

ROL DE CD73 Y A2AR EN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS T CD8+ AGOTADAS EN EL NICHOS TUMORAL

Tesis entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Grado de Doctor en Biotecnología

Facultad de Ciencias

Por

Juan Pablo Saavedra Almarza

Diciembre, 2024

Directora de Tesis: Dra. Daniela Sauma Mahaluf.

Co-Directora de Tesis: Dra. María Rosa Bono Merino.

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el/la candidato/a

Juan Pablo Saavedra Almarza

ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Biotecnología Molecular, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día X de X de XXXX.

Directora de Tesis:

Dra. Daniela Sauma Mahaluf

Co-Directora de Tesis:

Dra. María Rosa Bono Merino

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Miguel Allende Connely (Presidente)

Dr. Álvaro Glavic Maurer

Dra. Fabiola Osorio Olivares

BIOGRAFÍA



Nací en Santiago de Chile un 24 de febrero de 1996. El año 2014 empecé a estudiar ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile. En 2017, participé en la competencia internacional de biología sintética iGEM como parte del equipo UChile OpenBio-CeBiB en Boston, Estados Unidos. Terminé mis ramos el primer semestre del año 2018 y se me otorgó el grado de Licenciado en Ingeniería en Biotecnología Molecular el año 2019.

En febrero de 2018 ingresé a realizar una unidad de investigación al Laboratorio de Inmunoncología a cargo del Dr. Álvaro Lladser, en la Fundación Ciencia & Vida. Posteriormente, en el mismo laboratorio, realicé mi trabajo de Seminario de Título y lo defendí públicamente en 2019. Con esto se me otorgó el título de Ingeniero en Biotecnología Molecular en 2020. Posterior a la defensa continué trabajando para el laboratorio de Inmunoncología como asistente de investigación hasta finales de febrero de 2020.

En marzo de 2020 ingresé al programa de Doctorado en Biotecnología Molecular de la Universidad de Chile y me integré al Laboratorio de Inmunología de la misma universidad. Durante mi paso en el Laboratorio de Inmunología hice 2 Unidades de Investigación y posteriormente realicé mi tesis doctoral bajo la tutela de la Dra. Daniela Sauma y cotutela de la Dra. María Rosa Bono.

AGRADECIMIENTOS

No puedo dejar de agradecer a las siguientes personas y fuentes de financiamiento que me apoyaron en el desarrollo de este trabajo:

A mis padres Ximena y Juan, y a mi hermano Diego por el apoyo incondicional que me han brindado durante este proceso. No estaría donde estoy ni sería quien soy de no ser por ellos.

A todos los integrantes del laboratorio de Inmunología junto a los que he crecido profesionalmente y de los que he podido aprender. Agradezco especialmente a Solange Gouët por estar siempre dispuesta a ayudarme en todos mis experimentos, la realización del t-SNE y por la amistad que formamos. A Felipe Malgue y José Corrales por el apoyo que me brindaron en el mesón. A Moira García por su ayuda en mis experimentos y la amistad que formamos. A Catalina Rodríguez por su buena voluntad y por su apoyo en el PCR en tiempo real. A Justine Castañeda por su ayuda con las inyecciones intravenosas. A Nicolás Valdivieso por su buena disposición siempre para ayudar. A Valeska Simon por su paciencia y apoyo en la citometría de flujo y a Leonardo Vargas por su ayuda en el *Cell Sorter*. Al Dr. Mario Roseblatt y la Dra. Sarah Núñez por todos los aportes que me entregaron cada vez que ensayé mis defensas o presenté mis resultados en reunión. A mi directora de tesis la Dra. Daniela Sauma y a mi co-directora la Dra. María Rosa Bono, por apoyarme y guiarme durante

todo el desarrollo de este trabajo y en mi formación como Doctor, así como también por darme la oportunidad de formar parte de su laboratorio.

A mis amigos Andrés Soazo y Claudio Valenzuela, por estar siempre dispuestos a escucharme y a apoyarme. Además, me gustaría reconocer la ayuda que Claudio me brindó durante la programación del t-SNE en R y que permitió las figuras con t-SNE presentadas en este trabajo.

Al Dr. Lladser y a mi amigo el Dr. Diego Figueroa del Laboratorio de Inmunoncología de la Fundación Ciencia & Vida, siempre dispuestos a darme consejo y prestarme material y ayuda de ser necesario.

Al Dr. Camilo Villaman y el Dr. Alberto Martin del Laboratorio de Biología de Redes de la Fundación Ciencia & Vida por su apoyo en el análisis de RNAseq.

Al Dr. Felipe Flores-Santibáñez por enseñarnos a realizar t-SNE en R.

A la Dra. Fabiola Osorio y a Mónica Guzmán del Laboratorio de Inmunología y Estrés Celular de la Universidad de Chile por su ayuda con la realización de algunos qPCR que se hicieron con la intención de complementar este trabajo.

A Micaela Ricca y el Dr. Sebastián Valenzuela por su buena disposición y el cuidado y mantención de los animales en el Bioterio de la Fundación Ciencia & Vida.

Finalmente, agradezco a las siguientes fuentes de financiamiento: FONDECYT 1220196 (Dra. Daniela Sauma), FONDECYT 1230183 (Dra. María Rosa Bono), Beca de Doctorado Nacional 21201553 (Juan Saavedra).

INDICE DE CONTENIDO

BIOGRAFÍA.....	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE DE CONTENIDO.....	v
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURA.....	xii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Cáncer e inmunoterapias	1
1.2. Los linfocitos T CD8+ citotóxicos	2
1.3. El nicho tumoral alberga linfocitos T CD8+ agotados	3
1.4. Los linfocitos T CD8+ precursores agotados mantienen las poblaciones agotadas en el nicho tumoral	5
1.5. La exposición a adenosina en el microambiente tumoral	6
HIPÓTESIS CIENTÍFICA	11
HIPÓTESIS TECNOLÓGICA.....	11
OBJETIVO GENERAL.....	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
2. MATERIALES Y MÉTODOS	13
2.1. Animales.....	13
2.2. Línea celular	14
2.3. Preparación de suspensiones celulares:.....	14
2.4. Separación inmunomagnética de linfocitos T CD8+	15
2.5. Protocolo de agotamiento celular <i>in vitro</i>	16
2.6. Fármacos utilizados en los experimentos de agotamiento	17

2.7. Citometría de flujo	18
2.8. Tinción con <i>CellTrace Violet</i>	21
2.9. Evaluación de la producción de citoquinas en los experimentos de agotamiento.....	21
2.11. Extracción de ARN	22
2.12. RNAseq	22
2.13. PCR en tiempo real	23
2.14. Crecimiento tumoral	24
2.15. Cotransferencia adoptiva.....	25
2.16. Administración de SYN115.....	25
2.17. Análisis estadístico	26
3. RESULTADOS	27
Objetivo 1. Estudiar el papel de CD73 y de la señalización de adenosina por medio de A2AR en la diferenciación y fenotipo de los linfocitos T CD8+ agotados y precursores agotados <i>in vitro</i>	27
Objetivo 1.1. Estandarizar un protocolo para la generación de linfocitos T CD8+ agotados <i>in vitro</i> e identificar a las poblaciones agotadas (Tex) y precursoras agotadas (Tpex).	27
Objetivo 1.2. Estudiar el papel de CD73 en la generación y fenotipo de las poblaciones de linfocitos T CD8+ agotados (Tex) y precursoras agotadas (Tpex) <i>in vitro</i>	41
Objetivo 1.3. Evaluar el papel de la señalización de adenosina en la generación, diferenciación y fenotipo de las poblaciones de linfocitos T CD8+ agotados (Tex) y precursoras agotadas (Tpex) generados <i>in vitro</i>	54
Objetivo 2. Analizar el papel de CD73 y de la señalización de adenosina por medio de A2AR en la diferenciación de linfocitos T CD8+ agotados y precursores agotados en el nicho tumoral.	61
Objetivo 2.1. Identificar a las poblaciones agotadas (Tex) y precursoras agotadas (Tpex) en el nicho tumoral y estudiar la expresión de CD73 en estas poblaciones.	61

Objetivo 2.2. Estudiar el papel de CD73 en la distribución de linfocitos T CD8+ agotados y precursores agotados en el nicho tumoral.....	64
Objetivo 2.3. Evaluar el rol de la señalización de adenosina por medio de A2AR en el establecimiento de linfocitos T CD8+ agotados y precursores agotados en el nicho tumoral.	73
4. DISCUSIÓN.....	80
5. CONCLUSIONES.....	92
6. PROYECCIONES.....	93
7. BIBLIOGRAFÍA.....	95
8. ANEXO	104

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Lista de fármacos utilizados en los experimentos de agotamiento.	18
Tabla 2 Lista de anticuerpos utilizados para citometría de flujo.....	20
Tabla 3. Secuencias de partidores utilizados en este trabajo.	24
Tabla 4. Características de los marcadores fenotípicos de las distintas poblaciones de linfocitos T CD8+ analizadas durante este trabajo.....	30
Tabla 5. Lista de genes asociados a los términos de ontología génica (Gene ontology, GO) con enriquecimiento funcional.	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Protocolo experimental para el estudio del agotamiento de linfocitos T CD8+ <i>in vitro</i> y sobrevivencia de los linfocitos agotados.....	29
Figura 2. La activación crónica de linfocitos T CD8+ <i>in vitro</i> genera un aumento en la proporción de células que expresan marcadores de activación y una disminución de células que expresan marcadores de troncalidad.....	32
Figura 3. La activación crónica de linfocitos T CD8+ <i>in vitro</i> genera un aumento en la proporción de células que expresan moléculas asociadas al agotamiento.	33
Figura 4. La activación crónica de linfocitos T CD8+ <i>in vitro</i> disminuye su potencial efector.....	34
Figura 5. La expresión de PD-1 y TIM3 distingue células con distinto grado de activación y troncalidad, similares a T _{pex} y T _{ex}	36
Figura 6. La expresión de PD-1 y TIM3 distingue células con distinto grado de agotamiento y potencial efector, similares a T _{pex} y T _{ex}	37
Figura 7. La activación crónica de linfocitos vírgenes <i>in vitro</i> genera T _{pex} que originan células más diferenciadas al aumentar el tiempo de activación.....	40
Figura 8. Los linfocitos T _{pex} producidos mediante un cultivo de agotamiento <i>in vitro</i> tienen mayor expresión de CD73 que los linfocitos T _{ex}	42
Figura 9. La expresión de CD73 aumenta durante la estimulación crónica <i>in vitro</i> de linfocitos T CD8+ vírgenes.	43
Figura 10. El agotamiento de los linfocitos T CD8+ <i>in vitro</i> es independiente de la capacidad productora de adenosina de CD73.	45
Figura 11. CD73 promueve la diferenciación de T _{ex} <i>in vitro</i>	47
Figura 12. CD73 limita el potencial efector de los linfocitos T CD8+ durante el agotamiento <i>in vitro</i>	50
Figura 13. CD73 promueve la formación de linfocitos T CD8+ agotados productores de citoquinas efectoras.	53

Figura 14. Los linfocitos T CD8+ agotados <i>in vitro</i> expresan mayoritariamente Adora2a.....	55
Figura 15. La señalización de adenosina mediada por A2AR durante el agotamiento de los linfocitos T CD8+ <i>in vitro</i> reduce la formación de Tex.	56
Figura 16. La señalización de adenosina mediada por A2AR durante el agotamiento de linfocitos T CD8+ <i>in vitro</i> promueve la expresión de CD73 y CD62L.	58
Figura 17. La señalización de adenosina mediada por A2AR durante el agotamiento de linfocitos T CD8+ <i>in vitro</i> disminuye su estado de activación...59	59
Figura 18. La señalización de adenosina mediada por A2AR durante el agotamiento <i>in vitro</i> de linfocitos T CD8+ inhibe la expresión de TOX y PD-1. .60	60
Figura 19. Expresión de CD73 en linfocitos T CD8+ presentes en el nicho tumoral y con diferentes grados de agotamiento.	62
Figura 20. Linfocitos T _{pex} en tumor expresan principalmente CD73.	64
Figura 21. Modelo de estudio <i>in vivo</i> para analizar el papel de CD73 en el agotamiento y crecimiento tumoral.....	65
Figura 22. CD73 reduce la frecuencia de células T CD8+ intratumorales y en el nódulo drenante del tumor.....	67
Figura 23. CD73 limita levemente la adquisición de un fenotipo T _{pex} en linfocitos T CD8+ <i>in vivo</i>	69
Figura 24. Análisis en t-SNE de las poblaciones de linfocitos T CD8+ intratumorales en el experimento de cotransferencia de células OT-I WT y OT-I CD73 KO.	71
Figura 25. La cotransferencia de linfocitos T CD8+ WT y CD73 KO promueve fenotipos agotados y disminuye la frecuencia de células efectoras en la población endógena de linfocitos T CD8+ intratumorales.	72
Figura 26. El bloqueo de A2AR con SYN115 en ratones con tumor B16.OVA no cambia la frecuencia y número de linfocitos T CD8+ en los órganos estudiados.	74

Figura 27. El bloqueo de A2AR con SYN115 en ratones con tumor B16.OVA favorece la formación de linfocitos Tex intratumorales.	75
Figura 28. Análisis en t-SNE de las poblaciones de linfocitos T CD8+ intratumorales con y sin el tratamiento con SYN115.	77
Figura 29. El bloqueo de A2AR con SYN115 en ratones con tumor promueve la formación de linfocitos T CD8+ que expresan marcadores de agotamiento mientras disminuye la frecuencia de linfocitos que expresan marcadores de troncalidad.	79
Figura 30. CD73 contribuye al avance del agotamiento de Tpex a Tex mientras la adenosina vía A2AR retarda este proceso.	93

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURA

ADN	: Ácido desoxirribonucleico.
ADNc	: ADN complementario.
AMP	: Adenosín monofosfato.
APCP	: <i>Adenosine 5'-(α,β-methylene)diphosphate</i> . Adenosin 5'-(α,β -metileno) difosfato.
ARN	: Ácido ribonucleico.
ATP	: Adenosín trifosfato.
CD	: Clúster de diferenciación.
DBSCAN	: <i>Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise</i> . Agrupamiento especial basado en densidad de aplicaciones con ruido.
DMSO	: Dimetilsulfóxido.
dLN	: <i>Draining lymph node</i> . Nódulo linfático drenante.
FBS	: <i>Fetal Bovine serum</i> . Suero fetal bovino.
FDR	: <i>False Discovery Rate</i> . Tasa de descubrimiento falso.
GO	: <i>Gene Ontology</i> , Ontología génica.
IFN γ	: Interferón γ .
IL	: Interleuquina.
KO	: <i>Knock out</i> . Inactivado o eliminado.
LAG-3	: <i>Lymphocyte-activation gene 3</i> . Gen 3 de activación de linfocitos.
MHC	: <i>Major histocompatibility complex</i> . Complejo principal de histocompatibilidad.
OVA	: Ovoalbúmina.
PBS	: <i>Phosphate buffered saline</i> . Tampón Fosfato salino.
PCA	: <i>Principal Component Analysis</i> . Análisis de componentes principales.
PCR	: <i>Polymerase chain reaction</i> . Reacción en cadena de polimerasa.

PD-1	: <i>Programmed death 1</i> . Proteína de muerte celular programada 1.
PMA	: <i>Phorbol-12-myristate-13-acetate</i> . Forbol-12-miristato 13-acetato.
RNA-seq	: <i>RNA sequencing</i> . Secuenciación del ARN.
RPMI	: <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> . Medio de <i>Roswell Park Memorial Institute</i> .
STR	: <i>Strength</i> . Fuerza de enriquecimiento.
TCF1	: <i>T cell factor 1</i> . Factor de célula T 1.
TCR	: <i>T cell receptor</i> . Receptor de célula T.
Tef	: <i>Effector T cell</i> . Linfocito T efector.
Tex	: <i>Exhausted T cell</i> . Linfocito T agotado.
TIGIT	: <i>T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains</i> . Inmunoglobulina de células T y dominio ITIM.
TIM3	: <i>T cell immunoglobulin and mucin domain 3</i> . Inmunoglobulina de células T que contiene el dominio de mucina-3.
Tcm	: <i>Central memory T cell</i> . Célula T de memoria central.
Tem	: <i>Effector memory T cell</i> . Célula T de memoria efectora.
Tint	: Célula T agotada en estado de diferenciación intermedio o transitorio.
Tmem	: Linfocito T de memoria.
TNF α	: <i>Tumor necrosis factor α</i> . Factor de necrosis Tumoral α .
TOX	: <i>Thymocyte selection-associated high mobility group box</i> . Caja de alta movilidad asociada con la selección de timocitos.
Tpex	: <i>Precursor exhausted T cell</i> . Linfocito T precursor agotado.
t-SNE	: <i>T-distributed stochastic Neighbor Embedding</i> . Incrustación de vecinos estocásticos distribuidos en t.
WT	: <i>Wild type</i> . Tipo silvestre.

RESUMEN

El agotamiento es un proceso de diferenciación que caracteriza la inmunidad citotóxica de las células T CD8+ frente a células tumorales o infecciones crónicas y que dificulta la erradicación de tumores. Las células T CD8+ agotadas (Tex) derivan de células T precursoras agotadas (Tpex), que presentan características de célula de memoria como capacidad de auto-renovación, y de linfocitos agotados como la expresión de receptores inhibitorios. Las células Tpex mantienen la respuesta inmune contra tumores y son esenciales para la efectividad de la terapia anti PD-1 aumentando el número de células Tpex y Tex, pudiendo estas últimas atacar directamente las células tumorales.

Las células Tpex expresan la ectoenzima CD73 productora de adenosina, un nucleósido inmunosupresor que se acumula en altos niveles en el nicho tumoral. Sin embargo, no es clara la relación entre el eje CD73/adenosina y la diferenciación Tpex/Tex, ni los efectos del bloqueo inmunoterapéutico sobre estas células. En este trabajo se estudió el rol de CD73 y A2AR en la generación de células Tpex y Tex *in vitro* e *in vivo*. Para los estudios *in vitro*, estandarizamos un protocolo previamente descrito para inducir agotamiento en células T CD8+ mediante estimulación crónica con péptido y evaluamos por citometría de flujo la formación de células Tpex y Tex. Para los estudios *in vivo*, analizamos el agotamiento de células T CD8+ en un modelo de melanoma murino.

La cinética de expresión de CD73 en células T CD8+ durante la diferenciación a Tpex *in vitro* mostró un aumento de CD73, seguido de una posterior reducción de CD73 cuando las células adquirían el fenotipo de Tex. Cuando se utilizaron ratones CD73 knockout (KO), los cuales no expresan CD73, observamos una reducción en la frecuencia de Tex y un déficit de células agotadas capaces de producir citoquinas efectoras, comparado a células Tex de ratones silvestres (WT). Al bloquear farmacológicamente CD73 durante la

generación de células agotadas *in vitro*, no observamos diferencias en la formación de células con fenotipo agotado. Además, experimentos de RNAseq de células WT y CD73 KO agotadas *in vitro*, demostraron que las células de ratones CD73 KO tienen mayor expresión de genes asociados a la respuesta inmune que su contraparte WT, sugiriendo menor agotamiento en células provenientes de ratones CD73 KO. Por otro lado, analizamos la expresión de CD73 en linfocitos T CD8+ agotados presentes en tumores de melanoma B16.OVA y confirmamos una alta frecuencia de células T_{pex} CD73+ comparado a Tex. Finalmente, realizamos una cotransferencia de linfocitos T CD8+ vírgenes WT y CD73 KO en ratones portadores de tumores de melanoma B16.OVA y observamos una mayor frecuencia de linfocitos CD73 KO con fenotipo T_{pex} en el tumor y el nódulo drenante en relación a su contraparte WT.

En cuanto al papel de A2AR en el agotamiento, analizamos la expresión de este receptor a través de RNAseq y PCR en tiempo real y encontramos que tanto células WT como CD73 KO agotadas *in vitro* expresan A2AR, pero este receptor se expresa menos en T_{pex} CD73 KO que WT. Experimentos de agotamiento de células T CD8+ *in vitro* en presencia de agonistas de A2AR demostraron una disminución en la expresión de moléculas asociadas a activación y agotamiento, una reducción en la frecuencia de células Tex y un aumento en la expresión de moléculas asociadas a troncalidad relativo al control. Por otra parte, ratones portadores de un tumor de melanoma B16.OVA, tratados con un antagonista específico de A2AR (SYN115), muestran un aumento en la frecuencia de Tex y una reducción en la frecuencia de células que expresan moléculas asociadas a la troncalidad relativo al control.

Este trabajo entrega evidencia que sugiere roles diferentes para CD73 y la adenosina en el agotamiento de los linfocitos T CD8+. Mientras CD73 promueve el avance de la diferenciación desde linfocitos T_{pex} a Tex en los linfocitos T CD8+, la adenosina a través de su señalización por A2AR frena este proceso promoviendo la mantención de células T_{pex}.

ABSTRACT

Exhaustion is a differentiation process that characterizes the cytotoxic immunity of CD8⁺ T cells against tumor cells or chronic infections and makes tumor eradication difficult. Exhausted CD8⁺ T cells (Tex) are derived from exhausted precursor T cells (Tpex), which present memory cell characteristics such as self-renewal capacity, and exhausted lymphocytes characteristics such as the expression of inhibitory receptors. Tpex cells maintain the immune response against tumors and are essential for the effectiveness of anti-PD-1 therapy by increasing the number of Tpex and Tex cells, the latter being able to directly attack tumor cells.

Tpex cells express the adenosine-producing ectoenzyme CD73, an immunosuppressive nucleoside that accumulates at high levels in the tumor niche and to which Tpex cells are also exposed. However, the relationship between the CD73/adenosine axis and Tpex/Tex differentiation is unclear, as is the effect of immunotherapeutic blockade on these cells. In this work, we studied the role of CD73 and A2AR in the generation of Tpex and Tex cells *in vitro* and *in vivo*. For the *in vitro* studies, we standardized a previously described protocol to induce CD8⁺ T cell exhaustion by chronic stimulation with peptide, and we evaluated the formation of Tpex and Tex cells by flow cytometry. For the *in vivo* studies, we analyzed CD8⁺ T cell exhaustion in a murine melanoma model.

The kinetics of CD73 expression in CD8⁺ T cells during Tpex differentiation *in vitro* showed an increase in CD73, followed by a further reduction in CD73 as cells acquired the Tex phenotype. When CD73 knockout (KO) mice were used, which do not express CD73, we observed a reduced Tex frequency and a deficit of exhausted cells capable of producing effector cytokines, compared to Tex cells from wild-type (WT) mice. When CD73 was pharmacologically blocked during the generation of exhausted cells *in vitro*, we observed no differences in the formation

of cells with an exhausted phenotype. Furthermore, RNAseq experiments of WT and *in vitro* exhausted CD73 KO cells demonstrated that cells from CD73 KO mice have higher expression of genes associated with the immune response than their WT counterparts, suggesting less exhaustion in cells from CD73 KO mice. On the other hand, we analyzed CD73 expression on exhausted CD8⁺ T cells present in B16.OVA melanoma tumors and confirmed a high frequency of CD73⁺ Tpex cells compared to Tex. Finally, we cotransferred WT and CD73 KO naïve CD8⁺ T cells into mice bearing B16.OVA melanoma tumors and observed a higher frequency of CD73 KO cells with Tpex phenotype in the tumor and draining node relative to their WT counterpart.

Regarding the role of A2AR in exhaustion, we analyzed the expression of this receptor through RNAseq and real-time PCR and found that both WT and CD73 KO cells exhausted *in vitro* express A2AR, but this receptor is less expressed in CD73 KO Tpex than WT. *In vitro* CD8⁺ T cell exhaustion experiments in the presence of A2AR agonists demonstrated a decrease in the expression of activation- and exhaustion-associated molecules, a reduction in the frequency of Tex cells, and an increase in the expression of stemness-associated molecules relative to control. On the other hand, mice bearing a B16.OVA melanoma tumor treated with a specific A2AR antagonist (SYN115) showed an increase in the frequency of Tex and a reduction in the frequency of cells expressing stemness-associated molecules relative to control.

