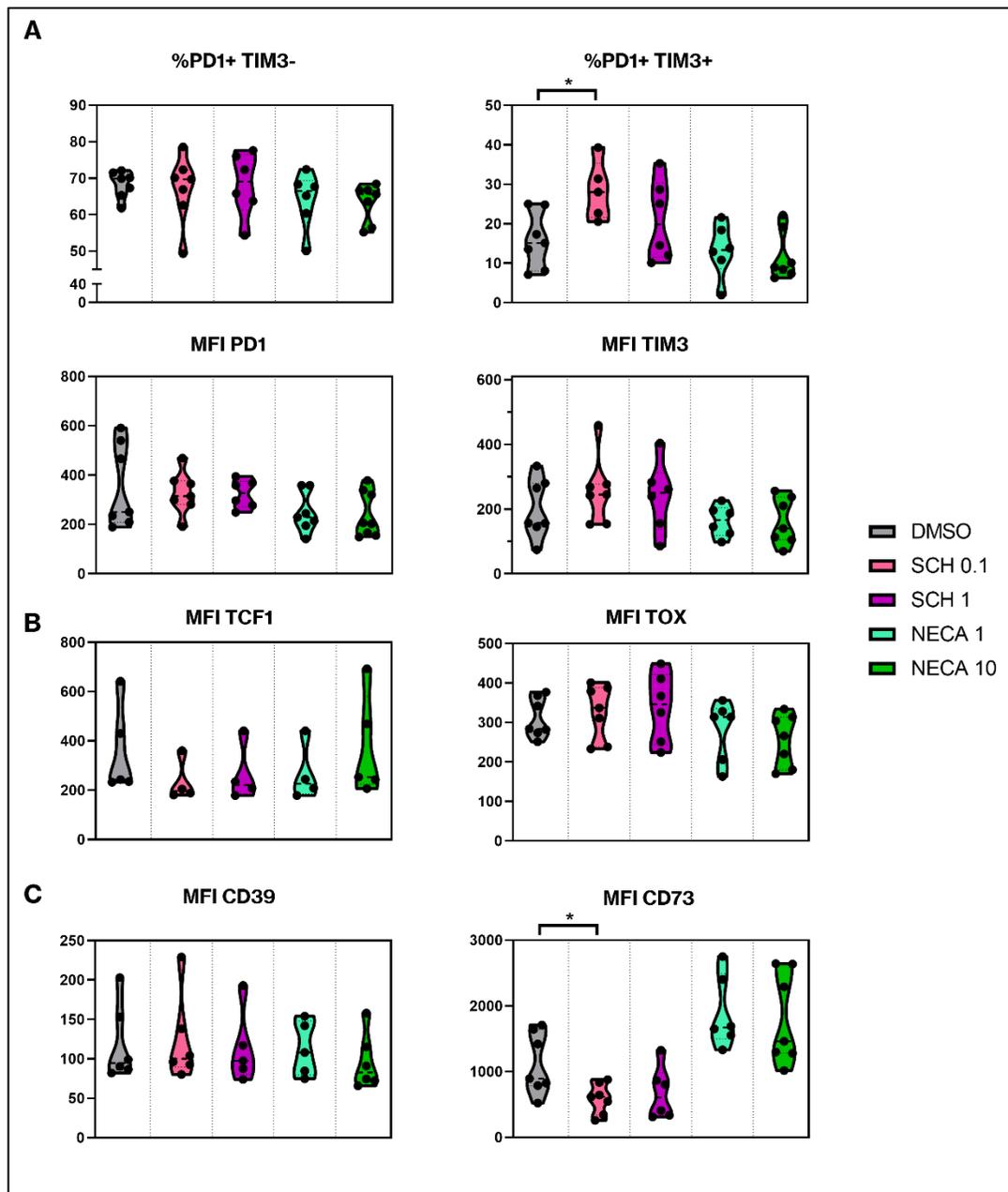
## 5.5 Activación e inhibición farmacológica del A2AR

A continuación, se evaluó el rol del A2AR en el agotamiento utilizando una estrategia de activación o inhibición farmacológica del receptor. Para esto, se realizaron cultivos de agotamiento *in vitro* con IL-7/IL-15 y péptido en presencia del antagonista competitivo y selectivo de A2AR, SCH58261, y del agonista de alta afinidad de los receptores de adenosina, NECA. Se trabajó con este protocolo como primer acercamiento a la evaluación del rol del A2AR debido a que la progenie A2AR KO no estaba aún disponible para su uso. Así, es posible notar en la figura 5A que en las condiciones con SCH58261, luego de estimulaciones repetidas, se observa un mayor porcentaje de células agotadas respecto del control con DMSO al ocupar la menor concentración de SCH58261.

En la figura 5C es posible notar una menor expresión de CD73 en los cultivos con SCH58261 con la menor concentración respecto del control con DMSO. Estos datos concuerdan con lo reportado en la literatura, donde se indica que la señalización adenosinérgica favorece la expresión de CD73 (Antonioli y col., 2013), y se observa que, al inhibir la señalización, hay una menor expresión de éste.

En el resto de los parámetros analizados en las figuras 5A-C, es decir, en los ensayos con NECA para los distintos marcadores o en cuanto a la frecuencia de las células T<sub>pex</sub> en estos experimentos, no se observan diferencias significativas al comparar las condiciones con su control.

En conjunto, los resultados de estos experimentos sugieren que al inhibir el A2AR haciendo uso del antagonista SCH58261, se promueve el establecimiento del agotamiento, mientras que al estimular el receptor con NECA, no se observan diferencias significativas en el agotamiento de los linfocitos.

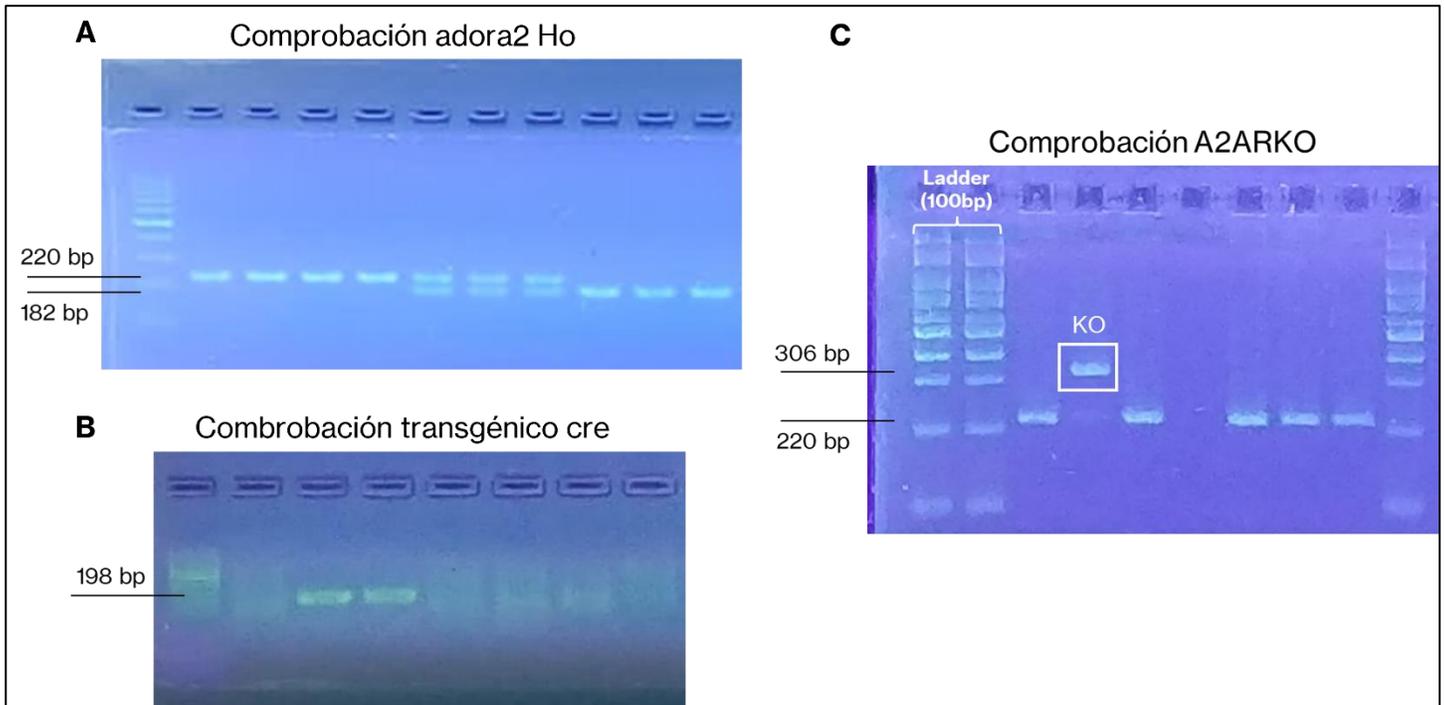


**Figura 5. Marcadores de agotamiento para cultivos con inhibición o activación farmacológica de A2AR.** Células T CD8<sup>+</sup> de ratones OT-I bajo estimulación repetida con péptido en presencia de IL-7/IL-15 expuestas a concentraciones distintas de SCH58261 y NECA. (A) Porcentajes de T<sub>pe</sub>x y T<sub>ex</sub>, intensidad media de fluorescencia de PD1 y TIM3. (B) Intensidad media de fluorescencia para TCF1 y TOX. (C) Intensidad media de fluorescencia para CD39 y CD73 (n=4 a 5). T-test no pareado; \*: p-value < 0,05).

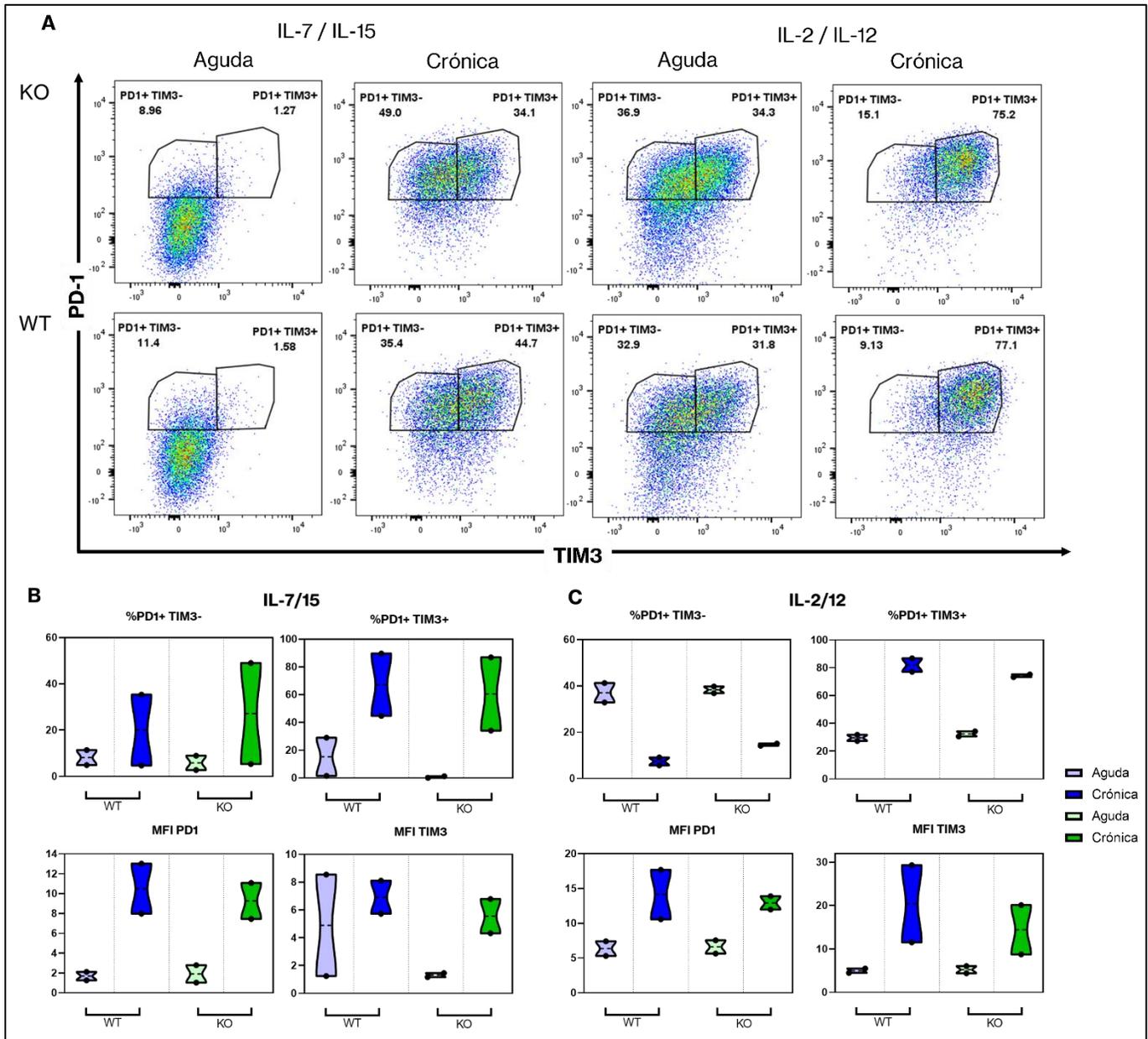
## 5.6 Agotamiento en ratones *knockout* condicionales para A2AR (A2ARKO)

Una vez se determinó que era posible inducir la expresión de PD1 y TIM3 en células estimuladas con beads anti CD3/CD28 en células T CD8<sup>+</sup> murinas, induciendo así el fenotipo de agotamiento, se procedió a aplicar el protocolo de agotamiento *in vitro* en células CD8<sup>+</sup> de ratones *knockout* condicionales para A2AR (A2AR fl/fl x CD8Cre<sup>+</sup>, de ahora en adelante, A2ARKO) y ratones A2AR fl/fl CD8Cre<sup>-</sup> como controles, en adelante ratones WT. La figura 6 muestra los resultados del PCR que confirman la delección del exón 2 del gen *Adora2a* en las células T CD8<sup>+</sup> (banda de 306 bp).