This work provides evidence suggesting different roles for CD73 and adenosine in CD8⁺ T cell exhaustion. While CD73 promotes the progression of differentiation from Tpex to Tex in CD8⁺ T cells, adenosine through its A2AR signaling slows down this process promoting the maintenance of Tpex cells.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer e inmunoterapias

El cáncer constituye una de las principales causas de muerte a nivel mundial, estimándose para el 2020 cerca de 19,3 millones de casos nuevos y casi 10 millones de muertes (Sung et al., 2021). Según los últimos datos entregados por el *Global Cancer Observatory* a la fecha, en Chile se reportaron 59.876 casos nuevos y 31.440 muertes durante el año 2022, siendo el cáncer de próstata, colorrectal y de mama los más frecuentes (GLOBOCAN, 2024). Hasta la fecha, se han desarrollado varios tratamientos para el cáncer dependiendo de su tipo y estado de avance, y estos incluyen: cirugía, quimioterapia, radioterapia y más recientemente la inmunoterapia.

Comparado a los tratamientos actuales, la inmunoterapia busca estimular o restaurar la habilidad del sistema inmune del paciente para combatir el cáncer (Shore, 2015). Estas terapias han traído mejoras significativas en términos de supervivencia y calidad de vida a pacientes con distintos tipos de cáncer (Esfahani et al., 2020). Entre las inmunoterapias actuales se destaca por su efectividad la terapia celular adoptiva, que se basa en el tratamiento del paciente con células inmune propias que han sido extraídas y expandidas *ex vivo*, y que pueden migrar y atacar al tumor (Restifo et al., 2012). Otra inmunoterapia destacada consiste en el bloqueo de puntos de control inmune como PD-1 y TIM3, los cuales inhiben la función de las células inmunes que los expresan (Hashimoto et al., 2018). Pese a la eficacia de ambas terapias, la tasa de respuesta de los pacientes a éstas varía y a menudo solo una parte de ellos responde favorablemente (Sambi et al., 2019). Se ha sugerido que ambas terapias podrían ser limitadas por el efecto inmunosupresor del microambiente tumoral y se han propuesto alternativas como el uso de terapias combinadas

(Khalil et al., 2016) que podrían resultar en tratamientos con mejor alcance y/o eficacia. Considerando el papel fundamental que tienen los linfocitos T CD8+ en la efectividad de las inmunoterapias actuales, se requiere de nuevos estudios que evalúen la influencia del microambiente tumoral sobre estas células para el desarrollo y mejoramiento de estas terapias.

1.2. Los linfocitos T CD8+ citotóxicos

Los linfocitos T CD8+ citotóxicos son células claves en la defensa contra el cáncer. A través de su receptor de célula T (TCR), reconocen células tumorales que en su superficie presentan péptidos antigénicos cargados en moléculas de histocompatibilidad de clase I. Además, median citotoxicidad contra la célula blanco liberando gránulos con perforinas y granzimas (Chávez-Galán et al., 2009), y producen citoquinas proinflamatorias como interferón γ (IFN- γ) o el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Chávez-Galán et al., 2009; Farhood et al., 2019). La actividad antitumoral de los linfocitos T CD8+ surge a partir de la activación y diferenciación de linfocitos T vírgenes mediadas por células presentadoras de antígeno presentes en los órganos linfoides secundarios (Curtsinger & Mescher, 2010; Lanzavecchia & Sallusto, 2001). Con esto, los linfocitos T se activan, proliferan y se diferencian en linfocitos T efectoros (Tef) y de memoria (Tmem) (Samji & Khanna, 2017). Los linfocitos Tef poseen una alta capacidad citotóxica y proliferativa (Zhang & Bevan, 2011), además de un tiempo de vida corto al estar destinados a la apoptosis (Parish & Kaech, 2009). Por otro lado, los linfocitos Tmem tienen una capacidad citotóxica menor que los Tef, pero son capaces de autorenovarse y de originar progenies de múltiples linajes de linfocitos T, incluyendo linfocitos Tef (Gattinoni et al., 2012; Restifo & Gattinoni, 2013). Así, mientras los linfocitos Tef brindan una protección transitoria, los linfocitos Tmem entregan protección de larga duración. Estudios preclínicos han demostrado que los linfocitos Tmem median una respuesta antitumoral superior que linfocitos Tef en modelos de transferencia adoptiva, principalmente a través de su potencial proliferativo y sobrevivencia (Flores-Santibáñez et al., 2015; Gattinoni et al., 2011;

Gattinoni et al., 2009). No obstante, los linfocitos Tmem y Tef a menudo no logran erradicar los tumores, dando cuenta de la necesidad de nuevos estudios sobre la respuesta antitumoral.

1.3. El nicho tumoral alberga linfocitos T CD8+ agotados

La incapacidad del sistema inmune para erradicar tumores resulta en una estimulación antigénica crónica en los linfocitos T que induce un cambio en su proceso de diferenciación y genera linfocitos T CD8+ agotados (Tex) (Hashimoto et al., 2018; Kallies et al., 2020). Los linfocitos Tex expresan en su superficie puntos de control inmune tales como PD-1, LAG-3, TIM3 y TIGIT, que poseen un efecto inhibitorio acumulativo sobre la función de los linfocitos T (Hashimoto et al., 2018). Por tanto, los linfocitos T CD8+ agotados se caracterizan por presentar una reducción en su función efectora, que se traduce en una disminución en la liberación de citoquinas proinflamatorias (Franco et al., 2020; Kallies et al., 2020).

Recientemente se ha descrito que los cambios epigenéticos y fenotípicos que llevan al agotamiento pueden comenzar dentro de las primeras horas de activación del linfocito T CD8+ y que estos se ven estabilizados y/o reforzados con la activación crónica de estas células con el pasar de los días (Rudloff et al., 2023). A nivel molecular, la activación crónica desencadena la diferenciación de las células T CD8+ agotadas a través de la activación del factor de transcripción NFAT río abajo del flujo de calcio inducido por la activación del TCR. A su vez, NFAT regula positivamente la expresión de múltiples reguladores transcripcionales entre los que destaca TOX, el cual ha sido descrito como un factor central en el proceso de agotamiento debido a que activa un programa transcripcional y epigenético en los linfocitos T que restringe su actividad antitumoral (Gebhardt et al., 2023; Khan et al., 2019; Scott et al., 2019). No obstante, lejos de tratarse de una falla del sistema inmune, el agotamiento ha sido descrito esencial para la persistencia de los linfocitos T CD8+ bajo estimulación antigénica crónica (Martinez-Usatorre et al., 2020). Al impedir el agotamiento en linfocitos T específicos contra un tumor a través de la delección

de TOX, los linfocitos no logran persistir en los tumores (Scott et al., 2019). Por otro lado, pese a que los linfocitos Tex tienen un deterioro funcional, actualmente se reconoce que retienen cierto control del crecimiento tumoral y que son activos en los tumores (Li et al., 2019; Miller et al., 2019). En línea con esto, se han descrito distintos subtipos de Tex con distintos grados de agotamiento, existiendo así además de linfocitos Tex con agotamiento severo, linfocitos Tex más funcionales similares a Tef y linfocitos Tex en un estado de agotamiento transitorio o intermedio (Tint) (Gebhardt et al., 2023). Así, el agotamiento puede considerarse más una adaptación fisiológica al cáncer que un deterioro funcional de la respuesta inmune (Kallies et al., 2020).

Se ha propuesto que el agotamiento podría limitar el daño autoinmune en el cáncer. En esa línea, se ha demostrado que al evitar los mecanismos de agotamiento en los linfocitos T CD8+ en contextos de infección crónica en ratón no solo se genera un mejor control viral, sino que además se producen inmunopatologías que pueden resultar en la muerte del animal (Barber et al., 2006; Frebel et al., 2012; Kallies et al., 2020). Asimismo, la inhibición de los puntos de control inmune o receptores inhibitorios en las inmunoterapias antitumorales tiene como efecto secundario frecuente la aparición de patologías mediadas por el sistema inmune (Berner et al., 2019; Hasan Ali et al., 2016; Kallies et al., 2020). Junto con esto, se ha descrito que un perfil transcriptómico asociado al agotamiento de linfocitos T CD8+ predice un mejor pronóstico en múltiples enfermedades autoinmunes en humanos (Kaminski et al., 2021; McKinney et al., 2015). De esta manera, el agotamiento se puede entender como un mecanismo del sistema inmune que permite cierto control de las infecciones crónicas y el cáncer a la vez que limita inmunopatologías y regula o previene autoinmunidad.

1.4. Los linfocitos T CD8+ precursores agotados mantienen las poblaciones agotadas en el nicho tumoral

Estudios recientes han demostrado la existencia de una nueva subpoblación de linfocitos T agotados que además poseen características de células troncales y células de memoria (Jansen et al., 2019; Kallies et al., 2020; Miller et al., 2019; Siddiqui et al., 2019). Estos poseen la capacidad de persistir en el tiempo autorrenovándose y de originar linfocitos Tex (Jansen et al., 2019; Kallies et al., 2020). Además, se ha descrito que son diferentes fenotípica, epigenética y funcionalmente de los linfocitos Tex (Franco et al., 2020; Jansen et al., 2019; Miller et al., 2019). Estas células se conocen como linfocitos T precursores agotados (Tpex) y se caracterizan por expresar niveles intermedios de PD-1 (Gabriel et al., 2021; Guan et al., 2023; Kallies et al., 2020; Zhou et al., 2010) y por expresar el factor de transcripción TCF1 (*T cell factor 1*), fundamental en el programa transcripcional que regula la diferenciación y longevidad de los linfocitos Tmem. Además, expresan el receptor asociado a troncalidad LY108 y el receptor inhibitorio LAG-3, mientras que carecen de la expresión de TIM3 y de la ectoenzima asociada al agotamiento terminal CD39 (Franco et al., 2020; Gebhardt et al., 2023; Gupta et al., 2015; Jansen et al., 2019; Kallies et al., 2020; Martinez-Usatorre et al., 2020; Siddiqui et al., 2019).

Recientemente se ha reportado evidencia sobre el potencial terapéutico de los linfocitos Tpex. Por un lado, varios trabajos han demostrado que mayores frecuencias de estas células en tumores correlacionan con mejores resultados clínicos (Brummelman et al., 2018; Kallies et al., 2020; Miller et al., 2019; Sade-Feldman et al., 2018; Siddiqui et al., 2019). Por otro lado, se ha descrito que los linfocitos Tpex (y no así los linfocitos Tex) responden a la inmunoterapia anti PD-1, proliferando y aumentando el número de linfocitos Tex en el tumor (Kallies et al., 2020; Miller et al., 2019; Siddiqui et al., 2019). De esta manera, los linfocitos Tpex se han considerado como la principal población que responde a terapias contra puntos de control inmune (Miller et al., 2019). En línea con esto, estudios

en pacientes con melanoma reportaron que la duración y eficacia de las terapias que bloquean puntos de control inmune se correlacionan con la frecuencia de células TCF1+ dentro del tumor (Kallies et al., 2020; Miller et al., 2019; Sadel-Feldman et al., 2018). Así estudios de los factores que llevan a la adquisición del fenotipo T_{pex} serán de utilidad en el desarrollo de inmunoterapias.

Recientemente, Zhao y colaboradores publicaron una metodología para generar células T CD8+ agotadas *in vitro*, basada en la activación crónica con péptido de linfocitos OT-I (células T CD8+ con un receptor de célula T transgénico con el que reconocen de forma específica el péptido inmunodominante de la proteína OVA) en presencia de IL-7 e IL-15 (Zhao et al., 2020). En esta publicación demostraron la generación tanto de células T_{pex} como T_{ex} basándose en la expresión diferencial de TCF1 y TOX, sin ahondar en las características fenotípicas y funcionales que diferencian a estas poblaciones. La verificación de la presencia de poblaciones T_{pex} y T_{ex} facilitará el estudio de moléculas de interés en el proceso de diferenciación facilitando nuevos enfoques farmacológicos o genéticos.

1.5. La exposición a adenosina en el microambiente tumoral

La adenosina extracelular constituye una señal inmunosupresora que es producida y acumulada en el microambiente tumoral. Esta es generada principalmente por la acción conjunta de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 a partir de ATP. Mientras CD39 cataliza la conversión de ATP a AMP, CD73, una enzima dimérica anclada a través de glicosilfosfatidilinositol en la membrana celular, cataliza la conversión de AMP en adenosina (Bono et al., 2015; Mastelic-Gavillet et al., 2019). Ambas enzimas se expresan en distintos niveles y en varios tejidos en condiciones normales (Thompson et al., 2004), y aumentan su expresión en varios tipos de tumores (Bastid et al., 2013; Beavis et al., 2012). Además de las células tumorales, ambas enzimas se expresan en distintas poblaciones de células inmunes, incluyendo subpoblaciones de linfocitos T (Bono et al., 2015).

Por otro lado, la adenosina extracelular media la mayoría de sus funciones inmunosupresoras a través del receptor A2A (A2AR), que es expresado en linfocitos T CD8+ (Vijayan et al., 2017). La señalización de adenosina mediante A2AR resulta en la supresión de la señalización del TCR en linfocitos T (Mastelic-Gavillet et al., 2019), que a su vez se asocia con una reducción en la producción de citoquinas, citotoxicidad y proliferación de las células T (Mastelic-Gavillet et al., 2019; Sorrentino et al., 2019). Adicionalmente, se ha demostrado que el bloqueo de A2AR reduce la expresión de puntos de control inmune tales como PD-1 en Tef (Leone et al., 2018) y que la activación de A2AR permite la expansión de células T carentes de función efectora en microambientes ricos en adenosina (Ohta et al., 2009). Así, se ha descrito a la adenosina como una molécula implicada en el escape del tumor del sistema inmune (Boison & Yegutkin, 2019; Ohta et al., 2006), lo que representa un obstáculo para las inmunoterapias actuales. Esto ha llevado al desarrollo de terapias dirigidas al bloqueo de la función de A2AR y CD73 (Boison & Yegutkin, 2019; Willingham et al., 2020).

La señalización de la adenosina por medio de A2AR podría promover el establecimiento de linfocitos T_{pex} en el tumor. Además de reducir el potencial citotóxico de los linfocitos T CD8+ y promover la expresión de PD-1 en éstos, existe evidencia que sugiere que la adenosina podría promover características asociadas a la troncalidad (Cekic & Linden, 2014; Cekic et al., 2013; Flores-Santibáñez et al., 2015). Estudios en ratones que presentan eliminación de la expresión de A2AR (A2AR KO), ya sea global o específica en células T han demostrado que la señalización de A2AR es necesaria para mantener el número normal de células T CD8+ vírgenes periféricas (Cekic et al., 2013). En un trabajo posterior, con aproximaciones similares, pero durante un desafío tumoral, demostraron que en relación con la condición control, existe una disminución en el número de células T asociadas al tumor, junto con una reducción en la diferenciación hacia Tef o T_{mem} en los linfocitos T A2AR KO. De esta manera los autores plantearon que la señalización de A2AR es requerida en algún grado para

la mantención y diferenciación efectora de células T asociadas al tumor (Cekic & Linden, 2014). Por otro lado, nosotros hemos demostrado que un subtipo de linfocitos T CD8+ generados *in vitro* con características de linfocito Tmem, sufre un aumento en su potencial citotóxico y una reducción en la expresión de TCF1 a nivel de transcrito cuando son generados en presencia de un antagonista específico de A2AR (SCH58621) (Flores-Santibáñez et al., 2015). De esta manera, la señalización de la adenosina podría restringir la función efectora de los linfocitos T CD8+ al mismo tiempo que promueve la mantención y expresión de PD-1 y TCF-1, resultando en un fenotipo parecido al de linfocitos T_{pex}. Estudios recientes han demostrado además la expresión de A2AR en linfocitos T CD8+ intratumorales con fenotipos agotados (Todd et al., 2023; Wang et al., 2019; Zhang et al., 2022) y en particular, se ha detectado una ligera pero significativa mayor expresión de A2AR en linfocitos T_{pex} que en T_{ex} (Todd et al., 2023), reforzando aún más la idea de que podría tener algún papel en el establecimiento de linfocitos T_{pex}.

La expresión de CD73 podría tener un rol en el establecimiento de linfocitos T_{pex} en el tumor independiente a su actividad catalítica. Un estudio reciente demostró que en contexto de infección crónica CD73 es expresado principalmente en T_{pex} y no así en T_{ex} (Gabriel et al., 2021) y se ha empezado a usar para distinguir estas dos poblaciones (Gebhardt et al., 2023; J. Lee et al., 2023). Interesantemente, además de la producción de adenosina, se reconoce que CD73 posee actividad coestimuladora en los linfocitos T (Resta & Thompson, 1997; Resta et al., 1998). En línea con esto, se ha demostrado que los linfocitos T que expresan CD73 son capaces de activarse y proliferar a concentraciones bajas de forbol-12-miristato 13-acetato (PMA) que por sí solas no alcanzan a inducir la proliferación en células T que carecen de CD73 (Thompson & Ruedi, 1989). Además, en un trabajo posterior, se demostró que los linfocitos T tienen una proliferación vigorosa cuando se exponen simultáneamente a un anticuerpo contra CD73 y uno contra CD3, inmovilizados en plástico, mientras que cuando

se exponen solo al anticuerpo contra CD3, la proliferación es modesta (Massaia et al., 1990). En este trabajo además compararon el efecto del anticuerpo contra CD73 en la activación de las células T con el efecto de un anticuerpo contra CD28, una de las moléculas coestimuladoras mejor caracterizadas, y el estímulo de CD73 en las células T proveyó una actividad coestimuladora mayor que la entregada por el estímulo de CD28 con los anticuerpos usados (Massaia et al., 1990). Así, es posible que CD73 se requiera en estadios más tempranos del agotamiento en linfocitos T CD8+ para promover el avance hacia estadios más tardíos de diferenciación, y con esto hacia el agotamiento. Siguiendo esta línea, datos de nuestro laboratorio también sugieren que CD73 restringe el programa efector de linfocitos T CD8+ (Briceño et al., 2021). En este reporte, se demostró que linfocitos T vírgenes CD73 KO diferenciados *in vitro* a Tef, expresan mayores niveles del factor de transcripción T-bet, clave en la adquisición de un fenotipo efector, y mayores niveles de citoquinas proinflamatorias que su contraparte WT. Además, linfocitos OT-I CD73 KO transferidos a ratones con tumores B16.OVA, son más efectivos en reducir el crecimiento tumoral y presentan baja expresión de marcadores de agotamiento en relación con su contraparte WT. Por otra parte, se demostró que CD73 disminuye la sobrevivencia de los linfocitos T CD8+ bajo estimulación antigénica (Roseblatt et al., 2021), lo que podría provocarse debido a un avance en la diferenciación hacia estados terminales de menor sobrevivencia. Finalmente, se ha demostrado que el bloqueo específico de CD73 con un anticuerpo monoclonal en un modelo de ratón transgénico inmunocompetente con un tipo de carcinoma revirtió significativamente el fenotipo agotado en linfocitos T CD8+ (Deng et al., 2018). Así, mientras existe evidencia que apunta que la adenosina podría promover el estadio de diferenciación T_{pex}, los estudios sobre CD73 sugieren participación de esta ectoenzima en el avance de la diferenciación de los linfocitos T CD8+ hacia células agotadas, quizás gracias a su actividad coestimuladora. No obstante, hacen falta nuevos estudios para confirmar esta hipótesis.

Actualmente se están probando estrategias inmunoterapéuticas contra el cáncer que incluyen el bloqueo de A2AR y CD73 (Allard et al., 2013; Beavis et al., 2015; Deng et al., 2018; Myojin, 2023). Interesantemente, estudios recientes han mostrado que tanto el bloqueo de CD73 como el bloqueo de la señalización de adenosina a través de A2AR sinergizan las inmunoterapias anti PD-1 y/o anti PD-L1 en modelo murino (Allard et al., 2013; Beavis et al., 2015; Myojin, 2023). Dado que estas terapias son de índole sistémicas, resulta interesante poder estudiar el efecto de ellas en las poblaciones de linfocitos T CD8+ agotados y los mecanismos celulares que podrían llevar al efecto sinérgico entre el bloqueo del eje CD73/A2AR y las inmunoterapias. Así, se propone estudiar el efecto que tiene el bloqueo terapéutico del receptor A2AR sobre el estado de agotamiento de los linfocitos T CD8+ intratumorales en modelo murino de melanoma. Por otro lado, la idea de que A2AR o CD73 puedan tener relevancia en la diferenciación de linfocitos T_{pex} y T_{ex}, y/o en su asentamiento en el nicho tumoral se encuentra poco explorada en la literatura. Este estudio propone investigar el papel de A2AR y CD73, así como el efecto de su bloqueo terapéutico, en la diferenciación y establecimiento de linfocitos T_{pex} y T_{ex} en el nicho tumoral.

HIPÓTESIS CIENTÍFICA

CD73 y el producto de su actividad catalítica, adenosina, ejercen diferentes funciones durante el agotamiento de las células T CD8+. Mientras CD73 promueve la diferenciación de linfocitos T CD8+ precursores agotados hacia células T agotadas más diferenciadas, la adenosina retarda este proceso a través de su señalización por A2AR.

HIPÓTESIS TECNOLÓGICA

El bloqueo de la señalización de adenosina mediante el receptor A2A (A2AR) promueve la diferenciación de linfocitos T precursores agotados hacia linfocitos T CD8+ más diferenciados y funcionales potenciando la eficacia de inmunoterapias contra el cáncer.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el rol de CD73 y de la señalización de adenosina a través de A2AR en la diferenciación de linfocitos T CD8+ agotados y precursores agotados en el nicho tumoral.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar el papel de CD73 y de la señalización de adenosina por medio de A2AR en la diferenciación y fenotipo de los linfocitos T CD8+ agotados y precursores agotados *in vitro*.
2. Analizar el papel de CD73 y de la señalización de adenosina por medio de A2AR en la diferenciación de linfocitos T CD8+ agotados y precursores agotados en el nicho tumoral.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Animales: Se trabajó con las cepas de ratón C57BL/6 (CD45.2+), B6SJL-Ptprc^a Pepc^b/BoyJ (CD45.1+), B6.129S1-Nt5e^{tm1Lft}/J (CD73 KO, CD45.2+) y C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb/J (OT-I, CD45.2+), todos comprados en Laboratorios Jackson. Además, generamos en el laboratorio ratones OT-I CD45.1+CD45.2+ (doble positivos para los marcadores congénicos CD45.1 y CD45.2) generados a partir del cruzamiento de ratones OT-I y CD45.1+. Por otra parte, generamos ratones OT-I CD73KO (CD45.2+) mediante una primera cruce entre ratones OT-I y CD73KO que generaron una progenie de ratones OT-I CD73KO heterocigotos, los cuales se cruzaron con ratones CD73 KO para obtener animales OT-I CD73 KO homocigotos. Por otro lado, los ratones OT-I CD45.1+ CD45.2+ se generaron a partir del cruzamiento de ratones OT-I y CD45.1+. El fenotipo de las cepas utilizadas se verificó previo al inicio de cada experimento a través del análisis de muestras de sangre obtenidas desde la arteria de la cola o desde la mejilla de los animales y su posterior análisis a través de citometría de flujo. Todos los ratones se mantuvieron en el bioterio de la Fundación Ciencia & Vida a una temperatura de 26 a 28°C, con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas y con agua y alimento *ad libitum*. Todos los experimentos se realizaron con ratones machos con la excepción del experimento *in vivo* indicado en el objetivo 2.1 de la sección de resultados, en donde se usaron ratones hembra. La mayoría de los experimentos se realizaron con animales de entre 6 y 17 semanas de edad. La eutanasia se realizó a través de inhalación gradual de CO₂ y posterior dislocación cervical como método secundario para asegurar la muerte del animal. Todos los experimentos se realizaron siguiendo las normas exigidas por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) y bajo el cuidado del comité de bioética de la Fundación Ciencia & Vida.

2.2. Línea celular: En este trabajo se utilizaron células de la línea B16.OVA, proporcionadas por Dr. Randolph Noelle (Dartmouth Medical School, Hanover, NH). Esta corresponde a una línea de melanoma murino que expresa constitutivamente ovoalbúmina (OVA). Las células fueron cultivadas en frascos T-75 con medio RPMI que contiene penicilina/estreptomicina 1% v/v (penicilina 100 unidades/mL y estreptomicina 100 µg/mL, L-glutamina 2 mM suplementado con 10% de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich) y β-mercaptoetanol 55 µM (Gibco). Las células se mantuvieron en un incubador a 37 °C y 5% de CO₂.

2.3. Preparación de suspensiones celulares: En este trabajo se procesó bazo, órganos linfoides inguinales y tumores para obtener suspensiones celulares que se utilizaron para los diferentes protocolos.

Para el procesamiento del bazo, luego de su extracción quirúrgica este fue recibido en una placa Petri con 10 mL de RPMI + 10 % FBS. A continuación, el bazo se perfundió y la suspensión celular se recolectó en un tubo Falcon de 15 mL. Las células se centrifugaron a 600 x g durante 7 min y 4 °C. Luego se lisaron los glóbulos rojos en 2 mL de tampón para lisis (RBC Lisis buffer, ref: 420302, Biolegend) durante 5 min en hielo. Pasado este lapso, se agregaron 8 mL de RPMI suplementado + 10% FBS y se centrifugaron a 600 x g durante 7 min y 4 °C. Finalmente se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 5 o 10 mL de RPMI + 10 % FBS.

Para el procesamiento de los nódulos linfáticos inguinales, luego de extraerlos quirúrgicamente fueron depositados individualmente en tubos Eppendorf de 1,6 mL con 1 mL de RPMI + 10% FBS donde los nódulos fueron disgregados mecánicamente. La suspensión celular se filtró en un *cell strainer* de 70 µm sobre un tubo Falcon de 15 mL.

Para el procesamiento del tumor, primero se retiró el exceso de piel, se masó, y se depositó en una placa de Petri conteniendo 1 mL de HBSS 1X (ref: 14185-052, Gibco) + 5% FBS, DNasa I (50 µg/ mL, ref: 11284932001, Roche) y colagenasa D (1 mg/ mL, ref: 11088858001, Roche). A continuación, el tumor se disgregó con tijeras quirúrgicas y el contenido de la placa se traspasó a un tubo

C (gentleMACS), se agregaron 4 mL más de la mezcla de tampón y enzimas mencionada más arriba y se instaló el tubo C en el disociador gentleMACS y el tumor se disoció con el programa M_impTumor_02_02. Posteriormente el tubo C fue retirado y se incubó por 40 min a 37°C con rotación suave. Pasado el tiempo indicado el tubo C se volvió a instalar en el disociador gentleMACS y se activó el programa M_impTumor_03_02. Terminado de ejecutarse el programa, se retiró el tubo C del gentleMACS y la suspensión celular resultante se filtró a través de un *cell strainer* de 70 μm . Luego, la suspensión celular se centrifugó a 600 x g por 7 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y las células se incubaron con 2 mL de RBC por 5 min en hielo. A continuación, se agregaron 5 mL de HBSS + 5% FBS y las células se centrifugaron a 600 x g por 7 min a 4°C. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 5 mL de HBSS + 5% FBS.

Al final del procesamiento de cada tejido, las células se contaron en cámara de Neubauer descartando las células muertas utilizando azul de tripán en el caso del bazo, o por citometría de flujo en el Cytex AURORA que mide directamente el volumen de la muestra analizada, donde las células muertas se descartaron por marcaje con un colorante vital fluorescente.

2.4. Separación inmunomagnética de linfocitos T CD8+: Para aislar los linfocitos T CD8+ totales se utilizó el Kit de separación inmunomagnética **MojoSort Mouse CD8 T Cell Isolation Kit** (ref: 480035, Biolegend). Para esto, la suspensión celular obtenida de bazo se centrifugó a 600 x g durante 7 min y 4 °C, y las células se resuspendieron en una solución de verseno + 2% FBS a una concentración de 10^8 células por mL. A continuación, las células se incubaron por 15 min en hielo con 15 μL del cóctel de anticuerpos acoplados a biotina. Luego las células fueron incubadas por 15 min en hielo con 15 μL de perlas magnéticas conjugadas con estreptavidina. Al finalizar la incubación, se agregó 2,5 mL de verseno + 2 % FBS a las células y se traspasaron a un tubo Falcon de 5 mL. A continuación, la suspensión celular se incubó por 5 min en un separador magnético a temperatura ambiente para después recuperar la fracción negativa

que contiene a los linfocitos T CD8+. La fracción de células acopladas al imán se resuspendió con 3 mL de verseno + 2 % FBS para recuperar linfocitos T CD8+ restantes. El total de células recuperadas se llevaron a 10 mL con verseno + 2 % FBS y se centrifugaron a 600 x g, durante 5 min y a 4°C. Finalmente, las células se resuspendieron en medio RPMI + 10 % FBS y se contaron. La eficiencia de la purificación se evaluó por citometría de flujo.

Para aislar linfocitos T CD8+ vírgenes desde bazo se utilizó el kit de separación **inmunomagnética EasySep Mouse Naïve CD8+ T Cell Isolation Kit** (ref: 19858, STEMCELL Technologies). Para esto la suspensión celular obtenida desde bazo se centrifugó a 600 x g durante 7 min y 4 °C, y las células se resuspendieron a una concentración de 10⁸ células por mL en verseno + 2% FBS. A continuación, se agregaron 10 µL de EasySep Mouse FcR Blocker por cada 1 mL de muestra. Luego la muestra se traspasó a un tubo Falcon de 5mL y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente con 50 µL de EasySep Mouse Naïve CD8+ T cell Isolation Cocktail por cada 1 mL de muestra. A continuación, se agregaron 100 µL de EasySep Streptavidin RapidSpheres (previamente resuspendidas con vórtex por 30 segundos) por cada 1 mL de muestra y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Luego la muestra se llevó a 2,5 mL agregando verseno + 2% FBS y se incubó a temperatura ambiente por 2 min y 30 seg en un separador magnético para después recuperar la fracción negativa que contiene a los linfocitos T CD8+ vírgenes. Finalmente, las células se resuspendieron en medio RPMI + 10 % FBS y se contaron en cámara de Neubauer descartando las células muertas utilizando azul de tripán. La eficiencia de la purificación se determinó por citometría de flujo.

2.5. Protocolo de agotamiento celular *in vitro*: En este trabajo se adaptó un protocolo de agotamiento *in vitro* previamente publicado (Zhao et al., 2020). Para esto, linfocitos T CD8+ totales o vírgenes aislados desde bazo de un ratón OT-I se cultivaron en placas de 24 pocillos a una concentración de 5 x 10⁵ células por 1 mL de medio de agotamiento. El medio de agotamiento consistió en RPMI + 10% FBS, Hepes 10 mM (ref: 15630-080, Gibco), piruvato de sodio 1 mM (ref:

11360-070, Gibco), 1% v/v de aminoácidos no esenciales (ref: 11140-050, Gibco), 55 μ M de β -mercaptoetanol, IL-7 a 5 ng/mL ref: 577804, Biolegend) e IL-15 a 5 ng/mL (ref: 566302, Biolegend). Todos los días durante 5 días se agregó 10 ng de péptido SIINFEKL (péptido OT-I, GenScript), simulando una activación crónica. Luego de 48 horas de incubación, los linfocitos T CD8+ se traspasaron a un tubo Falcon y se contaron a través de citometría de flujo. Posteriormente, las células se lavaron agregando de 5 a 10 mL de RPMI + 10% FBS y centrifugando a 600 x g por 7 min y 4°C. A continuación, se retiró el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en medio de agotamiento a 5×10^5 por mL de medio para ser trasladadas nuevamente a una placa de 24 pocillos, con 1 mL de células en medio por pozo. Cuando se observó una alta confluencia de células en un pozo, se agregó 1 mL de medio con péptido y se dividió en 2 pozos (usualmente el día 4 de iniciado el experimento). Finalmente, al día 5 de iniciado el experimento, las células se traspasaron a un Falcon y se contaron a través de citometría de flujo, para su posterior uso. Como control de activación sin generar agotamiento, se realizó en paralelo la activación con péptido de los linfocitos OT-I agregando solo el primer día 10 ng de péptido SIINFEKL y retirándolo a las 48h con el lavado descrito anteriormente. Posterior al lavado las células se mantuvieron en medio de agotamiento hasta el día del análisis.

En algunos casos el agotamiento *in vitro* se prolongó hasta el día 7 desde el inicio del cultivo. Para esto, el día 5 además de contar, las células se lavaron como se describió anteriormente para posteriormente volverlas a incubar en medio de agotamiento por 2 días más, agregando 10 ng de péptido OT-I los días 5 y 6, para finalmente contar a través de citometría de flujo para su posterior uso.

2.6. Fármacos utilizados en los experimentos de agotamiento: En algunas ocasiones se incluyó en medio de agotamiento los fármacos que se encuentran en la Tabla 1. Como control de vehículo se utilizó DMSO o agua (0,1% v/v).

Tabla 1. Lista de fármacos utilizados en los experimentos de agotamiento.

Fármaco	Descripción	Disolvente	Concentraciones utilizadas	Número de producto	Marca
SCH58261	Antagonista específico de A2AR	DMSO	0,1 y 1 μ M	54568	Sigma-Aldrich
NECA	Análogo no hidrolizable de adenosina	DMSO	1 y 10 μ M	E2387	Sigma-Aldrich
CGS-21689	Agonista específico de A2AR	DMSO	1 y 10 μ M	C141	Sigma-Aldrich
APCP	Inhibidor competitivo de la actividad enzimática de CD73	Agua	50 μ M	M3763	Sigma-Aldrich

2.7. Citometría de flujo: El detalle de los anticuerpos utilizados para la tinción de las células se encuentra en la Tabla 2. La unión no específica de los anticuerpos se bloqueó añadiendo a la mezcla de anticuerpos específicos, el anticuerpo contra CD16/CD32 (FcBlock, Biolegend). Para eliminar del análisis las células muertas se usó *Viability dye 780* (eBioscience/Invitrogen) que se agregó a la mezcla de anticuerpos de superficie a una concentración previamente determinada. La tinción de las células se llevó a cabo en un número determinado de células según el protocolo experimental en curso, las cuales se incubaron con la mezcla de anticuerpos de superficie por 20 min a 4°C y oscuridad. Posteriormente las células se lavaron con PBS + 2% FBS y se resuspendieron en 300 μ L de PBS + 2% FBS. En algunos experimentos las células fueron teñidas con anticuerpos intracelulares para lo cual luego de realizar la tinción superficial y lavar las células, éstas fueron permeabilizadas y fijadas usando un kit comercial para el factor de transcripción FOXP3 (eBioscience) según el protocolo sugerido por el fabricante. La fijación/permeabilización se realizó por 2 h o toda la noche a 4°C y oscuridad para los fines de nuestros experimentos. Posteriormente se realizó un lavado agregando 700 μ L del tampón de permeabilización y las células se centrifugaron a 700 x g durante 8 min a 4°C. Luego se retiró el sobrenadante y las células se incubaron durante toda la noche a 4°C y oscuridad con 100 μ L de la mezcla de anticuerpos intracelulares en tampón de permeabilización. Finalmente, las células se lavaron en tampón de permeabilización centrifugando a 700 x g durante 8 min a 4°C y las células se resuspendieron en 300 μ L de PBS + 2% FBS para su posterior análisis en el citómetro de flujo. Para todas las

muestras con excepción de los tumores se decidió marcar un número igual o cercano a 2 millones de células vivas. En el caso de los tumores usualmente se marcaron más de 2 millones de células, por lo que en cada tinción se utilizó el doble de cada anticuerpo. Además, por cada 10 millones de células se agregaron 100 μ L de la mezcla de anticuerpos 2x. Para la adquisición de muestras se utilizó el citómetro de flujo FACSCanto II (con 2 láseres), el *cell sorter* FACSAria III (con 3 láseres) y el citómetro espectral Cytex AURORA (con 5 láseres).

El recuento celular a través de citometría de flujo se realizó con 2 métodos diferentes. Inicialmente utilizamos perlas de concentración conocida que se agregaron a las muestras para ser usadas como referencia interna. Luego de la adquisición del citómetro Cytex AURORA, determinamos los valores absolutos de cualquier población de una muestra gracias a la información del volumen de muestra adquirido y el número de eventos presente en ese volumen. El número total de células se calcula con la siguiente formula:

$$\text{Número total de células} = \frac{\text{Número de células adquiridas} \times \text{volumen total de la muestra}}{\text{volumen adquirido por el citómetro}}$$

Para el análisis de la citometría de flujo de este trabajo se utilizó el *software* FlowJo versión 10.4 para Mac OS X. Para los análisis a través de t-SNE se utilizó los softwares R (versión 4.2.2) y RStudio (versión 2022.12.0+353) utilizando un *script* de R como base con los comandos necesarios para realizar el t-SNE y la clusterización a través de DBSCAN provisto por el Dr. Felipe Flores-Santibáñez y que fue adaptado para este trabajo.

Tabla 2. Lista de anticuerpos utilizados para citometría de flujo

Anticuerpo	Fluoróforo	Clon	Catálogo	Marca	Tipo de tinción
2B4	PE-Cy7	m2B4 (B6)458.1	133511	Biolegend	Superficial
A2AR	APC	7F6-G5-A2	NBP1-39474APC	Novus Biologicals	Intracelular
CD25	PE	PC61.5	12-0251-82	eBioscience	Superficial
CD25	PerCP-Cy5.5	PC61	102030	Biolegend	Superficial
CD3	APC	17A2	100236	Biolegend	Superficial
CD3	BV711	17A2	100241	Biolegend	Superficial
CD3	FITC	17A2	100204	Biolegend	Superficial
CD39	BV421	Y23-1185	567105	BD bioscience	Superficial
CD39	PE/Dazzle594	Duha59	143812	Biolegend	Superficial
CD44	APC	IM7	103012	Biolegend	Superficial
CD44	PerCP-Cy5.5	IM7	103031	Biolegend	Superficial
CD45	PE/Dazzle594	30-F11	103145	Biolegend	Superficial
CD45.1	Alexa Fluor 700	A20	110723	Biolegend	Superficial
CD45.1	PE-Cy7	A20	110729	Biolegend	Superficial
CD45.1	PerCP-Cy5.5	A20	110730	Biolegend	Superficial
CD45.2	APC	104	109814	Biolegend	Superficial
CD45.2	BV510	104	109838	Biolegend	Superficial
CD45.2	PerCP-Cy5.5	104	109828	Biolegend	Superficial
CD62L	BV570	MEL-14	104433	Biolegend	Superficial
CD62L	BV785	MEL-14	104440	Biolegend	Superficial
CD62L	PE	MEL-14	12-0621-83	eBioscience	Superficial
CD62L	Pe-Cy7	MEL-14	104418	Biolegend	Superficial
CD62L	FITC	MEL-14	11-0621	eBioscience	Superficial
CD69	BV421	H1.2F3	104545	Biolegend	Superficial
CD69	PE	H1.2F3	104508	Biolegend	Superficial
CD73	APC	TY/11.8	127210	Biolegend	Superficial
CD73	PE-Cy7	TY/11.8	127224	Biolegend	Superficial
CD8 α	APC	53-6.7	100712	Biolegend	Superficial
CD8 α	BV650	53-6.7	100742	Biolegend	Superficial
CD8 α	PE-Cy7	53-6.7	100722	Biolegend	Superficial
IFN γ	APC	XMG1.2	505810	Biolegend	Intracelular
IFN γ	FITC	XMG1.2	11-7311-82	eBioscience	Intracelular
IL-2	PE-Cy7	JES6-5H4	503832	Biolegend	Intracelular
KLRG1	APC	2F1/KLRG1	138412	Biolegend	Superficial
KLRG1	PE/FIRE640	2F1/KLRG1	138439	Biolegend	Superficial
KLRG1	BV605	2F1/KLRG1	138419	Biolegend	Superficial
LAG-3	PE-Cy7	C9B7W	125225	Biolegend	Superficial
LAG-3	PerCP-Cy5.5	C9B7W	125212	Biolegend	Superficial
LY108	APC	330-AJ	134609	Biolegend	Superficial
LY108	Pacific Blue	330-AJ	134608	Biolegend	Superficial
PD-1	BV605	29F.1A12	135220	Biolegend	Superficial
PD-1	PerCP-Cy5.5	RMP1-30	109120	Biolegend	Superficial
TCF1	Alexa Fluor 488	C63D9	6444S	Cell Signaling	Intracelular
TIGIT	BV421	VSIG9	142111	Biolegend	Superficial
TIM-3	BV785	RMT3-23	119725	Biolegend	Superficial
TIM-3	PE-Cy7	RMT3-23	119715	Biolegend	Superficial
TNF α	BV421	MP6-XT22	506328	Biolegend	Intracelular
TNF α	FITC	MP6-XT22	506304	Biolegend	Intracelular
TOX	APC	REA473	130-118-335	Miltenyi Biotec	Intracelular
TOX	PE	REA473	130-120-716	Miltenyi Biotec	Intracelular
V α 2	PE	B20.1	127808	Biolegend	Superficial
V α 2	PE	B20.1	12-5812-82	eBioscience	Superficial
V β 5.1, 5.2	FITC	MR9-4	11-5796-82	eBioscience	Superficial
V β 5.1, 5.2	FITC	MR9-4	139514	Biolegend	Superficial

2.8. Tinción con *CellTrace Violet*: Los linfocitos T CD8⁺ aislados desde bazo fueron lavados y resuspendidos en una solución 5 μ M de *CellTrace Violet* (ref: C34557, Invitrogen) en PBS (mantenido a temperatura ambiente), a 10⁷ células/mL. Las células se incubaron por 20 min a 37°C con agitación y en oscuridad. La reacción se detuvo agregando 5 a 10 mL de RPMI + 10% FBS e incubando por 5 min. Finalmente, las células fueron lavadas centrifugando a 600 x g por 7 min y 4 °C.

2.9. Evaluación de la producción de citoquinas en los experimentos de agotamiento: Al término del cultivo de agotamiento las células T CD8⁺ fueron reestimuladas agregando al cultivo 10 μ g de péptido OT-I y 1 μ L de Golgi Plug (ref: 555029, BD Biosciences) por cada 1 mL de medio con células y se incubó por 6 horas a 37°C y 5% CO₂. Como control sin activación se incubaron células T CD8⁺ agotadas *in vitro* sin agregar nuevamente el péptido OT-I. Posteriormente las células fueron lavadas con 5 mL de PBS + 2% FBS a 600 x g por 7 min a 4°C para posteriormente realizar la tinción del precipitado de células para citometría de flujo. La capacidad de producción de citoquinas se midió a través de un marcaje intracelular realizado como se indica en la sección 2.7 de Materiales y Métodos.

2.10. *Cell sorting*: Los cultivos para generar agotamiento en linfocitos T CD8⁺ OT-I constan de un bajo porcentaje de células vivas (21,33% en el caso de los linfocitos WT, ver Fig. 1C). Así para la obtención de ARN de linfocitos OT-I WT y CD73 KO agotados y el posterior RNA-seq, se utilizó previamente el *cell sorter* FACS Aria III para limpiar de las muestras las células muertas. Para esto, las células de los cultivos fueron resuspendidas a 10 millones de células por mL en medio RPMI + 10% FBS. A continuación, se agregó 1 μ L de una solución de yoduro de propidio filtrado 50 μ g/mL (BD Pharmingen, ref: 51_66211E) y se seleccionó la población de linfocitos T CD8⁺ vivos (negativos para yoduro de propidio). Las células aisladas fueron recuperadas en un tubo Falcon de 15 mL conteniendo 500 μ L de FBS filtrado.

En este trabajo además se utilizó *cell sorting* para purificar linfocitos OT-I vírgenes WT y CD73 KO y posteriormente cotransferirlos a ratones con tumor B16.OVA, como se presenta en el objetivo 2.2 en la sección de resultados. Para esto primero se enriquecieron muestras de bazo en linfocitos T CD8+ WT y CD73 KO aislándolos a través de separación inmunomagnética, como se indica en la sección 2.4 de Materiales y Métodos. Luego, para el *cell sorting*, los linfocitos T CD8+ aislados fueron marcados con una mezcla de anticuerpos en PBS + 2% FBS conteniendo FcBlock, α CD8-BV650, α CD3-BV711, α CD44-APC o α CD44-PerCP-Cy5.5 y α CD62L-BV785 o α CD62L-BV570. Las células se incubaron por 20 min, 4°C y oscuridad con la mezcla de anticuerpos y se centrifugaron a 600 x g, 7 min y 4°C. Luego se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio RPMI suplementado + 10% FBS a una concentración de 10 millones de células por mL de medio. Finalmente, se aislaron los linfocitos T CD8+ vírgenes CD44bajo o negativo CD62L+, los cuales fueron recibidos en un Falcon de 15 mL conteniendo 500 μ L de FBS filtrado.

2.11. Extracción de ARN: La extracción de ARN se realizó con el **kit de extracción E.Z.N.A Total RNA Kit** (ref: R6834-02CH, Omega Bio-tek), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN resultante se cuantificó en Qubit (Invitrogen) o Nanodrop. La integridad del ARN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

2.12. RNAseq: El RNAseq fue realizado en la Unidad de Genómica y Bioinformática de la Universidad de Santiago de Chile, quienes se encargaron de hacer las librerías y secuenciación con la plataforma de Illumina Nextseq500. Para esto enviamos ARN de 3 muestras independientes de linfocitos (totales) OT-I WT y 3 muestras independientes de linfocitos OT-I CD73 KO agotados. El análisis del RNAseq fue realizado por el Dr. Camilo Villaman y el Dr. Alberto Martin del Laboratorio de Biología de Redes de la Fundación Ciencia & Vida. Brevemente, se usó el *pipeline* "rnaseq" del grupo "nf-core" el que a partir de los archivos FASTQ realiza controles de calidad, acorta las lecturas del secuenciador removiendo regiones de baja calidad, alinea contra un genoma de referencia

utilizando la herramienta STAR (*Spliced Transcripts Alignment Reference*) y cuantifica con la herramienta Salmon. Esto generó tablas de conteos preliminares de cada muestra. Con estos datos posteriormente se hizo un análisis de reducción de dimensionalidad y un gráfico de componentes principales (PCA, *Principal Components Analysis*). Para el análisis de expresión diferencial se usó la plataforma BestDEGs, que permite procesar los conteos crudos utilizando los modelos EdgeR y DESeq2 con los que se generó un consenso de los genes diferencialmente expresados. Finalmente se extrajo la lista consenso de genes diferencialmente expresados y se usó STRING para determinar los términos funcionalmente enriquecidos presentados en este trabajo.

2.13. PCR en tiempo real: El análisis de expresión de ARN mensajero de los genes *adora2a*, *adora2b* y *adora3* en linfocitos T CD8+ WT y CD73 KO agotados *in vitro* se realizó a través de PCR en tiempo real. Este análisis de expresión fue realizado por Catalina Rodríguez Bascuñan del Laboratorio de Inmunología de la Universidad de Chile como se comenta a continuación. Para la generación del ADNc, se utilizó 1µg ARN de linfocitos OT-I WT y CD73 KO obtenidos del cultivo de agotamiento utilizando el **kit ImProm-II Reverse Transcriptase de Promega**, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la reacción de PCR en tiempo real se utilizaron 2 µL del ADNc generado en la reacción anterior, partidores a concentraciones de 200 nm (*adora3*) y 400 nM (*adora2a* y *adora2b*), 10 µL de Brilliant II SYBR Green qPCR Master Mix (ref: 600828, Agilent Technologies), para luego completar 20 µL con agua libre de nucleasas. Las secuencias de los partidores utilizados se muestran en la Tabla 3. Para realizar la reacción se utilizó el termociclador BioRad CFX Connect y el *software* BioRad CFX Maestro. Las muestras se procesaron en duplicados biológicos y la cuantificación relativa se llevó a cabo siguiendo la ecuación propuesta por Pfaffl (Pfaffl, 2001), indicada a continuación:

$$Expresión\ relativa = \frac{E_{gen\ de\ interés}^{\Delta Ct_{gen\ de\ interés\ (Control-experimental)}}}{E_{gen\ de\ referencia}^{\Delta Ct_{gen\ de\ referencia\ (Control-experimental)}}$$

Donde E = Eficiencia de la reacción de amplificación, Ct = valor que representa el punto en el cual la fluorescencia de la reacción sobrepasa la fluorescencia basal, $\Delta Ct_{gen\ de\ interés} (control - experimental)$ = resta del valor de Ct para la amplificación del gen de interés utilizando ADNc del grupo control (en este caso células vírgenes) con el valor de Ct para la amplificación del gen de interés utilizando ADNc del grupo experimental (células T CD8+ *agotadas in vitro*), $\Delta Ct_{gen\ de\ referencia} (control - experimental)$ = resta del valor de Ct para la amplificación del gen de referencia (*Hprt*) utilizando ADNc del grupo control con el valor de Ct para la amplificación del gen de referencia utilizando ADNc del grupo experimental.