En la figura 7A es posible observar los porcentajes de células agotadas tanto para los ratones A2ARKO como los ratones WT, estimuladas con beads anti CD3/CD28, con ambos medios utilizados. Para los medios con IL-7/IL-15 o bien IL-2/IL-12 es posible notar que las células WT y A2ARKO luego de ser expuestas al estímulo agudo presentan frecuencias similares de células T<sub>pex</sub> y T<sub>ex</sub>. De igual manera, al observar la intensidad media de fluorescencia en la figura 5B tanto para PD1 como TIM3, no existen diferencias notables entre células WT o A2ARKO en ambas condiciones. Es importante mencionar que en estos cultivos donde las beads son usadas como estímulo en ratones A2AR KO (TCR WT), es posible observar mayor frecuencia de células T<sub>pex</sub> tras el protocolo, a diferencia de los resultados mostrados previamente en ratones OT-I (Figuras 2 y 3), indicando una posible diferencia en la activación mediante beads entre células T CD8<sup>+</sup> OT-I y aquellas activadas policlonalmente (WT).



**Figura 6. Genotipificación de los ratones A2ARKO.** Verificación del genotipo de los ratones A2ARKO por PCR. (A) Gel de comprobación de la presencia de los sitios loxP. La banda de 220 bp indica el alelo floxeado. Las muestras que solo presentan la banda de 220 bp corresponden a ratones homocigotos para adora2 floxeado. (B) Gel de comprobación de presencia de recombinasa Cre. La banda de 198 bp indica la expresión del transgénico Cre. (C) Gel de comprobación de delección del exón 2 del gen adora. La banda de 306 bp es el resultado de la amplificación de la región resultante al escindirse el exón 2.



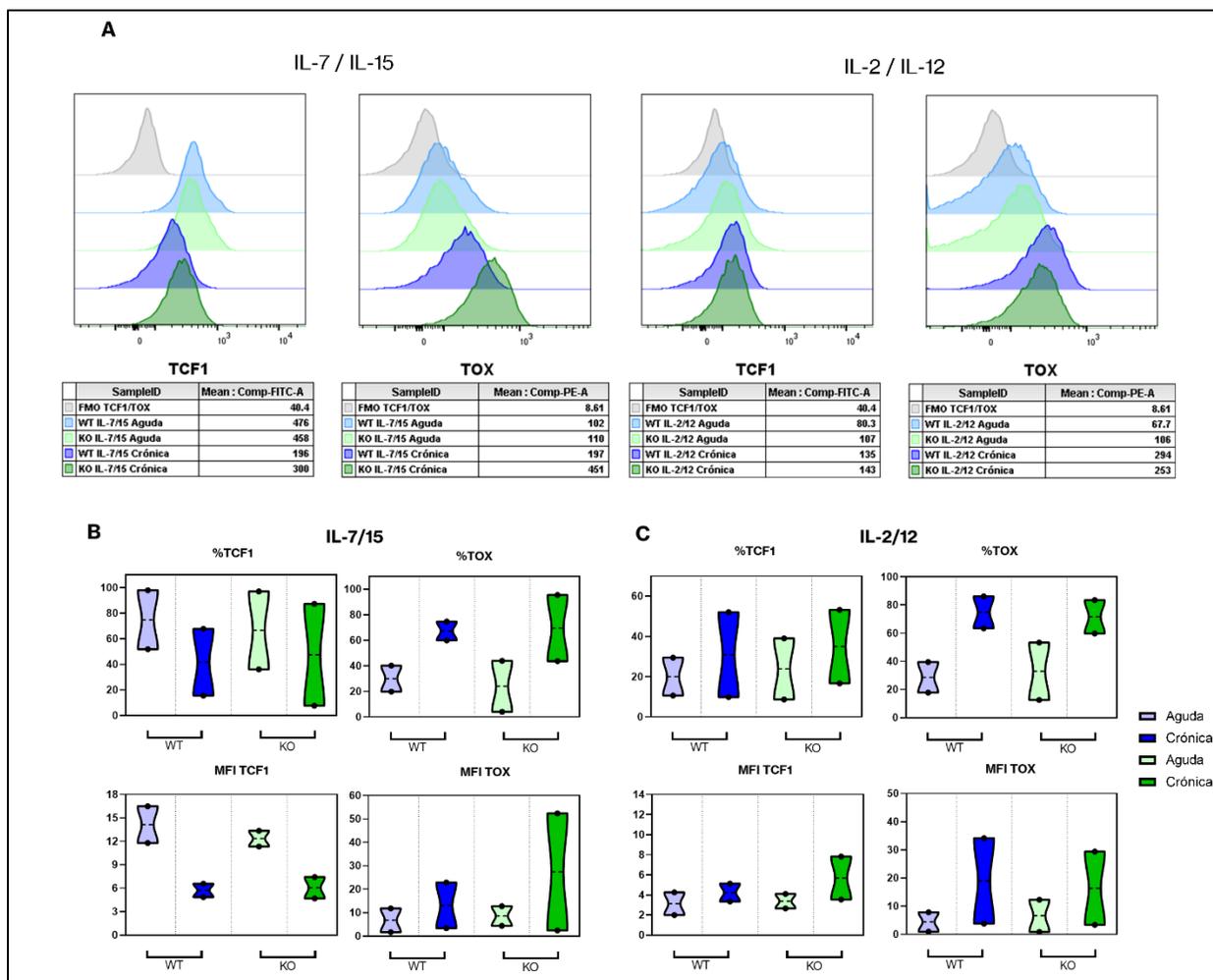
**Figura 7. Marcadores PD1 y TIM3 en cultivos de agotamiento utilizando células WT y A2ARKO.** Células T CD8<sup>+</sup> de ratones y A2ARKO fueron enriquecidas mediante Mojosort a partir de esplenocitos extraídos de bazo, luego sometidas al protocolo de agotamiento con beads, utilizando células T CD8<sup>+</sup> de ratones WT como control. (A) Resultados de citometría de flujo representativos de las frecuencias de células T<sub>pex</sub> y T<sub>ex</sub> comparando los medios enriquecidos con IL-7/IL-15 o IL-2/IL-12. Análisis estadístico utilizando T test no pareado de (B) frecuencia de poblaciones T<sub>pex</sub> y T<sub>ex</sub>, así como expresión de PD1 y TIM3 en células con medio enriquecido con IL-7/IL-15 y (C)

frecuencia de poblaciones T<sub>pex</sub> y T<sub>ex</sub>, así como expresión de PD1 y TIM3 en células con medio enriquecido con IL-2/IL-12 (n=2).