Los valores de E fueron determinados previamente en el laboratorio para todos los genes estudiados, realizando una curva de calibración para cada par de partidores a partir de reacciones de PCR variando la cantidad de ADNc en la mezcla. Con la pendiente (m) de esta curva de calibración se calculó E siguiendo la fórmula de a continuación extraída de la literatura (Rasmussen, 2001):

$$E = 10^{\frac{-1}{m}}$$

Tabla 3. Secuencias de partidores utilizados en este trabajo.

Gen	Directo (5' → 3')	Reverso (3' → 5')
<i>Adora2a</i>	CAC GCA GAG TTC CAT CTT CA	ATG GGT ACC ACG TCC TCA AA
<i>Adora2b</i>	GCG AGA GGG ATC ATT GCT G	CAG GAA CGG AGT CAA TCC AA
<i>Adora3</i>	ATA CCA GAT GTC GCA ATG TGC	GCA GGC GTA GAC AAT AGG GTT
<i>Hprt</i>	CTCCTCAGACCGCTTTTTC	TAACCTGGTTCATCATCGCTAATC

2.14. Crecimiento tumoral: Para los experimentos *in vivo* se inyectaron por vía intradérmica en el flanco derecho de la espalda baja del ratón 5×10^5 células B16.OVA resuspendidas en 50 μ L de PBS. Para esto los animales fueron anestesiados por inhalación de sevoflurano (ref: TH2L9117, Baxter) en cámara. El crecimiento tumoral se monitoreó utilizando un pie de metro para hacer 3 mediciones de ancho y 3 de largo desde que el tumor se encontraba palpable

(usualmente al día 7 después de la inyección de las células tumorales). El crecimiento tumoral se obtuvo graficando el área del tumor en función del tiempo.

2.15. Cotransferencia adoptiva: Linfocitos OT-I vírgenes WT (CD45.1+CD45.2+) y CD73 KO (CD45.2+) previamente aislados por *cell sorting* (indicado en la sección 2.10 de Materiales y Métodos) se mezclaron en proporción 1:1, proporción que se verificó por citometría de flujo (input) con los anticuerpos α CD45.1-PE-Cy7 y α CD45.2-PerCP-Cy5.5 o α CD45.2-BV510 (Fig. 22A). Luego, las células se centrifugaron a 600 x g, por 7 min a 4°C y resuspendieron en PBS (T° amb) a una concentración de 4×10^6 células (provenientes de cada ratón, WT o CD73 KO) por mL. A continuación, se inyectó 150 μ L de la suspensión celular por vía intravenosa por ratón. Como control, algunos ratones se inyectaron solo con PBS. Para determinar la razón CD73 KO/WT se usó la siguiente fórmula previamente publicada (Roseblatt et al., 2021), utilizando los valores de frecuencia de las respectivas células en el órgano indicado y comparándolos con las frecuencias de estas células en el input:

$$\text{Razón CD73 KO/WT} = \frac{\left(\frac{CD73\ KO_{\text{organo}}}{WT_{\text{organo}}}\right)}{\left(\frac{CD73\ KO_{\text{input}}}{WT_{\text{input}}}\right)}$$

2.16. Administración de SYN115: Ratones C57BL/6 con un tumor B16.OVA palpable (7 días posterior a la inyección de células tumorales) se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.) por 7 días con 7 dosis de 60 μ L de SYN115 (ref: HY-10995, *MedChemExpress*), 3 mg de SYN115 por kg de ratón, intercambiando diariamente el sitio de inyección entre el lado izquierdo y derecho. Como control se administró de forma similar el vehículo en el cual estaba disuelto SYN115. El vehículo consiste en una mezcla del 10% de DMSO y 90% de aceite de maíz (ref: C8267-500ML, *Sigma-Aldrich*). Un día después de la última dosis se analizó tumor, nódulo drenante y bazo a través de citometría de flujo. Las dosis fueron administradas diariamente. Uno de los ratones control fue excluido del

análisis puesto que poseía una lesión bajo la piel, en la zona de inyección, que podría indicar un error en la administración de esta.

2.17. Análisis estadístico: La estadística de este trabajo, con excepción del análisis de RNAseq, se hizo utilizando el *software* GraphPad Prism versión 9.5.0. Para todos los análisis estadísticos realizados a través de GraphPad Prism se verificó la normalidad de los datos a través de la prueba de Shapiro-Wilk o con prueba de D'agostino & Pearson. Además, se utilizó la función que utiliza el método ROUT (*the Robust Regression and Outlier Removal*) para revisar la presencia de valores atípicos y estos fueron sacados del análisis. Para comparar 2 grupos experimentales pareados con una sola variable se realizó un t-test pareado en el caso de que los datos tuvieran una distribución normal y una prueba de los rangos con signo de pares emparejados de Wilcoxon en caso de que la distribución no fuera normal. Para comparar 2 grupos experimentales no pareados con una sola variable se utilizó un t-test no pareado con corrección de Welch para datos con distribución normal y una prueba de Mann-Whitney en el caso de que no fuera normal la distribución de los datos. Para comparar curvas de crecimiento tumoral se utilizó un ANOVA de dos vías y corrección de Bonferroni. Para comparar más de 2 grupos no pareados de datos entre sí o respecto a un grupo control con una sola variable se utilizó un ANOVA de una vía con corrección de Bonferroni. Cuando en el mismo caso los datos eran pareados se utilizó un ANOVA de una vía de medidas repetidas con corrección de Bonferroni. En los casos en los que los datos se normalizaron respecto a un control o respecto al input y se compararon con un valor teórico se utilizó un t-test de una muestra para datos con distribución normal o una prueba de Wilcoxon de una muestra para datos sin distribución normal. Para el análisis estadístico del número de divisiones realizado en los experimentos con *CellTrace Violet*, se realizó un t-test múltiple para datos no pareados con corrección con método de Bonferroni-Dunn. Valores de $p \leq 0,05$ se consideraron como estadísticamente significativos con * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$ y **** = $p \leq 0,0001$.

3. RESULTADOS

Objetivo 1. Estudiar el papel de CD73 y de la señalización de adenosina por medio de A2AR en la diferenciación y fenotipo de los linfocitos T CD8+ agotados y precursores agotados *in vitro*.

Los resultados obtenidos relativos al objetivo 1 se pueden dividir en 3 actividades, las cuales se presentan a continuación:

Objetivo 1.1. Estandarizar un protocolo para la generación de linfocitos T CD8+ agotados *in vitro* e identificar a las poblaciones agotadas (Tex) y precursoras agotadas (Tpex).

Para estudiar el papel de CD73 y de la señalización de adenosina a través de A2AR en la diferenciación de los linfocitos T CD8+ agotados *in vitro*, se estandarizó un protocolo descrito en la literatura (Zhao et al., 2020) para la generación de linfocitos OT-I agotados (Fig.1A). El grupo de Zhao demostró que la estimulación repetida por 5 días con el péptido SIINFEKL en los linfocitos OT-I recapitula todas las características moleculares y funcionales del agotamiento de linfocitos T CD8+. En este protocolo se utilizan linfocitos transgénicos OT-I en lugar de silvestres ya que al poseer un TCR específico para el péptido SIINFEKL (péptido OT-I) se puede realizar una activación repetida y controlada de estas células utilizando dicho péptido. Por otro lado, en el protocolo publicado se purifican linfocitos T CD8+ (OT-I) totales y, a menos que se indique otro método, en este trabajo se sigue con el mismo tipo de purificación. Así, a lo largo de este trabajo, todos los experimentos referidos a agotamiento *in vitro* se realizaron utilizando linfocitos OT-I o linfocitos OT-I CD73KO. En adición, se referirá a ellos también como linfocitos T CD8+ ya que siempre se aislaron con un kit de purificación de linfocitos T CD8+ totales o vírgenes según se indique. Como control del protocolo de agotamiento utilizamos activación aguda de los linfocitos

T CD8+, que consistió en administrar por 48h el péptido OT-I al inicio del cultivo, luego lavar las células y continuar el cultivo hasta los 5 días. Una vez finalizado el cultivo, los linfocitos se analizaron por citometría de flujo siguiendo la estrategia de *gating* de la Fig. 1B para determinar el porcentaje y número de células vivas (Fig. 1C y D). Para el análisis del fenotipo de las células agotadas se evaluó marcadores de troncalidad, activación, agotamiento y de fenotipo efector, así como el perfil de expresión de distintas subpoblaciones de linfocitos T CD8+ descritas en la literatura. Ver en Tabla 4 la descripción específica de cada uno de los marcadores fenotípicos analizados.

La activación crónica de los linfocitos OT-I resultó en un menor porcentaje de células vivas respecto al estímulo agudo (Fig. 1C). Además, la estimulación crónica provocó un aumento promedio de 1,49 veces el número de células respecto al input inicial, mientras que la estimulación aguda provocó en promedio un aumento mayor, siendo de 8,49 veces el input (Fig. 1D). Estas diferencias parecen no deberse a cambios en la proliferación, ya que se realizó un cultivo de linfocitos OT-I marcados con *CellTrace Violet* (una molécula fluorescente que se diluye con los ciclos de proliferación) y tanto las células activadas crónicamente como de forma aguda presentaron una dilución similar al día 3 posterior al inicio de la activación (Fig. 1E).

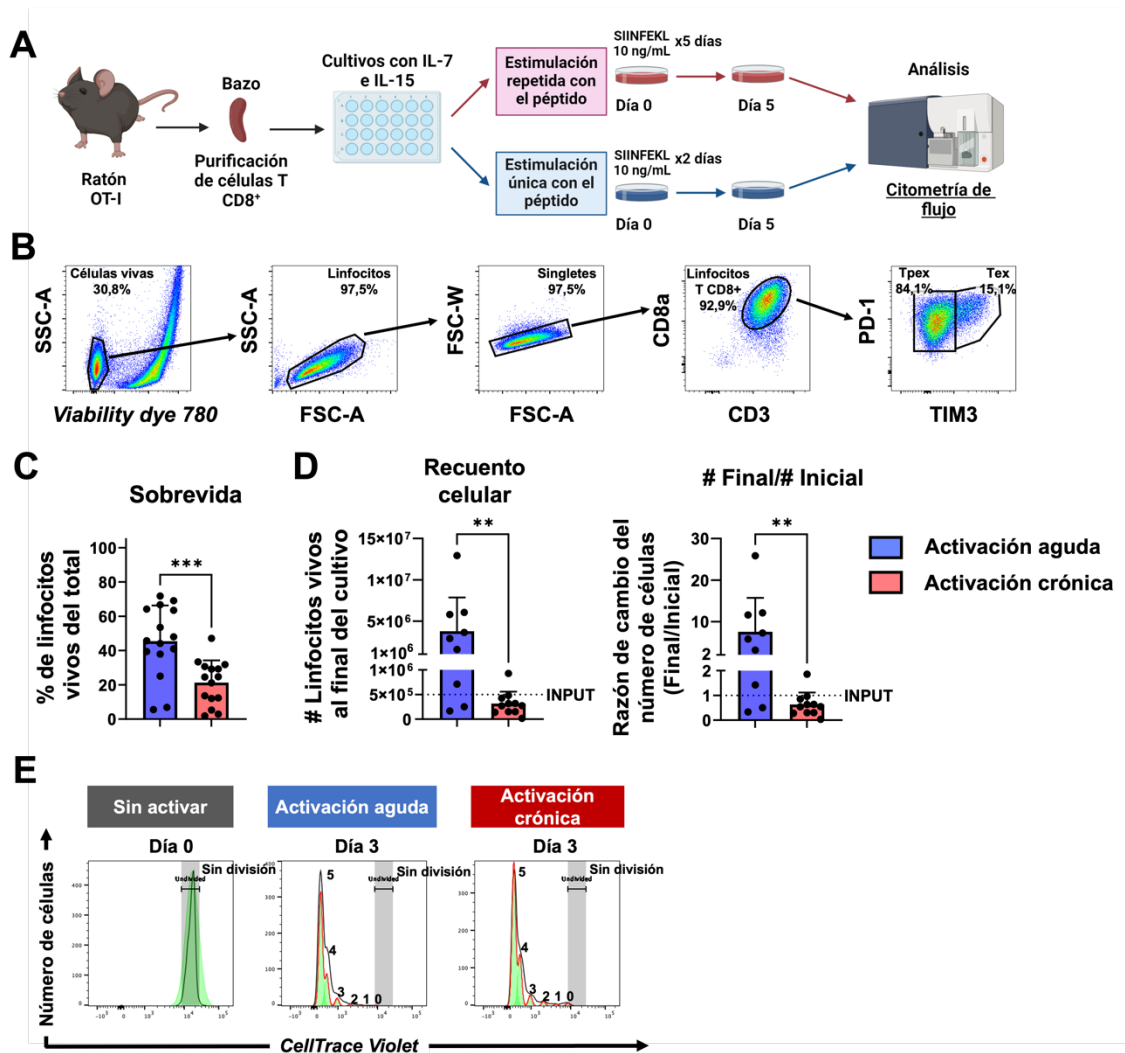


Figura 1. Protocolo experimental para el estudio del agotamiento de linfocitos T CD8⁺ *in vitro* y supervivencia de los linfocitos agotados.

Linfocitos OT-I fueron activados por 5 días (activación crónica) o 2 días (activación aguda) con el péptido OT-I, en presencia de IL-7 e IL-15 y luego su fenotipo se analizó a través de citometría de flujo. **A**. Esquema del protocolo experimental. **B**. Estrategia de *gating* de linfocitos activados de forma crónica *in vitro*. **C**. Análisis estadístico del porcentaje de linfocitos vivos obtenidos al cabo de 5 días con la estimulación crónica o aguda. **D**. Recuento celular al finalizar el cultivo y razón de cambio del número de células final respecto al input de 5×10^5 . **E**. Evaluación de la proliferación de los linfocitos activados en forma aguda y crónica marcados con *CellTrace Violet* al día 3 del cultivo celular. En **C** y **D** cada punto representa un ratón diferente. **C**, $n=15$ para activación aguda y crónica; **D**, $n=9$ para activación aguda y $n=11$ para activación crónica; **E**=1 para activación aguda y crónica. En **C** se utilizó t-test pareado y en **D** prueba de Mann-Whitney. ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,001$.

Tabla 4. Características de los marcadores fenotípicos de las distintas poblaciones de linfocitos T CD8+ analizadas durante este trabajo.

Función general	Molécula	Descripción	T virgen	Tef	Tcm	Tem	Tpex	Tex Tint (agotamiento intermedio)	Tex clásicas
Troncalidad	TCF1	Factor de célula T 1. Factor de transcripción que regula diferenciación y longevidad en los linfocitos T de memoria.	+	-	+	+	+	-	-
	LY108	Miembro 6 de la familia de moléculas activadoras de linfocitos, o por sus siglas en inglés, SLAMF6. Tiene una función aparentemente dual en los linfocitos T, existiendo evidencia de que potencia y de que reduce la actividad de estas células. Su expresión caracteriza a células Tpex y se ha utilizado en su identificación en reemplazo de TCF1.	+	-			+	-	-
	CD62L	L-selectina. Molécula de adhesión celular asociada a la migración celular hacia órganos linfoides secundarios.	+	-	+	-	+/-	-	-
Activación	CD25	Cadena alfa del receptor de interleuquina 2.							
	CD44	Molécula de adhesión celular.	- o bajo		+	+	+		+
	CD69	Lectina de tipo C que previene el egreso de la célula del tejido.	-				+/-	-	+
Agotamiento	TOX	Factor maestro del agotamiento.					alto	+	+ o alto
	PD-1	Receptor inhibitorio.					+	alto	alto
	LAG-3	Receptor inhibitorio.					+		+
	TIGIT	Receptor inhibitorio.							+
	TIM3	Receptor inhibitorio.	-	-			-	+/-	+
	2B4	Receptor inhibitorio.					-		+
	CD39	Ectoenzima que produce ADP y AMP a partir de ATP.					-	+	+ o alto
Perfil efector	KLRG1	Receptor inhibitorio que caracteriza a linfocitos T efectores de vida media corta y algunas poblaciones de memoria.		+					
Función efectora	IL-2	Citoquina que promueve la proliferación y diferenciación de los linfocitos T.		(+)	(+)	(-)	(+/-)		(-)
	IFN γ	Citoquina proinflamatoria.		(+)	(+)	(+)	(+/-)		(+/-)
	TNF α	Citoquina proinflamatoria.		(+)	(+)	(+)	(+/-)		(+/-)

-La tabla se hizo en base a las referencias (Blackburn et al., 2008; Caserta et al., 2012; Gartshteyn et al., 2023; Gebhardt et al., 2023; Kallies et al., 2020; S. W. Lee et al., 2023; Nakajima et al., 2021; Restifo & Gattinoni, 2013; Seder et al., 2008; Seo et al., 2021).

- Los espacios vacíos indican que no se encontró información al respecto.

- El signo + indica expresión de la molécula, el signo – indica falta de expresión y +/- indica que puede o no expresar la molécula. El uso de () indica expresión frente a un reestímulo.

Tanto la exposición aguda como crónica al péptido OT-I provocó la generación de linfocitos T CD8+ activados, identificados por la expresión de CD69, CD25 y CD44 (Fig. 2A y B), no obstante, la expresión de CD69 y CD25 solo se mantuvo en la mayor parte de los linfocitos T CD8+ (93,8% CD69+ y 82,5% CD25+) con la estimulación crónica. La frecuencia de células OT-I que expresan niveles altos de TCF1 (TCF1hi) así como otras moléculas asociadas a la troncalidad como LY108 y CD62L se vio reducida con la activación crónica en relación con la activación aguda (Fig. 2C y D). Notablemente, la alta expresión de TCF1 y de CD44 en las células activadas de forma aguda, junto con la expresión de CD62L guarda relación con un fenotipo de célula de memoria central (Tcm). Así, el estímulo crónico generó un estado de mayor activación y menor troncalidad en los linfocitos T CD8+ respecto al estímulo agudo.

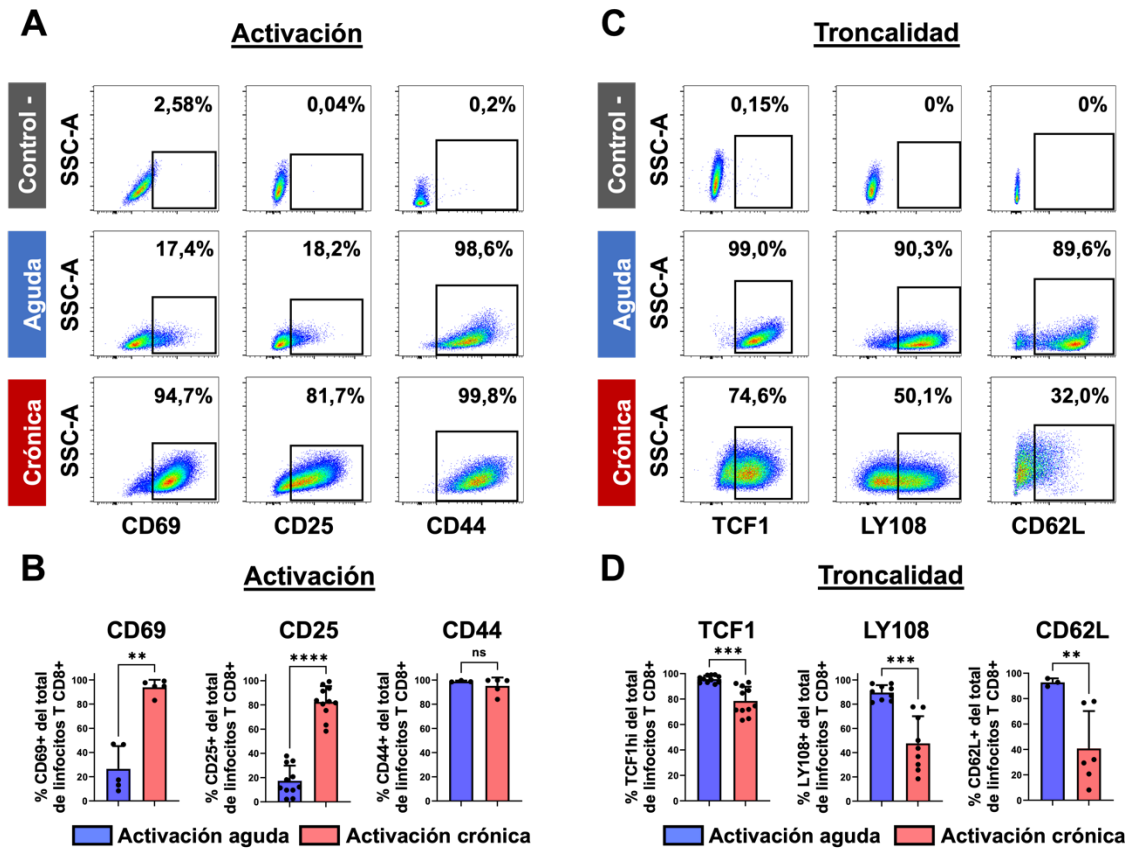


Figura 2. La activación crónica de linfocitos T CD8+ *in vitro* genera un aumento en la proporción de células que expresan marcadores de activación y una disminución de células que expresan marcadores de troncalidad.

Linfocitos OT-I fueron activados por 5 días (activación crónica) o 2 días (activación aguda) con el péptido OT-I, en presencia de IL-7 e IL-15 y la expresión de moléculas asociadas a activación y troncalidad se analizó a través de citometría de flujo. La estrategia de gating se muestra en la Fig. 1B. **A.** Citometría de flujo representativa de la expresión de las proteínas asociadas a activación CD69, CD25 y CD44 en linfocitos T CD8+ activados en forma aguda o crónica. **B.** Análisis estadístico del porcentaje de células CD69+, CD25+ y CD44+ del total de linfocitos T CD8+ activados de forma aguda o crónica. **C.** Citometría de flujo representativa de la expresión de las proteínas asociadas a troncalidad TCF1, LY108 y CD62L en linfocitos T CD8+ activados. **D.** Análisis estadístico del porcentaje de células TCF1^{hi} (alta expresión), LY108+ y CD62L+ del total de linfocitos T CD8+ activados. Para CD69 n=5, para LY108 n=9, para CD25 y TCF1 n=11, tanto activación aguda como crónica, t-test pareado. Para CD69 n=5, para LY108 n=9, para CD25 y TCF1 n=11, tanto activación aguda como crónica, t-test pareado. Para CD44 n=3 activación aguda y n=5 activación crónica, para CD62L n=3 activación aguda y n=6 activación crónica, t-test no pareado. Para el análisis estadístico de CD62L se aplicó corrección de Welch. ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001, **** p ≤ 0,0001 y ns= no significativo.

La activación crónica *in vitro* en los linfocitos T CD8+ indujo la expresión de moléculas asociadas al agotamiento. En línea con lo reportado en la literatura (Zhao et al., 2020), los linfocitos con estímulo crónico se enriquecieron en células que expresan TOX, PD-1, TIM3, CD39, LAG-3, TIGIT y 2B4, mientras que aquellos sometidos a activación aguda carecen de estas moléculas (Fig. 3A y B).