Además de la expresión de los marcadores de agotamiento PD1 y TIM3, también se analizó la expresión de los factores de transcripción TCF1 y TOX como marcadores de troncalidad y agotamiento en las células T CD8<sup>+</sup> de ratones WT y A2ARKO. En la figura 8B y 8C se muestran los resultados para la expresión de TCF1 y TOX utilizando los medios con las diferentes citoquinas. De ellos se destaca que es posible apreciar la disminución en la expresión de TCF1 en el medio con IL-7/IL-15 y estimulación crónica tanto para células WT y A2ARKO en comparación con la estimulación aguda. De manera complementaria, se observó un aumento del porcentaje de células TOX<sup>+</sup> en la condición de estimulación crónica en comparación con la estimulación aguda. Esto confirma que la estimulación crónica reduce el porcentaje de células troncales y aumenta el agotamiento en estos cultivos *in vitro*.

No se observaron diferencias en el porcentaje de células TOX<sup>+</sup> o TCF1<sup>+</sup> entre los cultivos generados con células WT y células A2ARKO.

En conjunto, los resultados sugieren con base en la expresión de marcadores de agotamiento y troncalidad, que es posible inducir el agotamiento tanto en células T CD8<sup>+</sup> WT como en las células de ratones *knockout* condicionales para A2AR, sin presentar, en las condiciones de experimentación aquí descritas, diferencias en el establecimiento del agotamiento entre ratones WT y *knockout* condicionales para A2AR.



**Figura 8. Análisis de factores de transcripción TCF1 y TOX en cultivos de células agotadas.** Células T CD8<sup>+</sup> de ratones y A2ARKO fueron enriquecidas mediante Mojosort a partir de esplenocitos extraídos de bazo, luego sometidas al protocolo de agotamiento con beads, utilizando células T CD8<sup>+</sup> de ratones WT como control. (A) Histogramas representativos para la expresión de TCF1 y TOX de células T CD8<sup>+</sup> posterior al protocolo de agotamiento. Análisis estadísticos de (B) la expresión de TCF1 y TOX en cultivos enriquecidos con IL-7/IL-15 y (C) la expresión de TCF1 y TOX en cultivos enriquecidos con IL-2/IL-12.

## 6. Discusión

En este trabajo se buscó dilucidar el rol que el A2AR tiene en el agotamiento de las células T CD8<sup>+</sup>, para lo cual primero se estandarizó un protocolo de estimulación crónica *in vitro* utilizando beads anti CD3/CD28, para posteriormente analizar el establecimiento del agotamiento en células T CD8<sup>+</sup> de ratones *knockout* condicionales para A2AR. Utilizando este protocolo, se pudo observar, dependiendo de las condiciones, la diferenciación de células que presentan un fenotipo de células agotadas con características troncales (T<sub>pex</sub>) y con características de diferenciación terminal (T<sub>ex</sub>). Este protocolo de inducción de agotamiento utilizando un activador policlonal como beads conjugadas con anticuerpos contra CD3 y CD28 permitirán estudiar con mayor profundidad cómo los receptores de adenosina pueden influir en el agotamiento en condiciones donde no se dispone de animales que poseen un receptor de linfocitos T transgénico, como es en el caso de los animales A2AR *knockout* condicionales disponibles en el laboratorio.

### 6.1 Estandarización del protocolo de cultivo de células T CD8<sup>+</sup> murinas incubadas con beads anti CD3/CD28.

Basado en el protocolo de agotamiento existente en el laboratorio (modificado de Zhao y col., 2020), la utilización de las citoquinas IL-7/IL-15 en el medio de cultivo permite mantener la sobrevivencia de las células T CD8<sup>+</sup> durante el desarrollo del protocolo, aumentando así la fidelidad de los análisis al permitir tener mayor número de células que analizar por citometría al finalizar el protocolo. Al iniciar el cultivo se obtiene un porcentaje de células T CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> cercano al 70%, donde el 30% restante, que corresponden a células T CD4<sup>+</sup> o NKT, (CD3<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>, CD3<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>) tiende a desaparecer los días posteriores del cultivo, de manera tal que al día final del cultivo los porcentajes de células

T CD8<sup>+</sup> presentes son de alrededor del 90%. Además de la condición con IL-7/IL-15, fue incorporada la condición con IL-2/IL-12 con base en la investigación de Scharping y col., (2021), donde se obtuvieron células T CD8<sup>+</sup> agotadas en condiciones con distintos niveles de hipoxia. Otro aspecto determinante para la sobrevivencia de las células en los experimentos realizados para este trabajo fue el utilizar las placas de cultivo de 96 pozos fondo redondo, ya que marcó la diferencia en obtener o no células vivas al final del cultivo, a pesar de tener un porcentaje de sobrevivencia muy bajo en el caso de la estimulación con péptido en medio enriquecido con IL-2/IL-12.

Al analizar los marcadores de agotamiento destacan diferencias en las células según el medio utilizado. Así las células cultivadas con IL-7/IL-15 presentan una clara diferencia según si el estímulo es agudo o crónico, apareciendo las células agotadas solo en estimulación crónica. Por el contrario, en los cultivos con IL-2/IL-12, aparecen células con el fenotipo T<sub>pex</sub> y T<sub>ex</sub> con estimulación aguda, y al pasar a estimulaciones repetidas tiende a disminuir la población T<sub>pex</sub>, obteniendo principalmente células con fenotipo terminalmente agotado (T<sub>ex</sub>). Estos resultados respaldan lo reportado en los trabajos de Kaech y col. (2003) y Schluns y col. (2002) que indican que tanto IL-7 como IL-15 son importantes participantes en la generación y mantención de las células T CD8<sup>+</sup> de memoria, a la vez que respalda que una estimulación prolongada con IL-2 o IL-12 puede inducir disfuncionalidad y agotamiento en las células T CD8<sup>+</sup> (Liu y col., 2021 & Yang y col., 2012).

Para el desarrollo del protocolo de agotamiento con las beads, los ensayos se realizaron en ratones OT-I, los cuales además fueron usados como control pues el protocolo de agotamiento existente en el laboratorio se basa en la estimulación repetida con el péptido SIINFEKL. Una de las observaciones durante el desarrollo de este

protocolo con beads fue la alta frecuencia de células PD1<sup>-</sup> TIM3<sup>+</sup>, que se obtienen con las estimulaciones crónicas con beads para todos los ensayos realizados. Esta población ha sido descrita como células agotadas transitorias tipo efectoras de acuerdo con Dolina y col. en el 2021, y se han encontrado en pacientes con VIH-1 (Jones y col., 2008). Sin embargo, al aplicar el protocolo de agotamiento con beads en células T CD8<sup>+</sup> de ratones A2ARKO (sin *background* OT-I), esa población PD1<sup>-</sup> TIM3<sup>+</sup> no aparece, y bajo estimulaciones crónicas, tienen un comportamiento similar a aquellas células OT-I estimuladas con el péptido SIINFEKL. En la figura suplementaria 1 se muestra una citometría previa al comienzo de los cultivos, que permite dar cuenta del estado de diferenciación de las células T CD8<sup>+</sup> al momento de empezar los ensayos en base a la expresión de CD44 y CD62L, mostrando que tanto las células WT como las OT-I entran en cultivo en condiciones iniciales similares. Otro aspecto que destacar es que las cadenas V $\alpha$ 2 y V $\beta$ 5 del TCR de los ratones OT-I podrían de alguna manera modificar o impedir la activación óptima de las células por parte de las beads, dando cuenta de los resultados observados.