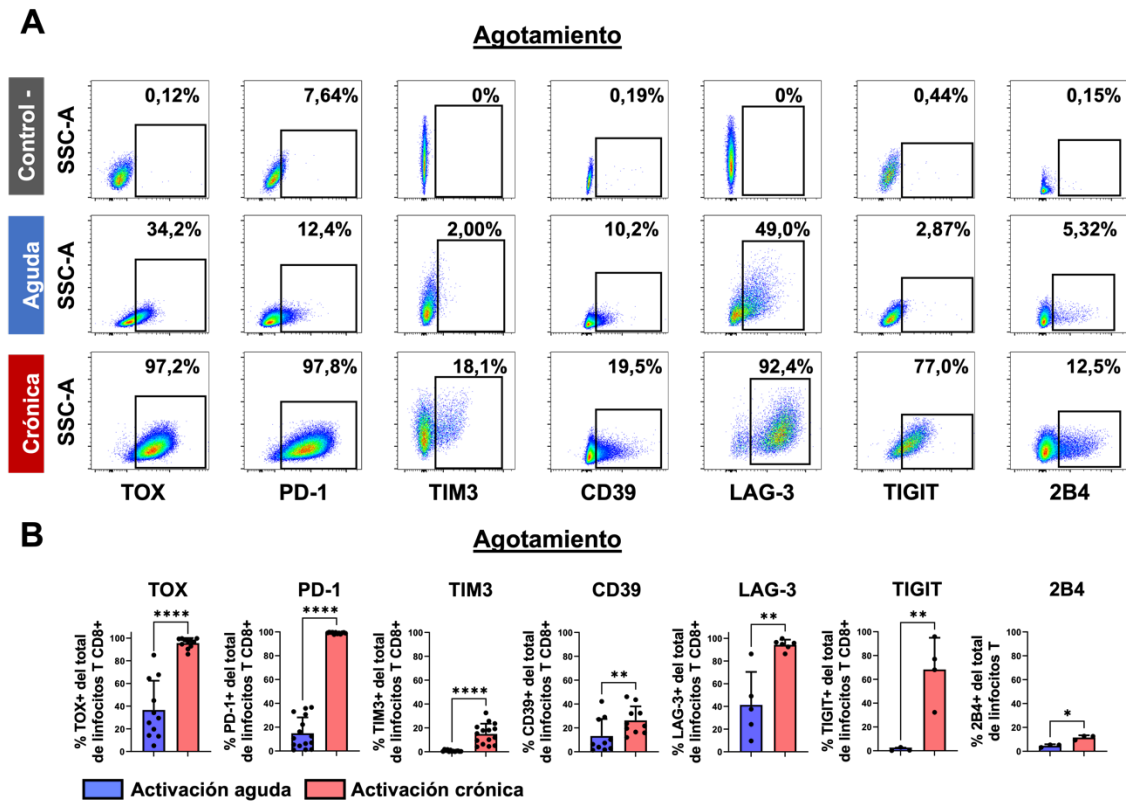


Figura 3. La activación crónica de linfocitos T CD8+ *in vitro* genera un aumento en la proporción de células que expresan moléculas asociadas al agotamiento.

Linfocitos OT-I fueron activados por 5 días (activación crónica) o 2 días (activación aguda) con el péptido OT-I, en presencia de IL-7 e IL-15 y la expresión de moléculas asociadas a agotamiento se analizó a través de citometría de flujo. La estrategia de gating se muestra en la Fig. 1B. **A.** Citometría de flujo representativa de la expresión de TOX, PD-1, TIM3, CD39, LAG-3, TIGIT y 2B4 en linfocitos T CD8+ expuestos a los distintos tipos de activación. **B.** Análisis estadístico del porcentaje de células TOX+, PD-1+, TIM3+, CD39+, LAG-3+, TIGIT+ y 2B4+ del total de linfocitos T CD8+ activados. Para 2B4 las células se analizaron a partir de linfocitos totales CD3+. Para TOX n=11 y 2B4 n=3 agudo y crónico, t-test pareado. Para PD-1 n=15 agudo y n=12 crónico, mientras que para TIM3 n=13 agudo y n=15 crónico, Mann-Whitney. Para LAG-3 n=5 agudo y n=6 crónico, mientras que para TIGIT n=3 agudo y n=4 crónico, t-test no pareado. Para CD39 n=10 agudo y crónico, Wilcoxon. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ y **** $p \leq 0,0001$.

Por otra parte, los linfocitos T CD8⁺ activados crónicamente o en forma aguda fueron reestimulados por 6h adicionales con el péptido OTI, para posteriormente analizar la expresión de IFN γ y TNF α . La Fig. 4A muestra que los linfocitos T CD8⁺ activados en forma crónica presentan un déficit en la producción de TNF α comparados a los linfocitos activados en forma aguda. En cuanto a la producción de IFN γ se observa que la totalidad de las células activadas en forma crónica o aguda producen esta citoquina, aunque la intensidad media de fluorescencia es menor en los linfocitos bajo estimulación crónica (Fig. 4A, B y D). No se observaron cambios significativos en la expresión de IL-2 entre las células con los distintos tipos de activación, y la expresión de esta citoquina fue baja o nula en ambos casos luego del reestímulo (Fig. 4C y D). De esta manera, los linfocitos T CD8⁺ activados crónicamente *in vitro* muestran características funcionales y fenotípicas de células agotadas mientras que los linfocitos activados de forma aguda poseen un fenotipo y potencial efector similar al de las células T de memoria.

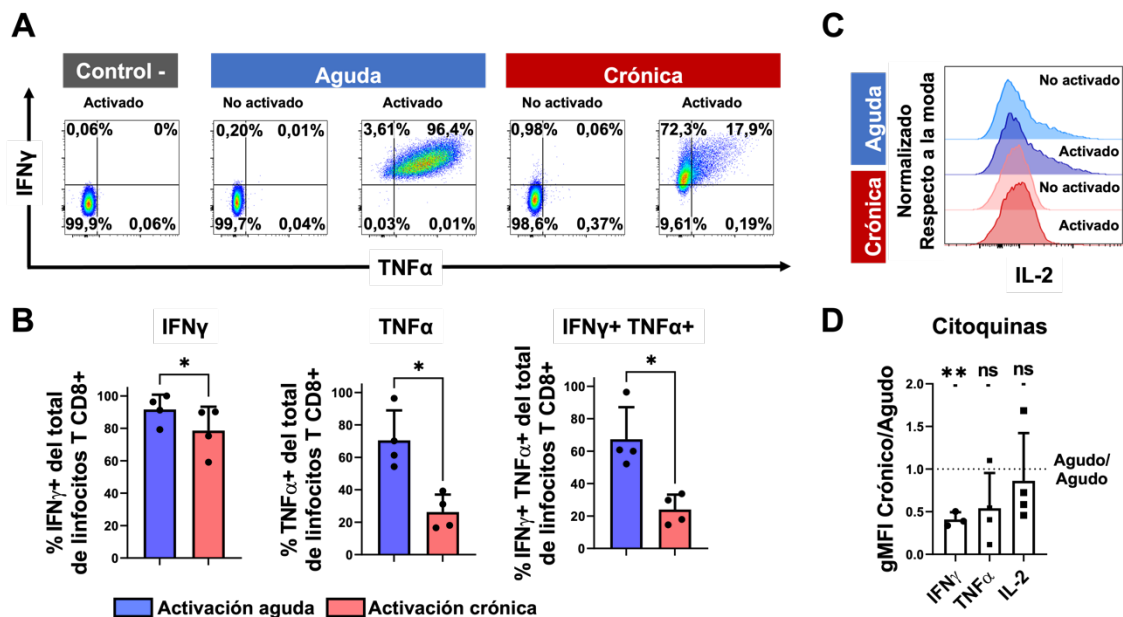


Figura 4. La activación crónica de linfocitos T CD8⁺ *in vitro* disminuye su potencial efector.

Linfocitos OT-I fueron activados por 5 días (activación crónica) o 2 días (activación aguda) con el péptido OT-I, en presencia de IL-7 e IL-15 luego de lo cual se reestimularon

con péptido OT-I (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 6h, en presencia del inhibidor del transporte de proteínas Brefeldina A para analizar la expresión intracelular de $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ e IL-2. Las mismas células sin reestímulo con el péptido OT-I fueron utilizadas como control negativo (indicado como No activado). Como control negativo adicional se marcaron células activadas de forma crónica reestimuladas sin hacer el marcaje intracelular que incluye las citoquinas (Control-). **A.** Citometría de flujo representativa de la expresión de $\text{IFN}\gamma$ y $\text{TNF}\alpha$ luego de reactivar las células con el antígeno y sus respectivos controles. **B.** Análisis estadístico de los porcentajes de células $\text{IFN}\gamma+$, $\text{TNF}\alpha+$ o dobles positivas del total de linfocitos T CD8+. **C.** Histograma representativo de la expresión de IL-2 en los linfocitos T CD8+. **D.** Análisis estadístico de la expresión de las distintas proteínas estudiadas a nivel de gMFI normalizado respecto a la expresión de la determinada proteína en linfocitos estimulados de forma aguda. Para ambos estímulos $n=4$. En **B** se usó t-test pareado. En **D** se usó un t-test de una muestra comparando contra un valor teórico 1 que representa el valor que resulta de normalizar el gMFI de las citoquinas en las muestras activadas de forma aguda con respecto a las mismas muestras. * $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$ y ns= no significativo.

Según lo descrito por Zhao (Zhao et al., 2020), es posible identificar a las poblaciones T_{pex} y T_{ex} en los cultivos por la expresión diferencial de TCF1 y TOX. En nuestras manos los resultados fueron variables y poco concluyentes con estos dos marcadores. De esta manera, revisamos la expresión de otros marcadores (Tabla 4) que caracterizan a estas poblaciones. Así, posterior a la estimulación crónica de los linfocitos T CD8+ se identificaron 2 poblaciones con distinto fenotipo gracias a la expresión diferencial de los receptores inhibitorios PD-1 y TIM3, que no están presentes luego de la estimulación aguda (Fig. 5A). Estas poblaciones incluyen una más abundante, con expresión intermedia de PD-1 y que carece de TIM3 (PD-1^{int} TIM3⁻, similar a T_{pex}) y otra población en menor proporción, con alta expresión de PD-1 y que sí expresa TIM3 (PD-1⁺ TIM3⁺, similar a T_{ex}) (Fig. 5A). Tanto las subpoblaciones T_{pex} como T_{ex} están enriquecidas en células que expresan las moléculas asociadas a activación CD69, CD25 y CD44 (Fig. 5B y D), pero los linfocitos T_{ex} están más enriquecidos en células CD25⁺ (Fig. 5B) y tienen niveles de expresión mayores de esta molécula que las células T_{pex} (Fig. 5D). Por otro lado, los linfocitos T_{pex} están más enriquecidos en células que tienen un fenotipo troncal con una alta expresión de TCF1 y un porcentaje mayor de células LY108⁺ que las células T_{ex} (Fig. 5C y D). Así, los resultados sugieren que, entre las subpoblaciones de células

agotadas generadas *in vitro*, los linfocitos T_{pex} poseen un estado de diferenciación menor o más troncal respecto a los linfocitos T_{ex}.

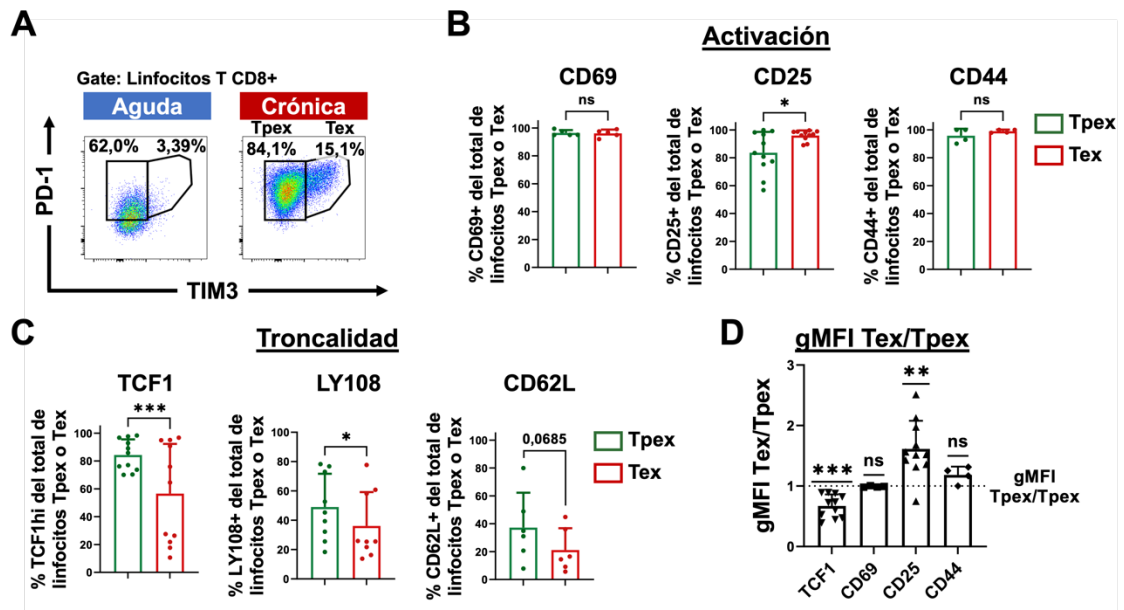


Figura 5. La expresión de PD-1 y TIM3 distingue células con distinto grado de activación y troncalidad, similares a T_{pex} y T_{ex}.

Linfocitos OT-I fueron activados por 5 días (activación crónica) o 2 días (activación aguda) con el péptido OT-I, en presencia de IL-7 e IL-15 y se analizó la presencia de subpoblaciones T_{pex} o T_{ex} en base a la expresión de PD-1 y TIM3. La expresión de moléculas asociadas a activación y troncalidad se analizó en T_{pex} y T_{ex} a través de citometría de flujo **A**. Citometría de flujo representativa mostrando la estrategia de gating para el estudio de linfocitos T_{pex} y T_{ex} dentro de los linfocitos OT-I agotados crónicamente. **B**. Análisis estadístico del porcentaje de células CD69+, CD25+ y CD44+ en las poblaciones T_{pex} y T_{ex} generados por estimulación crónica *in vitro*. **C**. Porcentaje de células TCF1^{hi}, LY108+ y CD62L+ en las poblaciones PD-1^{int} TIM3⁻ (T_{pex}) y PD-1^{hi} TIM3⁺ (T_{ex}) generadas *in vitro*. **D**. Veces de cambio de la expresión a nivel de gMFI de TCF1, CD69, CD25 y CD44 de T_{ex} respecto a T_{pex}. Para Ly108 n=9, mientras que para TCF1 y CD25 n=11 para T_{pex} y T_{ex}, Wilcoxon. Para CD44 n=4, CD69 n=5 y CD62L n=6 para T_{pex} y T_{ex}, t-test pareado. En **D**, para TCF1 n=10, CD69 y CD44 n=4 y CD25 n=11. En **D** se usó un t-test de una muestra comparando contra un valor teórico 1 que representa el valor que resulta de normalizar el gMFI de las proteínas expresadas en T_{pex} contra su mismo valor. * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001 y ns= no significativo.

Al estudiar la expresión de moléculas asociadas al agotamiento en linfocitos T CD8+ activados crónicamente *in vitro*, se observó que los linfocitos T_{ex} estaban enriquecidos en células CD39+, TIGIT+ y 2B4+ (Fig. 6A), y tienen niveles ligeramente más bajos de TOX (Fig. 6B) que la población T_{pex}. Además, las diferencias de expresión en PD-1 fueron significativas entre ambas poblaciones

(Fig. 6B), siendo mayor en los linfocitos Tex respecto a los linfocitos Tpex. Por otro lado, frente a una reestimulación con el péptido OT-I, las frecuencias de células productoras de $\text{IFN}\gamma$, así como de $\text{TNF}\alpha$ y de ambas simultáneamente fueron más altas dentro de la población Tex en relación con los linfocitos Tpex (Fig. 6C). Por otra parte, en el laboratorio se evaluó la capacidad de generar células más diferenciadas a partir de Tex y Tpex, las cuales fueron seleccionadas mediante *cell sorting* en base al marcaje diferencial que se produce entre PD-1 y TIM3. Las poblaciones seleccionadas se volvieron a cultivar por 3 días, observando que solo la población Tpex puede originar células Tex y no al revés (datos no mostrados). Así las características fenotípicas y funcionales observadas en las poblaciones PD-1^{int} TIM3⁻ y PD-1⁺ TIM3⁺ nos permiten referirnos a ellas como células Tpex y Tex respectivamente.

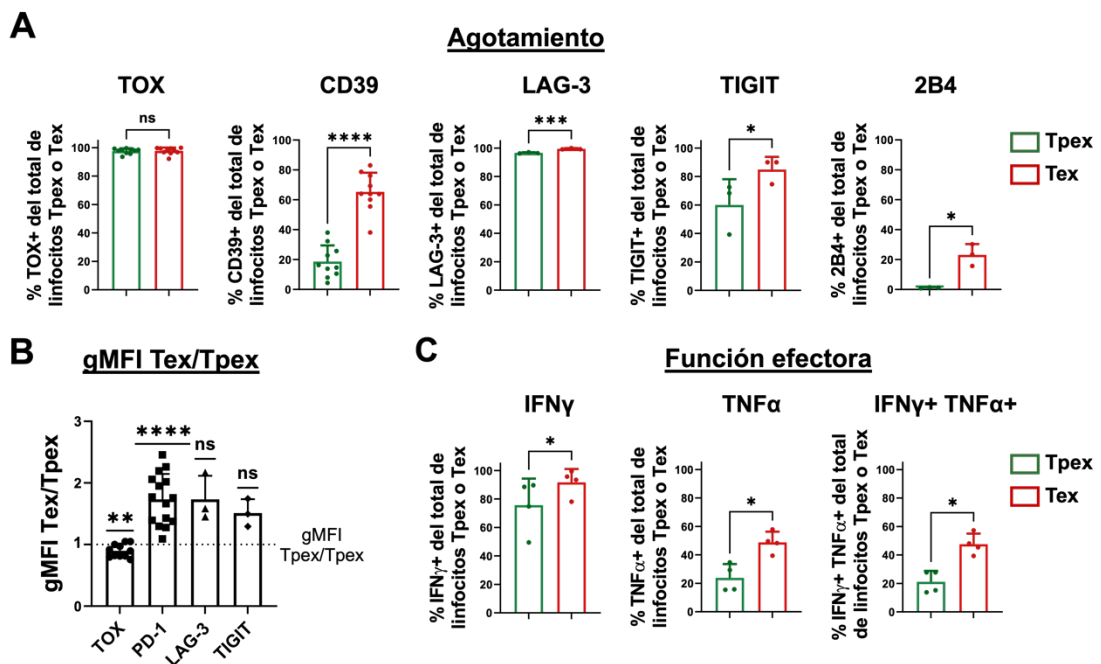


Figura 6. La expresión de PD-1 y TIM3 distingue células con distinto grado de agotamiento y potencial efector, similares a Tpex y Tex.

Linfocitos OT-I fueron activados por 5 días (activación crónica) o 2 días (activación aguda) con el péptido OT-I, en presencia de IL-7 e IL-15. La expresión de moléculas asociadas a agotamiento y función efectora se analizó en Tpex y Tex a través de citometría de flujo. Para medir la función efectora se reactivaron las células por 6 horas

con el péptido OT-I ($\mu\text{g}/\text{mL}$) y Brefeldina A. **A.** Porcentaje de células TOX+, CD39+, LAG-3+, TIGIT+ y 2B4+ del total de linfocitos T_{pex} y T_{ex}. **B.** Veces de cambio de la expresión a nivel de gMFI de TOX, PD-1, LAG-3 y TIGIT de T_{ex} respecto a T_{pex}. **C.** Producción de las citoquinas efectoras IFN γ y TNF α en T_{pex} y T_{ex} generados *in vitro*. Se muestra el porcentaje de células IFN γ + (izquierda), TNF α + (centro) o que expresan ambas citoquinas (derecha) del total de linfocitos T_{pex} y T_{ex}. En **A**, para TOX y CD39 n=10, mientras que para LAG-3, TIGIT y 2B4 n=3 para T_{pex} y T_{ex}, t-test pareado. En **b** para TOX n=11, PD-1 n=15 y LAG-3 y TIGIT n=3. En **B** se usó un t-test de una muestra comparando contra un valor teórico 1 que representa el valor que resulta de normalizar el gMFI de las proteínas expresadas en T_{pex} contra su mismo valor. En **C**, tanto para IFN γ + como TNF α + y doble positivo n=4, t-test pareado. * p \leq 0,05, ** p \leq 0,01, *** p \leq 0,001, **** p \leq 0,001 y ns= no significativo.

Con el objetivo de mejorar la obtención de células T_{pex} y T_{ex} ensayamos cambiar las células con que iniciamos el cultivo de agotamiento. Como se muestra en la Fig. 7A, los linfocitos T CD8+ provenientes de un bazo de ratón OT-I están compuestos en su mayoría de linfocitos T CD8+ vírgenes (CD62L+CD44-) pero también incluyen un porcentaje menor de linfocitos T CD8+ de memoria central (T_{cm}) y de memoria efectora (T_{em}). Con el objetivo de conocer cómo influye la presencia de linfocitos de memoria en la generación de T_{pex} y T_{ex} *in vitro* realizamos el cultivo de activación crónica a partir de linfocitos OT-I vírgenes purificados de bazo en base a la expresión de CD44 y CD62L (CD44bajo CD62L+) tal como se muestra en la Fig. 7B. También incluimos en este experimento el análisis de T_{pex} y T_{ex} de cultivos de 5 y 7 días de estimulación crónica para determinar si una activación más prolongada promueve la generación de células agotadas más diferenciadas (ver protocolo experimental en Fig. 7B). Interesantemente, la activación crónica de linfocitos T CD8+ vírgenes por 5 días produjo cultivos con alta viabilidad, comparables al control con activación aguda (Fig. 7C), y un alto número de células en valores absolutos en relación con el estímulo agudo (Fig. 7D). Por otro lado, la activación por 7 días resultó en cultivos con baja sobrevida (Fig. 7C) comparado a la estimulación aguda, similares a los observados en cultivos con linfocitos OT-I totales, así como números bajos de células vivas (Fig. 7D). Como resultado de la activación de linfocitos T vírgenes por 5 días y, a diferencia de lo observado con el cultivo de

linfocitos OT-I totales, se generó casi exclusivamente la población de linfocitos T_{pex}, con un porcentaje promedio de 98,9% (Fig. 7E). Estas células expresaron TCF1, TOX y LAG-3, todos marcadores de linfocitos T_{pex} (Fig. 7F). La población de linfocitos T_{ex} se hizo más detectable en los cultivos con 7 días de activación, no obstante, no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias entre 5 y 7 días de estímulo (Fig. 7G). Sin embargo, los linfocitos OT-I vírgenes activados por 7 días presentaron una mejor capacidad para producir citoquinas efectoras frente a un reestímulo con el péptido OT-I ya que encontramos una mayor frecuencia de células productoras de IFN γ , TNF α y de ambas simultáneamente, que su contraparte activada por 5 días y aquellas activadas de forma aguda (Fig. 7H). La baja capacidad de producción de citoquinas efectoras en los linfocitos OT-I activados por 5 días recuerda al fenotipo de linfocitos T_{pex}, que carecen de dicha capacidad, mientras que la capacidad mejorada de producir citoquinas efectoras observada en linfocitos OT-I activados por 7 días recuerda a linfocitos T con un agotamiento intermedio (T_{int}), los cuales además pueden o no expresar TIM3 (Gebhardt et al., 2023) (Tabla 4). Estos resultados sugieren que la presencia de linfocitos T de memoria al inicio del cultivo influye en la generación de T_{ex}.

En conjunto, los resultados indican que mientras la activación crónica *in vitro* de linfocitos T CD8⁺ permite generar tanto linfocitos T_{pex} como T_{ex}, mientras que el uso de linfocitos T CD8⁺ vírgenes permite obtener principalmente T_{pex} y analizar su posterior diferenciación.