## **6.2 Inhibición y activación farmacológica de A2AR.**

Una de las dos aproximaciones tomadas en este trabajo para evaluar el rol del A2AR y el efecto de la adenosina en el agotamiento fue la farmacológica, donde se trabajó con el inhibidor de A2AR SCH58261 y el agonista de los receptores de adenosina NECA en cultivos de células OT-I agotadas con el péptido como estímulo, utilizando concentraciones bajas y altas de los compuestos farmacológicos. De estos resultados es posible observar una tendencia hacia un fenotipo más agotado en los cultivos con SCH58261, evidenciado esto por el mayor porcentaje de células Tex así como una mayor expresión de TIM3 y TOX respecto de las células control con el vehículo DMSO,

así como una disminución en la expresión de CD73 en las células con SCH58261. Respecto de las células en las cuales se estimulan los receptores de adenosina por medio de NECA, éstas no presentan diferencias significativas respecto del control. Es importante mencionar que el agonista NECA no es específico para A2AR, sino que estimula todos los receptores de adenosina. Por esto, es importante realizar ensayos con un fármaco que estimule solo el receptor A2A para poder determinar de manera correcta su rol en el agotamiento, como lo es el CGS 21680. Es posible además que, dado que el medio con IL-7/IL-15 favorece el establecimiento de las células T<sub>pex</sub>, la estimulación con NECA no pueda llevar estas células a un estado más troncal del que ya están, dando cuenta de la falta de diferencias significativas. Por lo mismo, se propone llevar a cabo experimentos donde las células en cultivos con IL-2/IL-12, que favorecen la diferenciación de las células a T<sub>ex</sub>, sean suplementadas con NECA o CGS 21680, donde se espera que sea posible evidenciar una disminución de las poblaciones T<sub>pex</sub> a raíz de estos agonistas.

### **6.3 Agotamiento en ratones *knockout* condicionales para A2AR.**

La segunda aproximación tomada para evaluar el rol del A2AR en el agotamiento fue mediante el uso de ratones *knockout* condicionales para A2AR, cuyas células CD8<sup>+</sup> no expresan el receptor mediante delección del exón 2 del gen *adora*. Con base en los trabajos realizados mediante la aproximación farmacológica, era esperable en estos ensayos encontrar una mayor cantidad de células agotadas en los ratones A2ARKO, puesto que la adenosina no estaría ejerciendo su efecto inmunosupresor, pero dichas diferencias no fueron observadas en los ensayos realizados. Una posible explicación del porqué no es posible encontrar diferencias entre las células WT y KO para A2AR, pero sí con las células tratadas farmacológicamente es que en las células A2ARKO puede

existir un mecanismo de compensación genética desconocido a la fecha, donde uno o varios genes pueden estar compensando la pérdida de función del receptor A2A, dando lugar a un fenotipo que es funcionalmente similar al WT (Buglo y col., 2020). Otro aspecto a tener en cuenta es que los ensayos farmacológicos se realizaron en ratones OT-I utilizando el péptido SIINFEKL como estímulo, mientras que con los ratones A2AR KO, al no tener TCR OT-I, se utilizaron las beads, lo cual, de haber diferencias en los mecanismos de activación y agotamiento entre estos estímulos, podrían dar cuenta de las diferencias entre los agentes farmacológicos y la aproximación génica.

## **7. Proyecciones**

Grupos de investigación como los de Haskó y col. en el 2006, Briceño y col., en el 2021 y Roseblatt y col., en 2021, han establecido que la adenosina reduce la activación de las células T CD8<sup>+</sup> efectoras, quedando la interrogante del efecto de la adenosina en etapas posteriores de la diferenciación de estas células, lo cual podría abordarse con protocolos de agotamiento como los desarrollados en este laboratorio y posteriormente suplementar las células agotadas con adenosina, a modo de evaluar los cambios en la expresión de marcadores de agotamiento, activación, troncalidad o de apoptosis en estas células al ser estimuladas con la adenosina.

Continuando con el eje adenosinérgico, de los resultados obtenidos en este trabajo surgen interrogantes respecto a la real diferencia entre las células WT y A2ARKO, así como su rol en el agotamiento de las células T CD8<sup>+</sup>. Siendo que no fue observable una diferencia con los marcadores clásicos de agotamiento, sería interesante analizar la expresión y secreción de citoquinas en las células A2ARKO tras la aplicación del protocolo de agotamiento, ya que sería posible encontrar diferencias en el patrón de expresión de citoquinas. Otro aspecto por investigar sería la capacidad mitocondrial que

tienen estas células A2ARKO respecto de las WT para determinar si existen diferencias en el fitness mitocondrial entre estas células. Alternativamente, sería interesante realizar ensayos *in vivo* de transferencia de células a ratones portadores de tumores, a modo de evaluar las poblaciones de células T CD8<sup>+</sup> en los órganos linfoides y la capacidad de combatir el tumor de estas células.

Además de las interrogantes nacidas de los experimentos con las células A2ARKO, es importante mencionar que ahora en el laboratorio se dispone de un protocolo de agotamiento *in vitro* utilizando las beads anti CD3/CD28 gracias al presente trabajo, lo que abre las puertas para futuros análisis ya que se tiene como una alternativa al uso de ratones OT-I y del péptido SIINFEKL para las estimulaciones de las células, permitiendo hacer uso de ratones que no posean un receptor de linfocitos T transgénico para ensayos de agotamiento.

## **8. Conclusiones**

Por medio del presente trabajo, fue posible poner a punto un protocolo para inducir agotamiento en células T CD8<sup>+</sup> con el uso de beads anti CD3/CD28, evidenciado por la co-expresión de los marcadores PD1 y TIM3 en las células tratadas con el protocolo. La utilización de las IL-7/IL-15 permite mantener una población de células precursoras del agotamiento, o Tpex, mientras que el uso de IL-2/IL-12 sugiere una diferenciación a células terminalmente agotadas.

De esta manera, con los datos mostrados respecto de la inducción del agotamiento en ratones *knockout* condicionales para A2AR y su rol en el agotamiento, los datos sugieren que: en las condiciones analizadas, no es posible encontrar diferencias en el patrón de expresión de los marcadores de agotamiento analizados entre

ratones A2ARKO y WT, sugiriendo que, por si sola, la delección del A2AR no afecta el establecimiento del agotamiento en células T CD8<sup>+</sup> murinas, sin embargo, con una aproximación farmacológica sí es posible dar un poco de luz al papel del A2AR en el agotamiento: al inhibir su función mediante el SCH58261 aumentan las células agotadas o Tex, aunque no hay diferencias significativas en el agotamiento al utilizar el agonista NECA.

## 9. Bibliografía

Ahmadzadeh, M., Johnson, L. A., Heemskerk, B., Wunderlich, J. R., Dudley, M. E., White, D. E. & Rosenberg, S. A. (2009). Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD1 and are functionally impaired. *Blood*, 114(8), 1537-1544. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-195792>.

Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E. S., & Haskó, G. (2013). CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in Molecular Medicine*, 19(6), 355-367. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.03.005>.

Bastia, E., Xu, Y., Scibelli, A. C., Day, Y., Linden, J., Chen, J., & Schwarzschild, M. A. (2005). A Crucial Role for Forebrain Adenosine A2A Receptors in Amphetamine Sensitization. *Neuropsychopharmacology*, 30(5), 891-900. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300630>

Bono, M. R., Fernández, D., Flores-Santibáñez, F., Roseblatt, M., & Sauma, D. (2015). CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. *FEBS Letters*, 589(22), 3454-3460. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.07.027>.

Briceño, P., Rivas-Yáñez, E., Roseblatt, M., Parra-Tello, B., Farias, P., Vargas, L., Simon, V., Cárdenas, C. A., Lladser, A., Salazar-Onfray, F., Elorza, A. A., Bono, M. R., & Sauma, D. (2021). CD73 Ectonucleotidase Restrains CD8+ T Cell Metabolic Fitness and Anti-tumoral Activity. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.638037>

Das, M., Zhu, C. & Kuchroo, V. K. (2017). Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity. *Immunological Reviews*, 276(1), 97-111. <https://doi.org/10.1111/imr.12520>.

Dolina, J. S., Van Braeckel-Budimir, N., Thomas, G., & Salek-Ardakani, S. (2021). CD8+ T Cell Exhaustion in Cancer. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.715234>

Elliott, M. R., Chekeni, F. B., Trampont, P. C., Lazarowski, E. R., Kadl, A., Walk, S. F., Park, D., Woodson, R. I., Ostankovich, M., Sharma, P., Lysiak, J. J., Harden, T. K., Leitinger, N., & Ravichandran, K. S. (2009). Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*, 461(7261), 282-286. <https://doi.org/10.1038/nature08296>.

Flynn, K. J., Belz, G. T., Altman, J. D., Ahmed, R., Woodland, D. L., & Doherty, P. C. (1998). Virus-Specific CD8+ T Cells in Primary and Secondary Influenza Pneumonia. *Immunity*, 8(6), 683-691. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80573-7](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80573-7)

GAFFEN, S. & LIU, K. (2004). Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine*, 28(3), 109-123. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2004.06.010>.

González-Flores, D., Rodríguez, A. B. & Pariente, J. A. (2014). TNF $\alpha$ -induced apoptosis in human myeloid cell lines HL-60 and K562 is dependent of intracellular ROS generation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 390(1-2), 281-287. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-1979-5>.

Grosso, J. F., Kelleher, C. C., Harris, T. J., Maris, C. H., Hipkiss, E. L., De Marzo, A., Anders, R., Netto, G., Getnet, D., Bruno, T. C., Goldberg, M. V., Pardoll, D. M., & Drake, C. G. (2015). CD8+ T cell exhaustion: A barrier to cancer immunotherapy. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(12), 20-28. <https://doi.org/10.1002/jcb.24888>

- C. G. (2007). LAG-3 regulates CD8+ T cell accumulation and effector function in murine self- and tumor-tolerance systems. *Journal of Clinical Investigation*, 117(11), 3383-3392. <https://doi.org/10.1172/jci31184>.
- Haskó, G., Linden, J., Cronstein, B. N., & Pacher, P. (2006). Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(9), 759–770. <https://doi.org/10.1038/nrd2638>.
- HELLSTRÖM, I., HELLSTRÖM, K. E., PIERCE, G. E. & YANG, J. P. S. (1968). Cellular and Humoral immunity to Different Types of Human Neoplasms. *Nature*, 220(5174), 1352-1354. <https://doi.org/10.1038/2201352a0>.
- Hogquist, K. A., Jameson, S. C., Heath, W. R., Howard, J. L., Bevan, M. J., & Carbone, F. R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell*, 76(1), 17-27. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90169-4.
- Huard, B., Gaulard, P., Faure, F., Hercend, T., & Triebel, F. (1994). Cellular expression and tissue distribution of the human LAG-3-encoded protein, an MHC class II ligand. *Immunogenetics*, 39(3). <https://doi.org/10.1007/bf00241263>.
- Jones, R., Ndhlovu, L. C., Barbour, J. D., Sheth, P. M., Jha, A. R., Long, B. A., Wong, J. J., Satkunarajah, M., Schweneker, M., Chapman, J. M., Gyenes, G., Vali, B., Hyrcza, M. D., Yue, F., Kovacs, C., Sassi, A., Loutfy, M., Halpenny, R., Persad, D., . . . Ostrowski, M. (2008). Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *Journal of Experimental Medicine*, 205(12), 2763–2779. <https://doi.org/10.1084/jem.20081398>
- Kaech, S. M., Tan, J. T., Wherry, E. J., Konieczny, B. T., Surh, C. D., & Ahmed, R. (2003). Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nature Immunology*, 4(12), 1191–1198. <https://doi.org/10.1038/ni1009>.
- Kaech, S. M., & Wherry, E. J. (2007). Heterogeneity and Cell-Fate Decisions in Effector and Memory CD8+ T Cell Differentiation during Viral Infection. *Immunity*, 27(3), 393–405. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.08.007>.
- Kallies, A., Zehn, D., & Utzschneider, D. T. (2019). Precursor exhausted T cells: key to successful immunotherapy? *Nature Reviews Immunology*, 20(2), 128-136. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0223-7>.
- Keir, M. E., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. (2007). PD1 Regulates Self-Reactive CD8+ T Cell Responses to Antigen in Lymph Nodes and Tissues. *The Journal of Immunology*, 179(8), 5064-5070. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.8.5064>.
- Kosmidis, C., Sapalidis, K., Koletsa, T., Kosmidou, M., Efthimiadis, C., Anthimidis, G., Varsamis, N., Michalopoulos, N., Koulouris, C., Atmatzidis, S., Liavas, L., Strati, T. M., Koimtzis, G., Tsakalidis, A., Mantalovas, S., Zarampouka, K., Florou, M., Giannakidis, D. E., Georgakoudi, E., . . . Kesisoglou, I. (2018). Interferon- $\gamma$  and Colorectal Cancer: an up-to date. *Journal of Cancer*, 9(2), 232-238. <https://doi.org/10.7150/jca.22962>.
- Lalvani, A., Brookes, R. H., Hambleton, S., Britton, W. J., Hill, A. V. S., & McMichael, A. J. (1997). Rapid Effector Function in CD8+ Memory T Cells. *Journal of Experimental Medicine*, 186(6), 859–865. <https://doi.org/10.1084/jem.186.6.859>