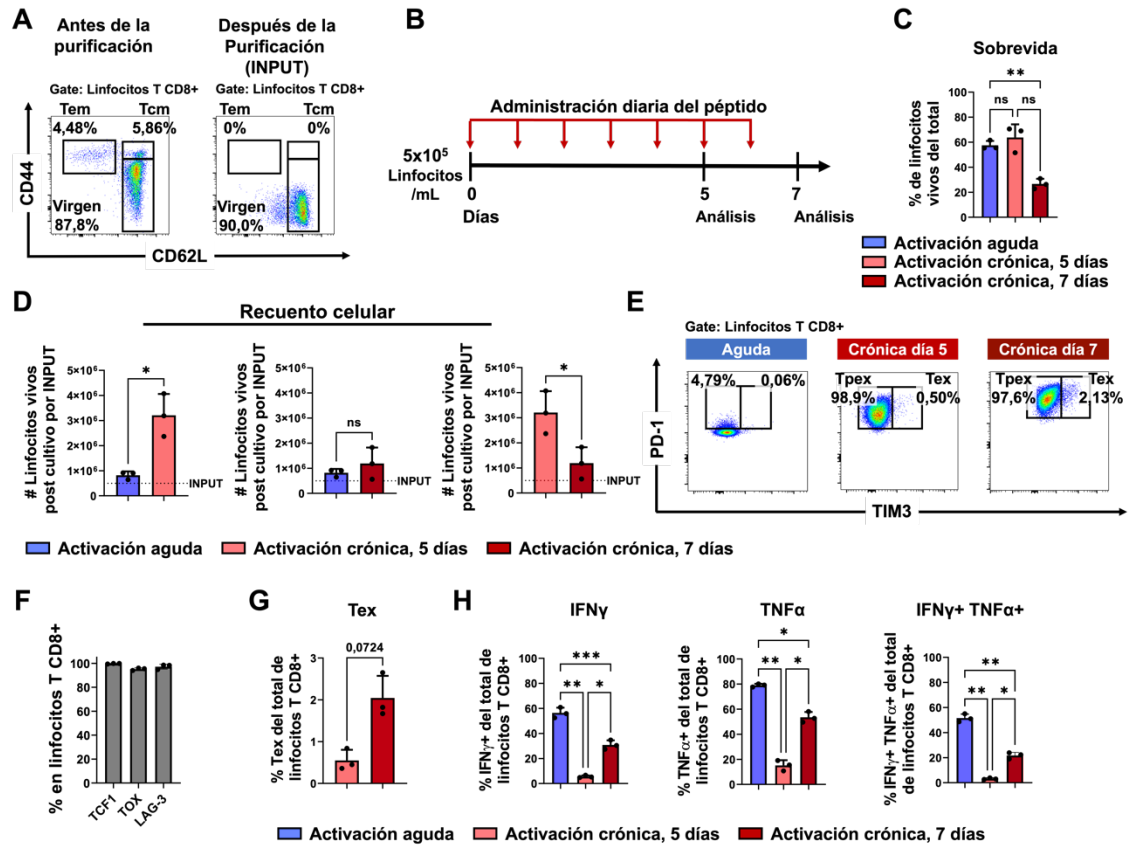


Figura 7. La activación crónica de linfocitos vírgenes *in vitro* genera Tpex que originan células más diferenciadas al aumentar el tiempo de activación.

Linfocitos OT-I vírgenes fueron activados por 5 o 7 días (activación crónica) o 2 días (activación aguda) con el péptido OT-I, en presencia de IL-7 e IL-15 y su fenotipo y potencial efector fueron evaluados a través de citometría de flujo. **A.** Citometría de flujo representativa de poblaciones de linfocitos T CD8+ vírgenes, TEM y TCM antes y después (INPUT) de la purificación inmunomagnética de linfocitos vírgenes. La figura corresponde a un concatenado de 3 muestras. **B.** Esquema experimental. **C.** Análisis estadístico del porcentaje de linfocitos vivos al final de los distintos protocolos de activación *in vitro*. **D.** Comparación de los números absolutos de linfocitos vivos al final de los diferentes cultivos con un input de 5×10^5 células, entre activación aguda y crónica por 5 días (izquierda), aguda y crónica por 7 días (al medio) y crónica por 5 y 7 días (derecha). **E.** Citometría de flujo representativa del análisis de poblaciones Tpex y Tex generadas con los distintos tipos de estímulos. La figura corresponde a un concatenado de 3 muestras. **F.** Análisis del porcentaje de células TCF1+, TOX+ y LAG-3+ del total de linfocitos T CD8+ luego de 5 días de cultivo de agotamiento. **G.** Porcentaje de células Tex obtenidas luego de 5 y 7 días de activación con péptido. **H.** Capacidad de producción de las citoquinas efectoras IFN γ y TNF α de los linfocitos T CD8+ luego de un reestímulo con péptido OT-I durante 6 h en presencia de Brefeldin A. Se muestra el porcentaje de células IFN γ + (izquierda), TNF α + (centro) o que expresan ambas (derecha) del total de linfocitos T CD8+. Para todos los estímulos antigénicos n=3. Para **C** y **H**, ANOVA de una vía de medidas repetidas con corrección de Bonferroni. Para **D** y **G** t-test pareado. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ y ns= no significativo.

Objetivo 1.2. Estudiar el papel de CD73 en la generación y fenotipo de las poblaciones de linfocitos T CD8+ agotados (Tex) y precursoras agotadas (Tpex) *in vitro*.

Posterior a la estimulación aguda y crónica de los linfocitos OT-I totales evaluamos la expresión de CD73 a través de citometría de flujo. Alrededor del 40% de los linfocitos T CD8+ OT-I expresan CD73 constitutivamente. Luego del cultivo en condiciones de estimulación aguda o crónica, el porcentaje de linfocitos OT-I que expresa CD73 disminuyó significativamente solo con la estimulación crónica respecto al porcentaje de expresión basal, y además el porcentaje de linfocitos OT-I CD73+ fue menor que el observado para el estímulo agudo (Fig. 8A y 8B). Habiendo definido los linfocitos Tpex como PD-1+TIM3- y los linfocitos Tex como PD-1+TIM3+ (ver Fig. 5), cuando analizamos la expresión de CD73 en los linfocitos Tpex y Tex obtenidos de la estimulación crónica, los linfocitos Tex presentan una disminución significativa de CD73 comparado a los Tpex (Fig. 8C y 8D). Interesantemente, una mayor frecuencia de expresión de CD73 en los linfocitos OT-I totales correlacionó de forma negativa con la frecuencia de linfocitos Tex en el cultivo (Fig. 8E). De esta manera la expresión de CD73 se vincula más con los linfocitos Tpex que con los Tex.

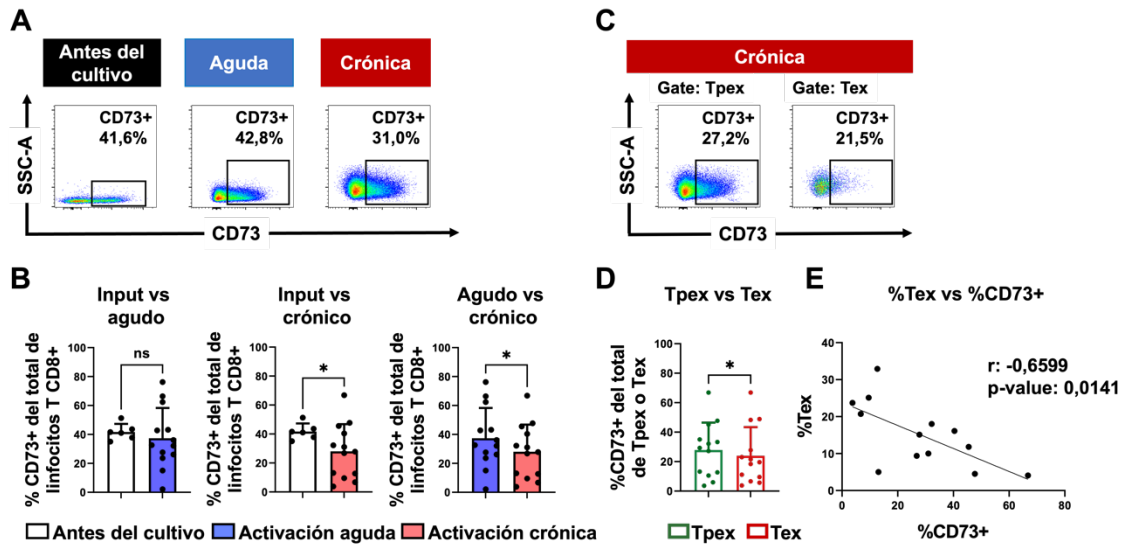


Figura 8. Los linfocitos T_{px} producidos mediante un cultivo de agotamiento *in vitro* tienen mayor expresión de CD73 que los linfocitos T_{ex}.

Linfocitos OT-I fueron activados por 5 días (activación crónica) o 2 días (activación aguda) con el péptido OT-I, en presencia de IL-7 e IL-15 y la expresión de CD73 en linfocitos T CD8⁺ fue evaluada a través de citometría de flujo. **A.** Citometría representativa de la expresión de CD73 en la población de linfocitos T CD8⁺ previo al cultivo y frente a estimulación aguda y crónica. **B.** Análisis estadístico del porcentaje de linfocitos T CD8⁺ CD73⁺ basal y frente a estimulación aguda y crónica, o entre ambos tipos de estimulación. **C.** Citometría de flujo representativa de la expresión de CD73 en linfocitos T_{px} y T_{ex} (definidos en base a la expresión de PD-1 y TIM3) generados por estimulación crónica *in vitro*. **D.** Análisis estadístico de la expresión de CD73 en células T_{px} y T_{ex}. **E.** Correlación entre el porcentaje de células CD73⁺ del total de linfocitos T CD8⁺ y la frecuencia de T_{ex} al final del cultivo. Para análisis de células antes del cultivo n=6. Para análisis de estimulación aguda, crónica, T_{px}, T_{ex} y análisis de correlación n=13. En **B** para comparaciones con células antes del cultivo se usó t-test no pareado con corrección de Welch y para comparar entre agudo y crónico se usó t test pareado. Para **D** se usó Wilcoxon. En **E** se muestra una regresión lineal simple con análisis de correlación de dos colas. * p ≤ 0,05 y ns= no significativo.

Para estudiar la cinética de expresión de CD73 durante la generación de T_{px} utilizamos el modelo de agotamiento *in vitro* con linfocitos OT-I vírgenes, ya que demostramos que en estas condiciones se producen casi únicamente linfocitos T_{px} y que la prolongación del cultivo hasta 7 días produce un pequeño porcentaje de T_{ex}. La expresión de CD73, se evaluó por citometría de flujo al día 0, 1, 2, 5 y 7 del protocolo de activación crónica con el péptido OT-I. En la Fig. 9A y 9B observamos que una fracción de los linfocitos OT-I vírgenes al inicio del protocolo de agotamiento expresan CD73 y que esta proporción aumenta con los

días de cultivo, llegando a una expresión de CD73 en casi en la totalidad de las células al día 5 del cultivo. Esto está de acuerdo con datos de la literatura para modelos de infección crónica, donde se ha descrito a CD73 como un marcador de linfocitos T_{pex} (Gebhardt et al., 2023; J. Lee et al., 2023). Por otro lado, a los 7 días de activación crónica, cuando aumenta la proporción de células con capacidad efectora (Ver fig. 7H) se observa una disminución en la expresión de CD73 respecto al día 5 (Fig. 9C). De esta forma, los resultados sugieren que la expresión de CD73 aumenta durante la generación de linfocitos T_{pex} solo cuando el cultivo se produce a partir de linfocitos OT-I vírgenes. En la Fig. 8B observamos que cuando se realiza el protocolo de agotamiento con linfocitos OT-I totales, al cabo de 5 días el porcentaje de células que expresa CD73 es cercano al 30%.

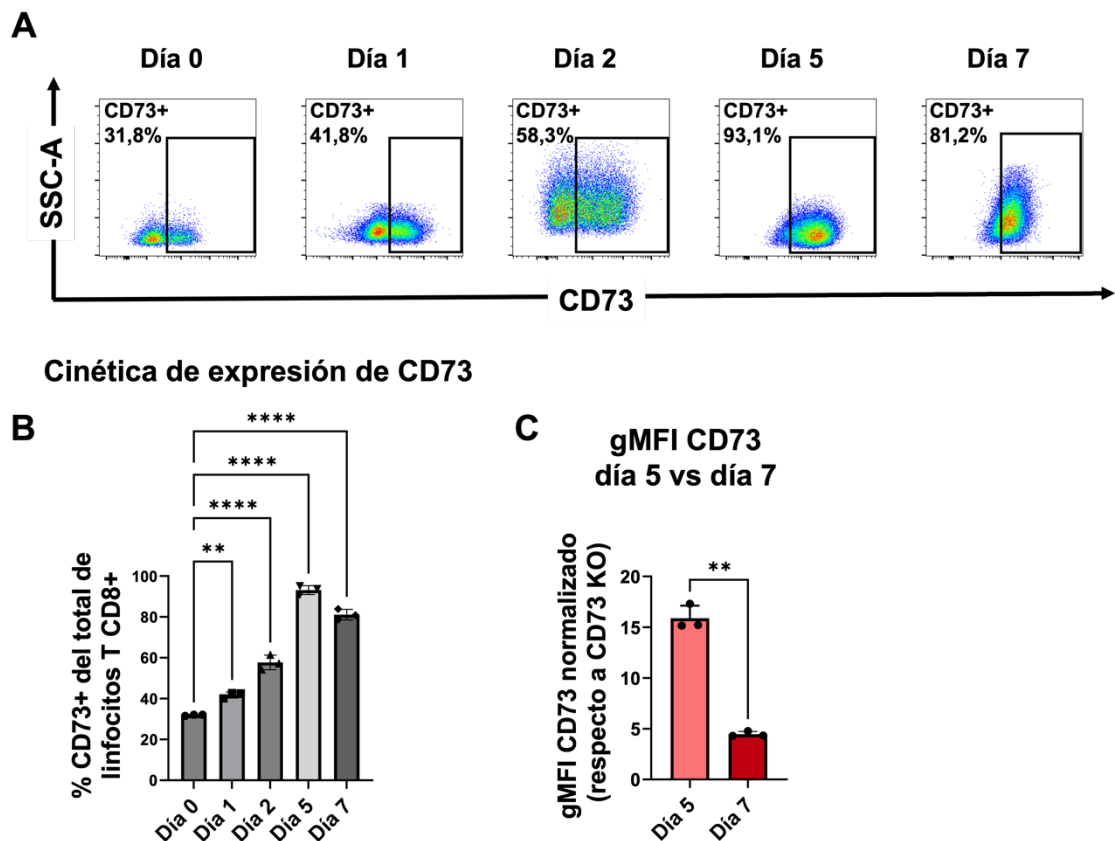


Figura 9. La expresión de CD73 aumenta durante la estimulación crónica *in vitro* de linfocitos T CD8⁺ vírgenes.

Linfocitos OT-I vírgenes fueron activados en forma crónica por 7 días en presencia de IL-7 e IL-15 y la expresión de CD73 en linfocitos T CD8+ fue evaluada a través de citometría de flujo. **A.** Citometría de flujo representativa de la expresión de CD73 en los linfocitos T CD8+ a distintos tiempos de la estimulación crónica *in vitro*. Las figuras corresponden a un concatenado de 3 muestras. **B.** Análisis del porcentaje de células CD73+ del total de linfocitos T CD8+ en los distintos tiempos de estimulación observados. **C.** Análisis estadístico de la expresión de CD73 en los linfocitos T CD8+ a nivel de gMFI normalizado entre los días 5 y 7 de estimulación. La normalización se realizó dividiendo el valor de gMFI de CD73 de cada muestra por un valor promedio de gMFI de CD73 en linfocitos OT-I que carecen de expresión de CD73 (CD73 KO) bajo los mismos periodos de estímulos. Para todos los análisis n=3. En **B** se usó un ANOVA de una vía ordinario con corrección de Bonferroni. En **C** se realizó un t-test pareado. ** $p \leq 0,01$ y **** $p \leq 0,0001$.

Habiendo determinado que CD73 se expresa durante el protocolo de agotamiento en los linfocitos T CD8+ *in vitro*, lo siguiente fue evaluar si su función como enzima productora de adenosina influye en el proceso de agotamiento. Para esto se realizó la activación crónica de linfocitos T CD8+ totales en presencia de 50 μ M de APCP, un inhibidor competitivo de la actividad enzimática de CD73 y se analizó el fenotipo de los linfocitos a través de citometría de flujo (Fig. 10). Como resultado, el uso de APCP no cambió significativamente la frecuencia de T_{pex} ni de T_{ex} en el cultivo respecto al control con el vehículo (Fig. 10A y B). El inhibidor tampoco cambió la frecuencia de expresión de CD73 en las células T CD8+ agotadas (Fig. 10C y D), ni la expresión de moléculas asociadas a troncalidad y agotamiento (datos no mostrados). No obstante, se observó un cambio leve en la expresión de la molécula de superficie asociada a activación CD25, siendo ligeramente mayor su expresión en linfocitos T CD8+ agotados expuestos a APCP respecto al vehículo (Fig. 10E). De esta manera, los datos sugieren que la capacidad productora de adenosina de CD73 en los linfocitos T

CD8+ no afecta la adquisición de fenotipos T_{pex} ni de T_{ex} en los linfocitos T CD8+ agotados *in vitro*.

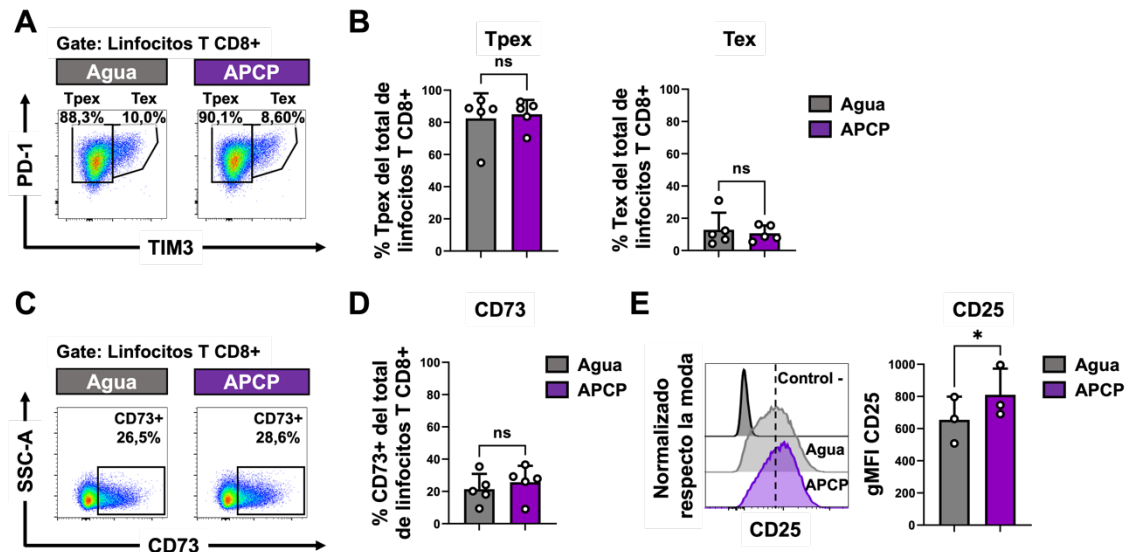


Figura 10. El agotamiento de los linfocitos T CD8+ *in vitro* es independiente de la capacidad productora de adenosina de CD73.

Linfocitos OT-I fueron activados en forma crónica por 5 días en presencia de IL-7 e IL-15 y de agua o del inhibidor enzimático de CD73 APCP (50 μ M). **A**. Citometría de flujo representativa del análisis de T_{pex} y T_{ex} dentro de la población de linfocitos T CD8+ en los cultivos con agua y APCP, y **B**. Análisis estadístico de los datos en **A**. **C**. Citometría de flujo representativa del análisis de expresión de CD73 en los linfocitos T CD8+ en los cultivos con agua y APCP, y **D**. Análisis estadístico asociado con **C**. **E**. Histograma representativo de la expresión de CD25 en los linfocitos T CD8+ activados crónicamente en presencia de agua y APCP (izquierda) y estadística asociada (derecha). En **E**, el histograma se realizó con un concatenado de 3 muestras para cada condición. Para análisis de T_{pex}, T_{ex} y CD73 n=5 en todas las condiciones. Para el análisis de gMFI de CD25, n=3. En **E**, el control negativo corresponde a un control de autofluorescencia de linfocitos OT-I activados crónicamente. En **E**, la línea punteada es solo una ayuda visual para ver la diferencia entre los picos de cada histograma. Análisis de T_{pex} con Wilcoxon y de T_{ex}, CD73 y CD25 con t test pareado. * p \leq 0,05 y ns= no significativo.

Otra forma de medir la contribución de CD73 en el agotamiento de linfocitos T CD8+ es a través de un *knock out* (KO) para CD73. Así, se estimularon de forma crónica linfocitos OT-I totales provenientes de un ratón silvestre (OT-I, WT, de *wild type*) o de un ratón OT-I CD73 KO. El análisis por citometría de flujo de los linfocitos OT-I previo al cultivo mostró que los ratones OT-I CD73 KO poseían tanto linfocitos T vírgenes como de memoria, sin encontrarse diferencias

significativas en la frecuencia de estas poblaciones entre linfocitos OT-I WT y CD73 KO (Fig. 11A y B). Además, previo al cultivo los OT-I CD73 KO carecían de moléculas asociadas al agotamiento y el marcador de activación CD25, mientras que expresaban moléculas asociadas a troncalidad, similar a las células OT-I WT (datos no mostrados). Sin embargo, los linfocitos OT-I CD73 KO presentaron frecuencias más bajas de células CD44+ (un indicador de células de memoria) que su contraparte WT (20,68% versus 29,37% respectivamente) (Fig. 11C). La activación crónica de los linfocitos OT-I CD73 KO resultó en cultivos con una cantidad de células por input similar al de su contraparte OT-I WT (Fig. 11D). No se observaron diferencias en porcentaje de T_{pex} entre células OT-I WT y OT-I CD73 KO (Fig. 11E y F). Tampoco se observaron diferencias significativas en la frecuencia de células que expresan las moléculas asociadas a troncalidad TCF1 y LY108, así como moléculas asociadas a la activación como CD25 o CD44 (datos no mostrados). Sin embargo, fue posible observar una menor frecuencia de T_{ex} en los cultivos con linfocitos OT-I CD73 KO respecto a los OT-I WT después de la estimulación crónica (Fig. 11E y F) lo que se confirma por un menor porcentaje de células TIM3+ en los linfocitos OT-I CD73 KO, (Fig. 11G). Así, los resultados sugieren que la expresión de CD73 es relevante para la formación de T_{ex} o de linfocitos más diferenciados durante la activación crónica de los linfocitos T CD8+ *in vitro*.

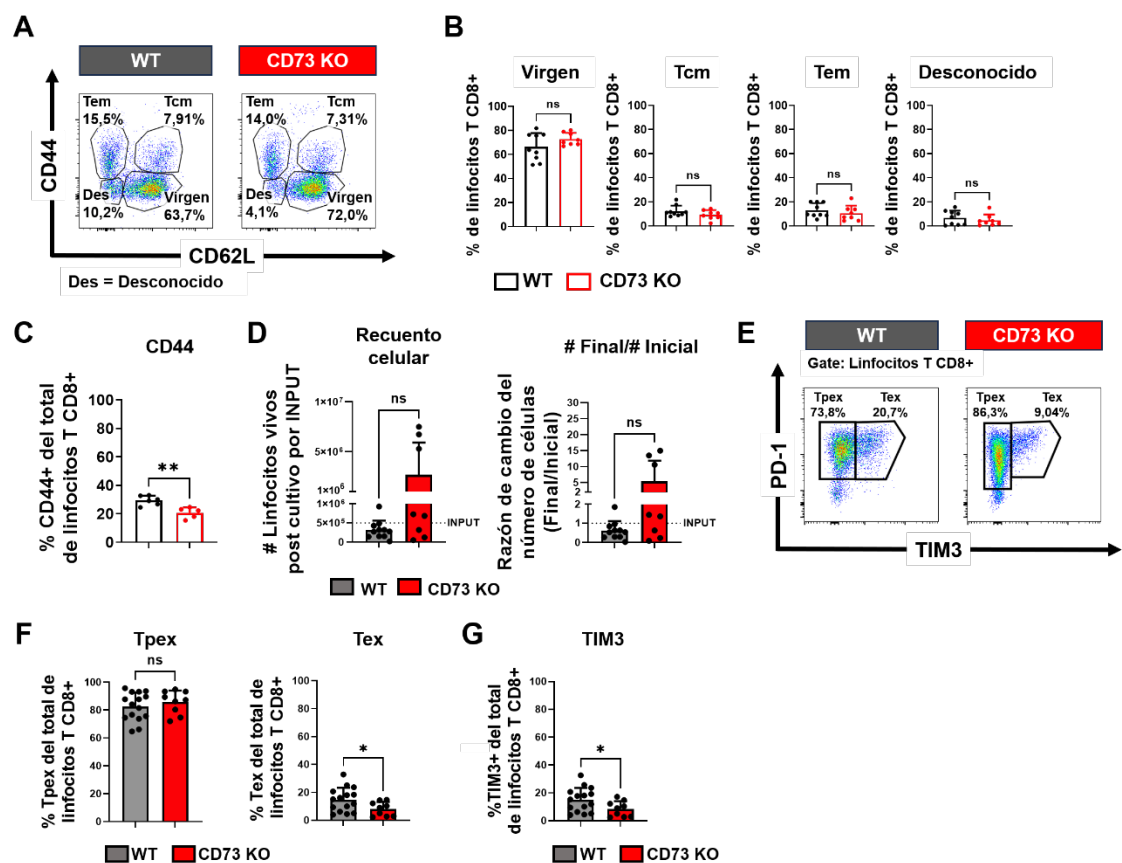


Figura 11. CD73 promueve la diferenciación de Tex *in vitro*.

Linfocitos OT-I WT u OT-I CD73 KO totales fueron activados *in vitro* en forma crónica por 5 días en presencia de IL-7 e IL-15. **A.** Citometría de flujo representativa de poblaciones de linfocitos T CD8+ vírgenes, Tem y Tcm dentro del total de linfocitos T CD8+ WT y CD73 KO. **B.** Análisis del porcentaje de linfocitos OT-I con fenotipo virgen, Tcm, Tem o desconocido del total de linfocitos T CD8+ WT y CD73 KO antes del cultivo de agotamiento. **C.** Análisis del porcentaje de células CD44+ del total de linfocitos OT-I WT y CD73 KO antes del cultivo de agotamiento. **D.** Número de linfocitos vivos OT-I WT o CD73 KO por INPUT de 5×10^5 células al final del cultivo de agotamiento (izquierda) y veces de cambio del número de células al final del cultivo versus el número inicial de células (derecha). **E.** Citometría de flujo representativa del análisis de Tpex y Tex del total de linfocitos OT-I WT y OT-I CD73 KO. **F.** Análisis del porcentaje de Tpex y Tex del total de linfocitos OT-I WT y OT-I CD73 KO. **G.** Análisis del porcentaje de células TIM3+ del total de linfocitos OT-I WT y CD73 KO. Para **B**, WT n=9, CD73 KO n=8, t-test no pareado con corrección de Welch para el análisis de células vírgenes y para el resto Mann-Whitney. En **C** WT n=6 y CD73 KO n=5. t-test no pareado. En **D**, WT n=11 y CD73 KO n=9, análisis con Mann-Whitney. En **F** y **G**, WT n=15 y CD73 KO n=9, tanto para Tpex como Tex y TIM3, t-test con corrección de Welch. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ y ns = no significativo.

Para profundizar en las diferencias que pueden existir entre los linfocitos OT-I WT y OT-I CD73 KO agotados, se realizó un RNAseq con muestras de ARN obtenidas de linfocitos OT-I WT y CD73 KO totales agotados *in vitro* (3 muestras independientes para cada tipo de linfocito) y sorteadas para descartar células muertas (Fig. 12). La integridad del ARN se verificó mediante un gel de electroforesis y las muestras de ARN se enviaron a secuenciar a la Unidad de Genómica y Bioinformática de la Universidad de Santiago de Chile. En colaboración con Dr. Villaman y el Dr. Martin de Fundación Ciencia & Vida, se realizó el análisis bioinformático de las muestras. Tanto las muestras de linfocitos OT-I WT como CD73 KO estaban enriquecidas en linfocitos T_{pex} luego del cultivo, y solo se observó una tendencia hacia una mayor frecuencia de linfocitos T_{ex} en las muestras WT respecto a las CD73 KO, ya que las diferencias no fueron significativas (Fig. 12A). Un análisis de valores atípicos indicó además que una muestra de ARN control se comportaba como un valor atípico. No obstante, el análisis de PCA de tres dimensiones de las muestras de ARN mostró que los linfocitos OT-I WT y OT-I CD73 KO agotados son diferentes transcripcionalmente entre sí, agrupándose en regiones separadas del gráfico (Fig. 12B), por lo que se decidió continuar con el análisis. A partir del análisis de expresión diferencial de genes utilizando 2 métodos de normalización distintos (EdgeR y DESeq2) se generó un gráfico representativo de los genes expresados diferencialmente entre células T CD8⁺ agotadas WT y CD73 KO (Fig. 12C). De esta manera se encontraron diferencias en 25 genes, donde 20 de estos se encontraron regulados positivamente en las células OT-I CD73 KO agotadas y los 5 restantes regulados negativamente respecto a las células OT-I WT agotadas. Con los genes detectados se realizó un análisis de vías funcionales, para entender cómo podrían afectar a las células las diferencias de expresión en los genes mencionados (Fig. 12D). En este análisis se graficaron vías funcionales asociadas a los genes diferencialmente expresados indicando su fuerza de enriquecimiento y el valor de significancia de este enriquecimiento (FDR). La lista de genes que se relaciona con las distintas funciones detectadas se muestra en

la Tabla 5. A mayor fuerza de enriquecimiento para una función, más proteínas del set de datos usados tienen dicha función (asumiendo que mayor cantidad de transcrito equivale a mayor cantidad de proteína, aunque no siempre es así). Así, una alta fuerza de enriquecimiento puede indicar que varios de los genes de la lista de genes expresados diferencialmente se relacionan con una función o que uno o pocos genes de dicha lista se relacionan con una función, pero tienen una expresión alta o muy relevante. Así, se determinó que el mayor enriquecimiento funcional se encontró para la respuesta a interferones de tipo I y, por otro lado, que la mayoría de las funciones detectadas se relacionaban con la activación de la respuesta inmune por distintos estímulos y la defensa a patógenos (Fig. 12D). Además, algunas de las observaciones presentadas para los linfocitos CD73 KO en la literatura y que, por ende, se esperarían encontrar en el análisis de RNAseq no se encontraron. Entre los cambios esperados y que no se observaron se encuentran los genes relacionados al metabolismo de la glucosa como los asociados a la hexoquinasa II o GLUT-1, genes asociados a la supervivencia como el gen de la proteína Bcl-2 o genes asociados al agotamiento como los genes de las proteínas PD-1, LAG-3 o CD39, que en estudios previos de nuestro laboratorio se vieron diferencialmente expresados entre WT y CD73 KO (Briceño et al., 2021). Esto se puede deber a las condiciones del medio en el que se cultivaron los linfocitos T CD8+ que son distintas a las de los estudios en la literatura y también la presencia del valor atípico en el análisis podría estar acotando el número de genes diferencialmente expresado real. Tampoco se encontraron diferencias en la expresión de CD73. Esto se puede deber a que, según las especificaciones de la cepa usada, los ratones CD73 KO, pese a no tener una proteína funcional detectable, aún expresan un transcrito del gen de CD73 más corto en un 10% del nivel de expresión en WT, lo que podría estar siendo detectado en el RNAseq. Así, en resumen, el análisis transcriptómico sugiere una función efectora y respuesta a interferones de tipo I mejorada en los linfocitos OT-I CD73 KO con respecto a las células OT-I WT, lo que podría indicar

un estado de menor agotamiento en las células OT-I CD73 KO respecto a las células OT-I WT.

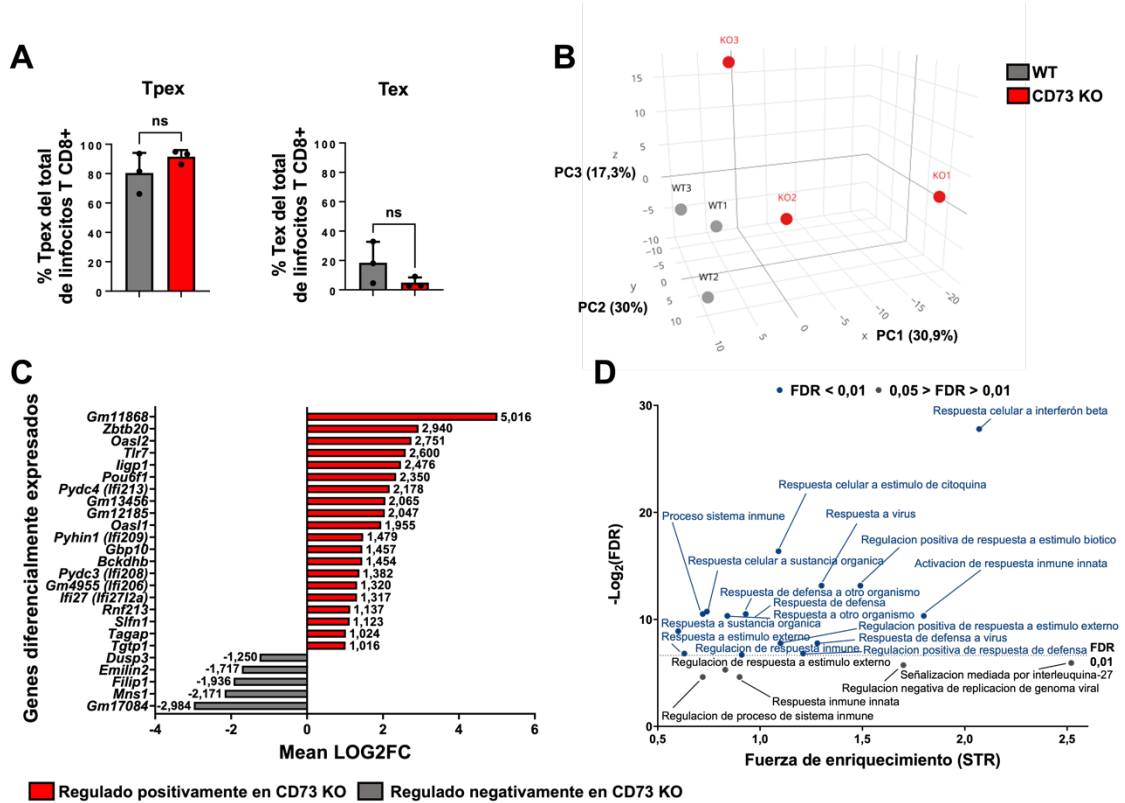


Figura 12. CD73 limita el potencial efector de los linfocitos T CD8+ durante el agotamiento *in vitro*.

Análisis a través de RNAseq de muestras de ARN provenientes de linfocitos vivos OT-I WT y OT-I CD73 KO totales agotados *in vitro*. **A**. Porcentaje de células TpeX y Tex generadas a partir de los linfocitos OT-I WT y OT-I CD73 KO. **B**. Análisis de PCA tridimensional de las muestras de ARN analizadas. **C**. Análisis de los genes expresados diferencialmente entre linfocitos OT-I WT y OT-I CD73 KO agotados *in vitro*. **D**. Análisis de vías funcionales asociada a los genes expresados diferencialmente entre linfocitos OT-I WT y OT-I CD73 KO. En **A**, n= 3 para WT y CD73 KO, t-test no pareado y ns= no significativo.

Tabla 5. Lista de genes asociados a los términos de ontología génica (Gene ontology, GO) con enriquecimiento funcional.

Términos GO	Genes
Respuesta celular a interferón beta.	<i>ligp1, Ifi209, Tgtp1, Ifi208, Gm12185, Ifi213, Ifi206.</i>
Respuesta celular a estímulo de citoquina.	<i>Oasl2, ligp1, Ifi209, Gbp10, Tgtp1, Ifi208, Gm12185, Ifi213, Oasl1, Ifi206.</i>
Regulación positiva de respuesta a estímulo biótico.	<i>Ifi209, Ifi208, Ifi213, Oasl1, Ifi206, Emilin2.</i>
Respuesta a virus.	<i>Oasl2, Tagap, Ifi2712a, Tgtp1, Oasl1, Tlr7, Ifi206.</i>
Respuesta celular a sustancia orgánica.	<i>Oasl2, ligp1, Ifi209, Gbp10, Tgtp1, Ifi208, Gm12185, Ifi213, Dusp3, Oasl1, Zbtb20, Ifi206.</i>
Proceso sistema inmune.	<i>Oasl2, ligp1, Sifn1, Ifi209, Gbp10, Tgtp1, Ifi208, Rnf213, Ifi213, Oasl1, Tlr7, Ifi206.</i>
Respuesta de defensa a otro organismo.	<i>Oasl2, ligp1, Tagap, Gbp10, Tgtp1, Rnf213, Oasl1, Tlr7, Ifi206.</i>
Activación de respuesta inmune innata.	<i>Ifi209, Ifi208, Ifi213, Ifi206.</i>
Respuesta de defensa.	<i>Oasl2, ligp1, Tagap, Gbp10, Tgtp1, Rnf213, Gm12185, Oasl1, Tlr7, Ifi206.</i>
Respuesta a otro organismo.	<i>Oasl2, ligp1, Tagap, Ifi2712a, Gbp10, Tgtp1, Rnf213, Oasl1, Tlr7, Ifi206.</i>
Respuesta a sustancia orgánica.	<i>Oasl2, ligp1, Ifi209, Gbp10, Tgtp1, Ifi208, Gm12185, Ifi213, Dusp3, Oasl1, Zbtb20, Ifi206, Bckdhh.</i>
Regulación positiva de respuesta a estímulo externo.	<i>Ifi209, Ifi208, Ifi213, Oasl1, Ifi206, Emilin2.</i>
Respuesta de defensa a virus.	<i>Oasl2, Tagap, Oasl1, Tlr7, Ifi206.</i>
Respuesta a estímulo externo.	<i>Oasl2, ligp1, Tagap, Ifi2712a, Gbp10, Tgtp1, Rnf213, Oasl1, Tlr7, Ifi206, Bckdhh.</i>
Regulación positiva de respuesta de defensa	<i>Ifi209, Ifi208, Ifi213, Ifi206, Emilin2.</i>
Regulación de respuesta inmune.	<i>Ifi209, Ifi208, Ifi213, Dusp3, Oasl1, Tlr7, Ifi206.</i>
Señalización mediada por interleuquina-27.	<i>Oasl2, Oasl1.</i>
Regulación negativa de replicación de genoma viral.	<i>Oasl2, Oasl1, Ifi206.</i>
Regulación de respuesta a estímulo externo.	<i>Ifi209, Ifi208, Ifi213, Dusp3, Oasl1, Ifi206, Emilin2.</i>
Regulación de proceso de sistema inmune.	<i>Sifn1, Ifi209, Ifi208, Ifi213, Dusp3, Oasl1, Tlr7, Ifi206.</i>
Respuesta inmune innata.	<i>Oasl2, ligp1, Gbp10, Tgtp1, Oasl1, Tlr7.</i>

Debido a que los linfocitos OT-I CD73 KO presentaron frecuencias más bajas de células CD44+ (un indicador de células de memoria) que su contraparte WT (Fig. 11C), y que los resultados de este trabajo sugieren que las poblaciones de memoria iniciales influyen en la generación de células Tex (ver Fig. 7), las diferencias en agotamiento entre células OT-I WT y OT-I CD73 KO agotadas *in vitro* observadas podrían estar influenciadas por la composición inicial de las células utilizadas en los cultivos. Para analizar esta posibilidad se realizó el agotamiento *in vitro* de linfocitos T CD8+ vírgenes WT y CD73 KO y posteriormente se analizó el fenotipo de los linfocitos T CD8+ a través de citometría de flujo. Considerando la baja frecuencia de linfocitos Tex que se forman con este método se revisó además la capacidad de producir citoquinas que adquieren los linfocitos al día 7 del cultivo como indicador de avance de la

diferenciación. Así, como producto del cultivo, tanto linfocitos OT-I WT como OT-I CD73 KO originaron principalmente linfocitos T_{pex} y no se encontraron diferencias en el porcentaje de T_{ex} con 5 o 7 días de activación crónica (Fig. 13A y B). Tampoco se encontraron diferencias en la expresión de otras moléculas asociadas al agotamiento o troncalidad (datos no mostrados). Así mismo, la capacidad de producir citoquinas efectoras no varió significativamente entre células OT-I WT y OT-I CD73 KO con 5 días de activación con el péptido OT-I (Fig. 13C y D). No obstante, luego de 7 días de activación, los linfocitos T OT-I CD73 KO demostraron una menor capacidad para producir las moléculas efectoras IFN γ y TNF α (Fig. 13E y F). Considerando que no hubo aumento de otros marcadores de agotamiento en linfocitos OT-I CD73 KO al día 7 del estímulo crónico ni aumento de frecuencia de linfocitos T_{ex} en relación a las células WT, los resultados sugieren que CD73 promueve la diferenciación de los linfocitos T_{pex} hacia células agotadas con la capacidad para producir citoquinas efectoras.

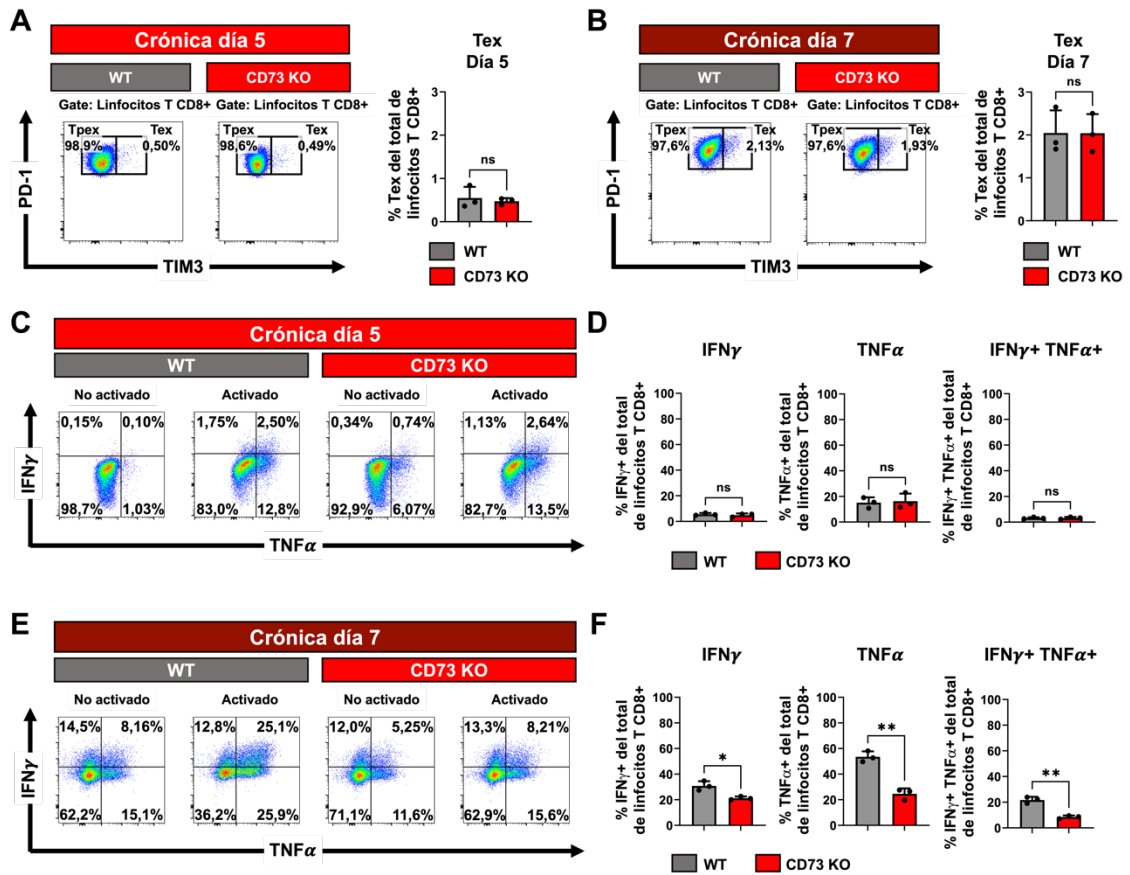


Figura 13. CD73 promueve la formación de linfocitos T CD8+ agotados productores de citoquinas efectoras.

Linfocitos OT-I vírgenes WT y CD73 KO fueron activados *in vitro* con péptido OT-I por 5 o 7 días para inducir agotamiento. El fenotipo y potencial efector fueron evaluados a través de citometría de flujo. **A** y **B** Citometría de flujo representativa (izquierda) del análisis de poblaciones Tex y TpeX de células OT-I WT y OT-I CD73 KO agotadas *in vitro* por 5 (**A**) y 7 (**B**) días. El porcentaje de Tex del total de linfocitos OT-I con cada periodo de agotamiento se muestra a la derecha (**A** y **B**). Las citometrías corresponden a un concatenado de 3 muestras. **C-F**. Los linfocitos T CD8+ WT y CD73 KO agotados *in vitro* por 5 o 7 días fueron reestimulados con péptido en presencia de Brefeldin A para medir el potencial efector a través de citometría de flujo. **C-F**. Reestimulación con péptido OT-I en presencia de Brefeldina A de los linfocitos T CD8+ WT y CD73 KO agotados *in vitro* por 5 días (**C** y **D**) y por 7 días (**E** y **F**). **No activado** es en ausencia de reestímulo mientras que **activado** es en presencia de un reestímulo. **C** y **E**. Son citometrías de flujo representativas mostrando la expresión de IFN γ y TNF α en los linfocitos OT-I WT y CD73 KO agotados por 5 (**C**) o 7 (**E**) días luego de un reestímulo **D** y **F**. Análisis del porcentaje de células IFN γ + (izquierda), TNF α (centro) o que expresan ambas citoquinas (derecha) del total de linfocitos OT-I WT y OT-I CD73 KO de lo mostrado en **C** y **E**. n=3 y t-test no pareado. * p \leq 0,05, ** p \leq 0,01, y ns= no significativo.

En conjunto los resultados sugieren por un lado que la expresión de CD73 aumenta en la formación de linfocitos T_{pex} y disminuye con el avance del agotamiento de estas células *in vitro*, y, por otro lado, que CD73 podría tener un papel en los linfocitos T CD8⁺ necesario para la adquisición de estados más diferenciados en cultivo que es independiente de su función productora de adenosina.

Objetivo 1.3. Evaluar el papel de la señalización de adenosina en la generación, diferenciación y fenotipo de las poblaciones de linfocitos T CD8⁺ agotados (T_{ex}) y precursoras agotadas (T_{pex}) generados *in vitro*.

Para cumplir con este subobjetivo, primero evaluamos la expresión del receptor de adenosina A2AR en los linfocitos agotados obtenidos *in vitro*. Actualmente existe una carencia de anticuerpos comerciales contra A2AR efectivos para citometría de flujo o *Western blot*, por lo tanto, evaluamos los diferentes receptores de adenosina (A2AR, A2BR, A3R y A1R) a través de RNAseq en muestras de linfocitos OT-I WT y CD73 KO agotados *in vitro*. En la Fig. 14A observamos que tanto linfocitos OT-I WT como CD73 KO expresan principalmente el gen de A2AR (*Adora2a*), tienen una baja expresión del gen de A2BR (*Adora2b*) y una expresión baja del gen de A3R (*Adora3*). No se detectó expresión del gen de A1R. Además, la expresión de A2AR, A2BR y A3R se confirmó a través de PCR en tiempo real de muestras de ARN de linfocitos T CD8⁺ vírgenes WT y CD73 KO agotados *in vitro* por 5 días (Fig. 14B). El análisis de las muestras de ARN indicadas fue realizado por Catalina Rodríguez Bascuñan del laboratorio de Inmunología de la Universidad de Chile. Como resultado, y de manera similar a los resultados con el RNAseq, se observó principalmente expresión de *Adora2a* y niveles bajos de *Adora2b* y *Adora3* tanto en células OT-I WT como OT-I CD73 KO. Sin embargo, a través de este método se detectó una regulación negativa de *Adora2a* significativa en los linfocitos T CD8⁺ CD73 KO agotados *in vitro* (Fig. 14B). Así, los linfocitos WT y CD73 KO agotados *in vitro* son potencialmente susceptibles a la adenosina extracelular y,

por otro lado, esta sensibilidad es potencialmente menor en los linfocitos CD73 KO.