- Liang, C., Huang, S., Zhao, Y., Chen, S., & Li, Y. (2021). TOX as a potential target for immunotherapy in lymphocytic malignancies. *Biomarker Research*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s40364-021-00275-y>.
- Linnemann, C., Schildberg, F. A., Schurich, A., Diehl, L., Hegenbarth, S., Endl, E., Lacher, S. K., Müller, C. E., Frey, J., Simeoni, L., Schraven, B., Stabenow, D., & Knolle, P. A. (2009). Adenosine regulates CD8 T-cell priming by inhibition of membrane-proximal T-cell receptor signalling. *Immunology*, 128(1pt2), e728–e737. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03075.x>
- Liu, Y., Zhou, N., Zhou, L., Wang, J., Zhou, Y., Zhang, T., Fang, Y., Deng, J., Gao, Y., Liang, X., Lv, J., Wang, Z., Xie, J., Xue, Y., Zhang, H., Ma, J., Tang, K., Fang, Y., Cheng, F., . . . Huang, B. (2021). IL-2 regulates tumor-reactive CD8+ T cell exhaustion by activating the aryl hydrocarbon receptor. *Nature Immunology*, 22(3), 358–369. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00850-9>.
- Manieri, N. A., Chiang, E. Y., & Grogan, J. L. (2017). TIGIT: A Key Inhibitor of the Cancer Immunity Cycle. *Trends in Immunology*, 38(1), 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.10.002>.
- Miller, B. C., Sen, D. R., Al Aboosy, R., Bi, K., Virkud, Y. V., LaFleur, M. W., Yates, K. B., Lako, A., Felt, K., Naik, G. S., Manos, M., Gjini, E., Kuchroo, J. R., Ishizuka, J. J., Collier, J. L., Griffin, G. K., Maleri, S., Comstock, D. E., Weiss, S. A., . . . Haining, W. N. (2019). Subsets of exhausted CD8+ T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *Nature Immunology*, 20(3), 326-336. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0312-6>.
- Miller, N. E., Bonczyk, J. R., Nakayama, Y., & Suresh, M. (2005). Role of Thymic Output in Regulating CD8 T-Cell Homeostasis during Acute and Chronic Viral Infection. *Journal of Virology*, 79(15), 9419-9429. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.15.9419-9429.2005>.
- Moskophidis, D., Lechner, F., Pircher, H. & Zinkernagel, R. M. (1993). Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature*, 362(6422), 758-761. <https://doi.org/10.1038/362758a0>.
- Ohaegbulam, K. C., Assal, A., Lazar-Molnar, E., Yao, Y. & Zang, X. (2015). Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD1 and PD-L1 pathway. *Trends in Molecular Medicine*, 21(1), 24-33. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.10.009>.
- Ohta, A., Gorelik, E., Prasad, S. J., Ronchese, F., Lukashev, D., Wong, M. K. K., Huang, X., Caldwell, S., Liu, K., Smith, P., Chen, J. F., Jackson, E. K., Apasov, S., Abrams, S., & Sitkovsky, M. (2006). A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(35), 13132-13137. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605251103>.
- Ohta, A., Ohta, A., Madasu, M., Kini, R., Subramanian, M., Goel, N., & Sitkovsky, M. (2009). A2A Adenosine Receptor May Allow Expansion of T Cells Lacking Effector Functions in Extracellular Adenosine-Rich Microenvironments. *The Journal of Immunology*, 183(9), 5487-5493. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901247>.

Philip, M. & Schietinger, A. (2019). Heterogeneity and fate choice: T cell exhaustion in cancer and chronic infections. *Current Opinion in Immunology*, 58, 98-103. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.04.014>.

Regateiro, F. S., Cobbold, S. P., & Waldmann, H. (2012). CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments. *Clinical and Experimental Immunology*, 171(1), 1-7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2012.04623.x>.

Robson, S. C., Sévigny, J., & Zimmermann, H. (2006). The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signalling*, 2(2), 409-430. <https://doi.org/10.1007/s11302-006-9003-5>.

Roseblatt, M., Parra-Tello, B., Briceño, P., Rivas-Yáñez, E., Tucer, S., Saavedra-Almarza, J., Hörmann, P., Martínez, B. A., Lladser, A., Roseblatt, M., Cekic, C., Bono, M. R., & Sauma, D. (2021). Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) Regulates the Survival of CD8+ T Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.647058>

Salmaninejad, A., Khoramshahi, V., Azani, A., Soltaninejad, E., Aslani, S., Zamani, M. R., Zal, M., Nesaei, A. & Hosseini, S. M. (2017). PD1 and cancer: molecular mechanisms and polymorphisms. *Immunogenetics*, 70(2), 73-86. <https://doi.org/10.1007/s00251-017-1015-5>.

Scharping, N. E., Rivadeneira, D., Menk, A. V., Vignali, P., Ford, B., Rittenhouse, N., Peralta, R., Wang, Y., Wang, Y., DePeaux, K., Poholek, A. C., & Delgoffe, G. M. (2021). Mitochondrial stress induced by continuous stimulation under hypoxia rapidly drives T cell exhaustion. *Nature Immunology*, 22(2), 205-215. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00834-9>.

Schenk, U., Westendorf, A. M., Radaelli, E., Casati, A., Ferro, M., Fumagalli, M., Verderio, C., Buer, J., Scanziani, E., & Grassi, F. (2008). Purinergic Control of T Cell Activation by ATP Released Through Pannexin-1 Hemichannels. *Science Signaling*, 1(39). <https://doi.org/10.1126/scisignal.1160583>.

Schluns, K. S., Williams, K. M., Ma, A., Zheng, X. X., & Lefrançois, L. (2002). Cutting Edge: Requirement for IL-15 in the Generation of Primary and Memory Antigen-Specific CD8 T Cells. *Journal of Immunology*, 168(10), 4827-4831. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.10.4827>.

Sekine, T., Perez-Potti, A., Nguyen, S., Gorin, J. B., Wu, V. H., Gostick, E., Llewellyn-Lacey, S., Hammer, Q., Falck-Jones, S., Vangeti, S., Yu, M., Smed-Sørensen, A., Gaballa, A., Uhlin, M., Sandberg, J. K., Brander, C., Nowak, P., Goepfert, P. A., Price, D. A., . . . Buggert, M. (2020). TOX is expressed by exhausted and polyfunctional human effector memory CD8 + T cells. *Science Immunology*, 5(49). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aba7918>.

Sharpe, A. H., Wherry, E. J., Ahmed, R. & Freeman, G. J. (2007). The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nature Immunology*, 8(3), 239-245. <https://doi.org/10.1038/ni1443>.

Sitkovsky, M. V., Lukashev, D., Apasov, S., Kojima, H., Koshiba, M., Caldwell, C., Ohta, A., & Thiel, M. (2004). Physiological Control of Immune Response and Inflammatory

Tissue Damage by Hypoxia-Inducible Factors and Adenosine A2A Receptors. *Annual Review of Immunology*, 22(1), 657-682. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104731>.

Speiser, D. E., Utzschneider, D. T., Oberle, S. G., Münz, C., Romero, P. & Zehn, D. (2014). T cell differentiation in chronic infection and cancer: functional adaptation or exhaustion? *Nature Reviews Immunology*, 14(11), 768-774. <https://doi.org/10.1038/nri3740>.

Stagg, J., & Smyth, M. J. (2010). Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene*, 29(39), 5346-5358. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.292>.

Trautmann, A. (2009). Extracellular ATP in the Immune System: More Than Just a «Danger Signal». *Science Signaling*, 2(56), pe6-pe6. <https://doi.org/10.1126/scisignal.256pe6>.

Utzschneider, D. T., Charmoy, M., Chennupati, V., Pousse, L., Ferreira, D. P., Calderon-Copete, S., Danilo, M., Alfei, F., Hofmann, M., Wieland, D., Pradervand, S., Thimme, R., Zehn, D., & Held, W. (2016). T Cell Factor 1-Expressing Memory-like CD8+ T Cells Sustain the Immune Response to Chronic Viral Infections. *Immunity*, 45(2), 415-427. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.07.021>.

Utzschneider, D. T., Legat, A., Fuertes Marraco, S. A., Carrié, L., Luescher, I., Speiser, D. E., & Zehn, D. (2013). T cells maintain an exhausted phenotype after antigen withdrawal and population reexpansion. *Nature Immunology*, 14(6), 603-610. <https://doi.org/10.1038/ni.2606>.

Virgin, H. W., Wherry, E. J. & Ahmed, R. (2009). Redefining Chronic Viral Infection. *Cell*, 138(1), 30-50. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.036>

Vivier, E., & Anfossi, N. (2004). Inhibitory NK-cell receptors on T cells: witness of the past, actors of the future. *Nature Reviews Immunology*, 4(3), 190-198. <https://doi.org/10.1038/nri1306>.

Wherry, E. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., van der Most, R. & Ahmed, R. (2003). Viral Persistence Alters CD8 T-Cell Immunodominance and Tissue Distribution and Results in Distinct Stages of Functional Impairment. *Journal of Virology*, 77(8), 4911-4927. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.8.4911-4927.2003>.

Williams, M. A. & Bevan, M. J. (2007). Effector and Memory CTL Differentiation. *Annual Review of Immunology*, 25(1), 171-192. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141548>.

Workman, C. J., Cauley, L. S., Kim, I. J., Blackman, M. A., Woodland, D. L., & Vignali, D. A. A. (2004). Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223) Regulates the Size of the Expanding T Cell Population Following Antigen Activation In Vivo. *The Journal of Immunology*, 172(9), 5450-5455. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.9.5450>.

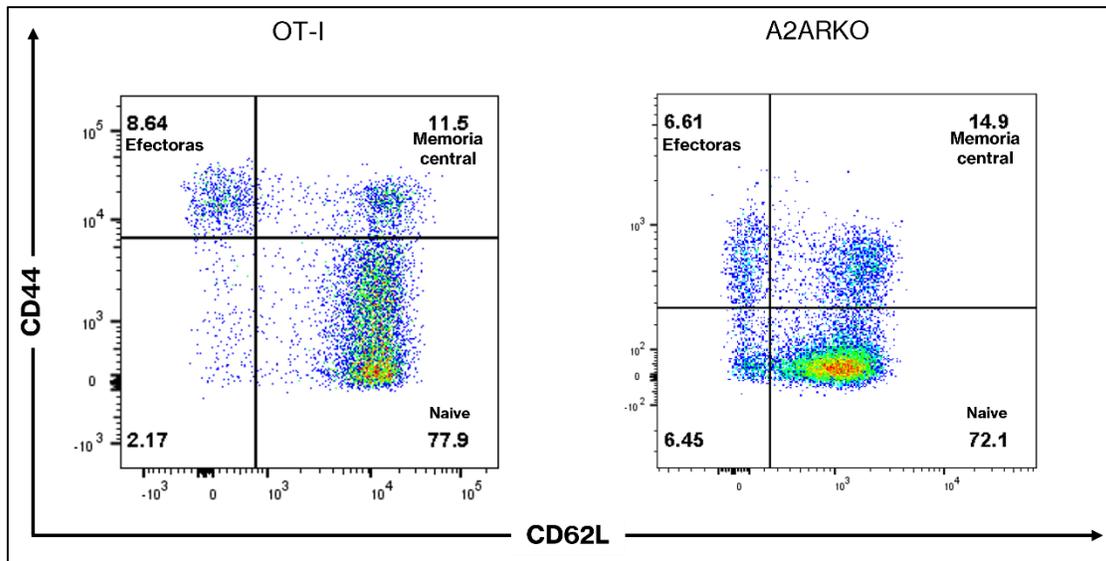
Yang, Z., Grote, D. M., Ziesmer, S. C., Niki, T., Hirashima, M., Novak, A. J., Witzig, T. E., & Ansell, S. M. (2012). IL-12 upregulates TIM-3 expression and induces T cell exhaustion in patients with follicular B cell non-Hodgkin lymphoma. *Journal of Clinical Investigation*, 122(4), 1271–1282. <https://doi.org/10.1172/jci59806>.

Yu, X., Harden, K., C Gonzalez, L., Francesco, M., Chiang, E., Irving, B., Tom, I., Ivelja, S., Refino, C. J., Clark, H., Eaton, D., & Grogan, J. L. (2008). The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nature Immunology*, 10(1), 48-57. <https://doi.org/10.1038/ni.1674>.

Zajac, A. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., Sourdive, D. J., Suresh, M., Altman, J. D. & Ahmed, R. (1998). Viral Immune Evasion Due to Persistence of Activated T Cells Without Effector Function. *Journal of Experimental Medicine*, 188(12), 2205-2213. <https://doi.org/10.1084/jem.188.12.2205>.

Zhao, M., Kiernan, C. H., Stairiker, C. J., Hope, J. L., Leon, L. G., van Meurs, M., Brouwers-Haspels, I., Boers, R., Boers, J., Gribnau, J., van IJcken, W. F. J., Bindels, E. M., Hoogenboezem, R. M., Erkeland, S. J., Mueller, Y. M., & Katsikis, P. D. (2020). Rapid *in vitro* generation of bona fide exhausted CD8+ T cells is accompanied by Tcf7 promotor methylation. *PLOS Pathogens*, 16(6), e1008555. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008555>.

## 10. Anexo



**Figura suplementaria 1. Expresión de CD44 y CD62L y poblaciones de células T CD8+ en ratones OT-I y A2ARKO (TCR WT).** Resultado de citometría de flujo representativa mostrando los porcentajes de células efectoras, de memoria central y naive o vírgenes en células T CD8+ antes de comenzar los ensayos de agotamiento *in vitro*, comparando ratones OT-I y A2ARKO (TCR WT).