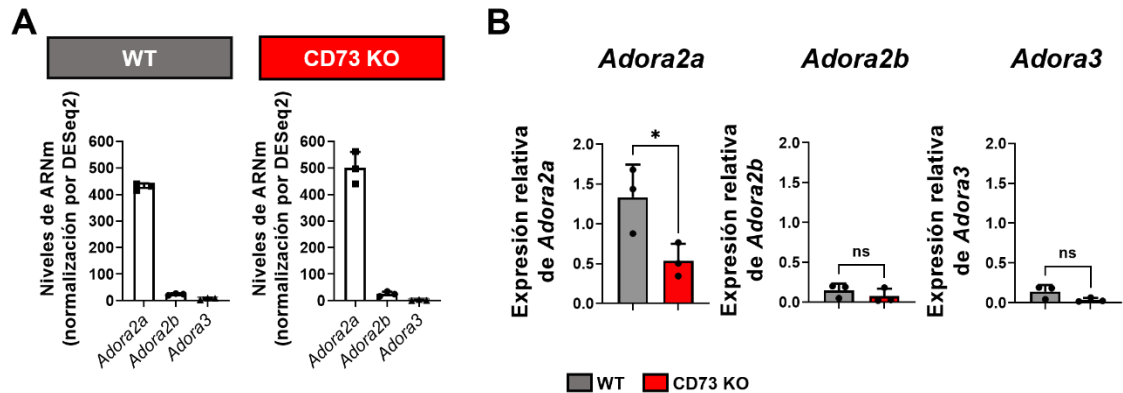


Figura 14. Los linfocitos T CD8+ agotados *in vitro* expresan mayoritariamente *Adora2a*.

Análisis de la expresión de los receptores de adenosina en linfocitos T CD8+ WT y CD73 KO agotados *in vitro*. **A.** Expresión de *Adora2a* (A2AR), *Adora2b* (A2BR) y *Adora3* (A3R) evaluada mediante RNAseq en muestras de células T CD8+ totales, WT y CD73 KO agotadas *in vitro*, **B.** Expresión de receptores de adenosina evaluados por PCR en tiempo real de linfocitos OT-I vírgenes WT y CD73 KO agotados *in vitro* por 5 días. La cuantificación relativa indicada de la expresión de *Adora2a* (A2AR), *Adora2b* (A2BR) y *Adora3* (A3R) en linfocitos vírgenes agotados *in vitro* es relativa la expresión basal del gen respectivo en células vírgenes sin activar. n=3 y t-test no pareado. * $p \leq 0,05$ y ns = no significativo.

A continuación, se decidió estudiar el efecto de agonistas y antagonistas del receptor A2AR en el proceso de agotamiento *in vitro* de los linfocitos OT-I, a través de citometría de flujo. Para esto, linfocitos OT-I totales se activaron crónicamente en presencia de distintas concentraciones del análogo de adenosina NECA (agonista inespecífico de A2AR), CGS-21680 (agonista específico de A2AR, CGS) y SCH58261 (antagonista específico de A2AR, SCH). En todas las condiciones estudiadas fue posible observar las poblaciones T_{pex} y T_{ex}, y un ANOVA de una vía no encontró diferencias significativas en la frecuencia de células T_{pex} ni tampoco en T_{ex} entre las distintas condiciones (Fig. 15A-C). No obstante, el análisis individual entre el control (DMSO) y el grupo de células agotadas en presencia de 10 μ M de CGS sí mostró una disminución en la frecuencia de T_{ex} con el uso de CGS (Fig. 15C). Por otro lado, el uso de SCH a

0,1 μM disminuyó el número de células al final del cultivo relativo al control, mientras que los agonistas no influyeron significativamente en este número (Fig. 15D). Así, los datos sugieren que la activación específica del receptor A2AR disminuye la formación de Tex, mientras que el bloqueo específico de dicho receptor afecta el número de células obtenidas al final del cultivo.

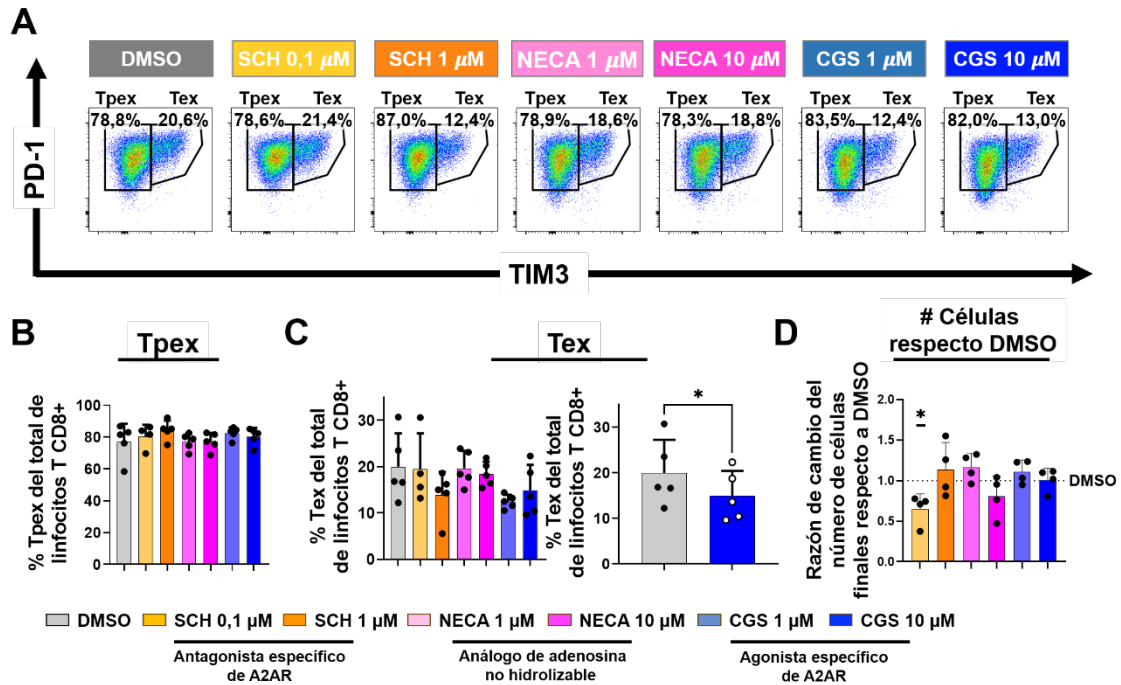


Figura 15. La señalización de adenosina mediada por A2AR durante el agotamiento de los linfocitos T CD8+ *in vitro* reduce la formación de Tex.

Linfocitos OT-I agotados *in vitro* en presencia de DMSO (control vehículo), 1 o 10 μM de NECA, 1 o 10 μM de CGS-21680 y 0,1 o 1 μM de SCH58261 fueron analizados a través de citometría de flujo. **A.** Figura representativa del análisis de poblaciones Tpex y Tex en los linfocitos T CD8+ luego de los distintos cultivos. Las figuras se hicieron con un concatenado de 3 muestras para cada condición. **B.** Porcentaje de Tpex del total de linfocitos T CD8+ totales en cada condición. **C.** Porcentaje de Tex del total de linfocitos T CD8+ totales en cada condición (izquierda) y comparación del porcentaje de Tex en las muestras con DMSO y con 10 μM de CGS (derecha). **D.** Veces de cambio del número de células al final del cultivo con los distintos reactivos estudiados respecto al número de células finales en la condición control a un mismo INPUT (5×10^5 células). $n=4$ para SCH 0,1 μM y $n=5$ para el resto de las condiciones. En **B** y **C**, en la estadística del porcentaje de Tpex y Tex con todas las condiciones se usó un t-test de ANOVA de una vía ordinario con corrección de Bonferroni. En **C**, en la comparación del porcentaje de Tex entre la condición con DMSO y con 10 μM de CGS se usó un t-test pareado. En **D** se usó un t-test de una muestra, comparando contra un valor teórico 1 que representa el valor de la razón para el control DMSO. En **D**, solo se usó $n=4$ debido a que la quinta

réplica experimental resultó con un número de células de entre 13,19 a 28,28 veces más bajo que el promedio de cada condición estudiada, con excepción de SCH 0,1 μ M que no se evaluó en esta réplica. * $p \leq 0,05$.

A continuación, se estudió el efecto de los fármacos sobre la expresión de moléculas asociadas a la troncalidad en linfocitos T CD8+ agotados *in vitro*. Entre las moléculas estudiadas estaba CD73 ya que previamente nuestro laboratorio demostró que la expresión de CD73 se vincula con estados troncales tales como el de célula virgen o de memoria, y, por otro lado, disminuye su expresión con la diferenciación (Flores-Santibáñez et al., 2015). Así, se observó que el uso de los agonistas en cualquiera de las concentraciones estudiadas aumentó el porcentaje de células CD73+ en los linfocitos T CD8+ agotados *in vitro* relativo al control (Fig. 16A). Estudios previos ya habían reportado que con NECA o CGS-21680 otras células inmunes incrementan la expresión de CD73 (Al-Taei et al., 2017; Bao et al., 2016). En cuanto a otras moléculas asociadas a troncalidad, fue posible observar que los agonistas durante el agotamiento *in vitro* de los linfocitos T CD8+ aumentaron el porcentaje de células CD62L+ dentro de esta población al final del cultivo (Fig. 16B). Sin embargo, los agonistas no incrementaron la expresión de TCF1 ni LY108 (Fig.16C y D), incluso la expresión de TCF1 se redujo levemente con el uso de NECA 1 μ M relativo al control (Fig. 16C). Esta reducción significativa en la expresión de TCF1 en los linfocitos T CD8+ agotados no se observó con el uso de agonista específico de A2AR CGS (Fig. 16C). Por otro lado, SCH no afectó de manera significativa la expresión de ninguno de los marcadores estudiados, aunque se observó una tendencia al aumento de expresión de LY108 cuando fue usado a 1 μ M relativo al control (Fig. 16D). Así, la activación del receptor A2AR aumentó el porcentaje de células CD73+ y CD62L+ en linfocitos T CD8+ durante su agotamiento *in vitro*.

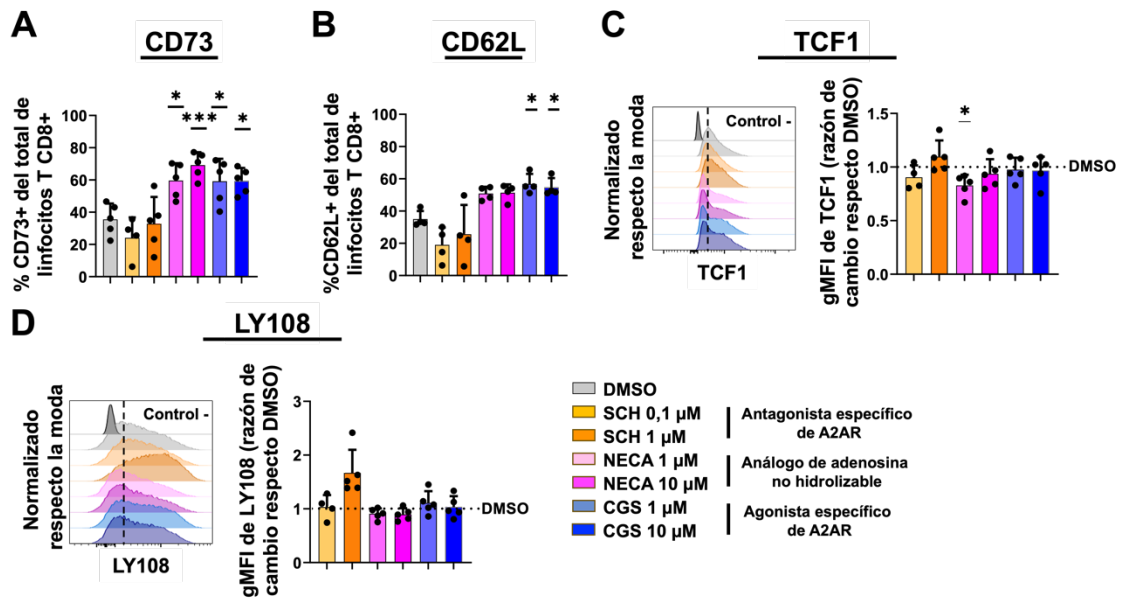


Figura 16. La señalización de adenosina mediada por A2AR durante el agotamiento de linfocitos T CD8+ *in vitro* promueve la expresión de CD73 y CD62L.

Análisis por citometría de flujo de la expresión de moléculas asociadas a troncalidad en linfocitos T CD8+ agotados *in vitro* en presencia de DMSO (control vehículo), 1 o 10 μM de NECA, 1 o 10 μM de CGS-21680 y 0,1 o 1 μM de SCH58261. **A** y **B**. Porcentaje de células CD73+ (**A**) y CD62L+ (**B**) del total de linfocitos T CD8+ expuestos a los distintos fármacos. **C**. Histograma representativo de la expresión de TCF1 (izquierda) y veces de cambio del gMFI de TCF1 de cada condición respecto al control (derecha). **D**. Histograma representativo de la expresión de LY108 (izquierda) y veces de cambio del gMFI de LY108 de cada condición respecto al control (derecha). Los histogramas se realizaron comparando concatenados de 3 muestras tratadas con las respectivas condiciones y contra una muestra control. El control negativo de TCF1 corresponde a una muestra con todos los anticuerpos menos αTCF1 mientras que el control negativo de LY108 corresponde a una autofluorescencia de linfocitos T CD8+ agotados *in vitro*. En **A**, **C** y **D** $n=4$ para SCH 0,1 μM y $n=5$ para el resto de las condiciones. En **B**, $n=4$ para todas las condiciones. **A** y **B**, ANOVA de una vía con corrección de Bonferroni. En **C** se usó un t-test de una muestra, mientras que en **D** se ocupó un test de Wilcoxon de una muestra, en ambos casos comparando contra un valor teórico 1, que representa el valor que resulta de dividir el gMFI de TCF1 o de LY108 en la condición DMSO respecto al número de células de la condición control DMSO. * $p \leq 0,05$ y *** $p \leq 0,001$.

Lo siguiente que se decidió estudiar fue el efecto de los fármacos en el estado de activación de los linfocitos T CD8+ agotados *in vitro*. Para esto se analizó la expresión de las moléculas asociadas a activación CD69, CD25 y CD44 en los linfocitos T CD8+ al final del cultivo. Así, con el uso del antagonista específico de A2AR, SCH (0,1 μM) se observó un aumento en la expresión de CD69 y CD25

en los linfocitos T CD8⁺ relativo al control (Fig. 17A y B). Por otro lado, mientras el uso del análogo de adenosina NECA a 1 μ M solo redujo la expresión de CD44 relativo al control, el uso del agonista específico de A2AR CGS a 10 μ M provocó una disminución en la expresión de todas las proteínas estudiadas (Fig. 17A-C). Este efecto no se observó con CGS a 1 μ M, ya que en esta condición solo se redujo significativamente la expresión de CD44 (Fig. 17C). De esta manera, los resultados sugieren que la activación de la señalización de adenosina por medio de A2AR disminuye el estado de activación de los linfocitos T CD8⁺ sometidos a un estímulo crónico *in vitro*.

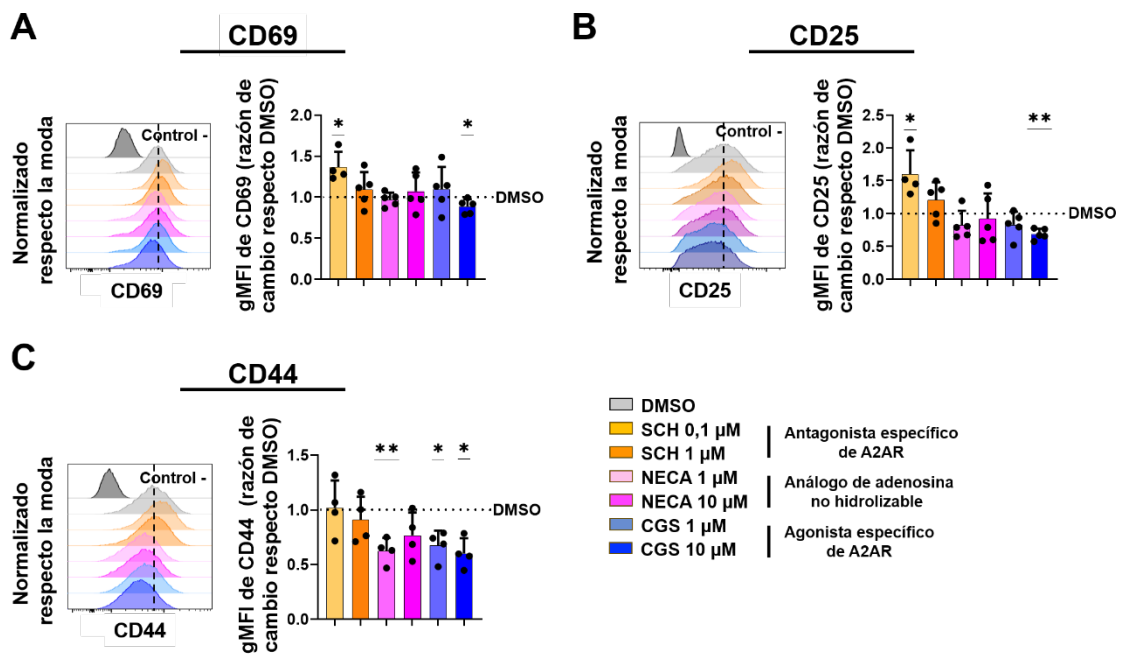


Figura 17. La señalización de adenosina mediada por A2AR durante el agotamiento de linfocitos T CD8⁺ *in vitro* disminuye su estado de activación.

Análisis por citometría de flujo de la expresión de moléculas asociadas a activación en linfocitos T CD8⁺ agotados *in vitro* en presencia de DMSO (control vehículo), 1 o 10 μ M de NECA, 1 o 10 μ M de CGS-21680 y 0,1 o 1 μ M de SCH58261. **A.** Histograma representativo de la expresión de CD69, CD25 (**B**) o CD44 (**C**) (izquierda) y veces de cambio del gMFI de estas proteínas de cada condición respecto al control (derecha). Los histogramas se realizaron comparando concatenados de 3 muestras tratadas con las respectivas condiciones y contra una muestra control. El control negativo corresponde a una autofluorescencia de linfocitos T CD8⁺ agotados *in vitro*. En **A** y **B**, n=4 para SCH 0,1 μ M y n=5 para el resto de las condiciones. En **C**, n=4 para todas las condiciones.

Todos los análisis se hicieron con un t-test de una muestra comparando contra un valor teórico 1, que representa el valor que resulta de dividir el gMFI de CD69, CD25 y CD44 en la condición DMSO respecto al mismo gMFI en la condición control DMSO. * $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$.

Finalmente, se decidió estudiar el efecto de los fármacos en la expresión de moléculas asociadas al agotamiento de los linfocitos T CD8+ *in vitro*. Las principales diferencias observadas fueron en la expresión del factor maestro del agotamiento TOX y en el receptor inhibitorio PD-1 al utilizar agonistas del receptor A2AR durante el agotamiento *in vitro* de los linfocitos T CD8+ (Fig. 18). En relación con el uso de NECA, fue posible observar una reducción de TOX relativa al control cuando se aplicó el fármaco a una concentración de 1 μM (Fig. 18A). Mientras que el uso de CGS-21680 en las 2 concentraciones probadas disminuyó la expresión de TOX y PD-1 relativo al control (Fig. 18A y B). Así, los resultados sugieren que la señalización de adenosina por medio de A2AR disminuye el agotamiento de los linfocitos T CD8+ al reducir la expresión de TOX y PD-1.

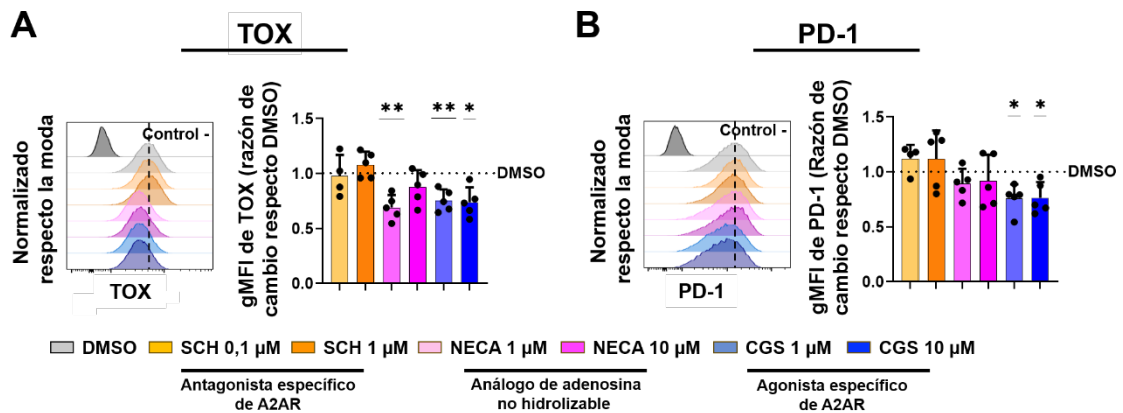


Figura 18. La señalización de adenosina mediada por A2AR durante el agotamiento *in vitro* de linfocitos T CD8+ inhibe la expresión de TOX y PD-1.

Análisis por citometría de flujo de la expresión de moléculas asociadas al agotamiento en linfocitos T CD8+ agotados *in vitro* en presencia de DMSO (control vehículo), 1 o 10 μM de NECA, 1 o 10 μM de CGS-21680 y 0,1 o 1 μM de SCH58261. **A.** Histograma representativo de la expresión de TOX y **B.** PD-1 (izquierda), y veces de cambio del gMFI de estas proteínas de cada condición respecto al control (derecha). Los histogramas se realizaron comparando concatenados de 3 muestras tratadas con las respectivas condiciones y contra una muestra control. El control negativo de TOX corresponde a una muestra con todos los anticuerpos menos TOX mientras que el control negativo de PD-1 corresponde a una muestra que solo tuvo anticuerpos de superficie menos $\alpha\text{PD-1}$. En

A y B, n=4 para SCH 0,1 μ M y n=5 para el resto de las condiciones. Todos los análisis se hicieron con un t-test de una muestra comparando contra un valor teórico 1, que representa el valor que resulta de dividir el gMFI de TOX o PD-1 en la condición DMSO respecto al mismo gMFI en la condición control DMSO. * $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$.

En conjunto los resultados sugieren que los linfocitos T CD8+ agotados *in vitro* expresan principalmente el receptor de adenosina A2AR y que su señalización reduce el estado de activación y agotamiento mientras que promueve la expresión de moléculas asociadas a un estado más troncal.

Objetivo 2. Analizar el papel de CD73 y de la señalización de adenosina por medio de A2AR en la diferenciación de linfocitos T CD8+ agotados y precursores agotados en el nicho tumoral.

Los resultados obtenidos relativos al objetivo 2 se dividen en 3 actividades, las cuales se presentan a continuación:

Objetivo 2.1. Identificar a las poblaciones agotadas (Tex) y precursoras agotadas (Tpex) en el nicho tumoral y estudiar la expresión de CD73 en estas poblaciones.

Para evaluar los roles de CD73 y de la adenosina en el proceso de agotamiento de los linfocitos T CD8+ *in vivo*, utilizamos el modelo de melanoma murino B16.OVA, en el cuál las células tumorales expresan ovoalbúmina. Este modelo permite estudiar la activación de linfocitos T CD8+ específicos contra ovoalbúmina. Para esto se inyectaron ratones C57BL/6 por vía intradérmica (i.d.) con 5×10^5 células B16.OVA para posteriormente analizar por citometría de flujo el estado de agotamiento de los linfocitos T CD8+ presentes en el nicho tumoral o en el bazo (Fig. 19A). La Fig. 19B muestra que los linfocitos T CD8+ intratumorales presentan distintos grados de agotamiento, incluyendo poblaciones Tpex, Tint (PD-1+ TIM3- TCF1- TOX+) y Tex. Al igual que lo observado *in vitro*, la expresión de CD73 se relacionó principalmente con poblaciones Tpex, observándose expresión de CD73 en la mayoría de estas células (Fig. 19C y D). Por otro lado, CD73 se expresa en un 37,37% de la

población Tint y en un 38,12% de la población Tex (Fig. 19C y D) mientras que casi la totalidad de los linfocitos Tpex expresan CD73 *in vivo*.

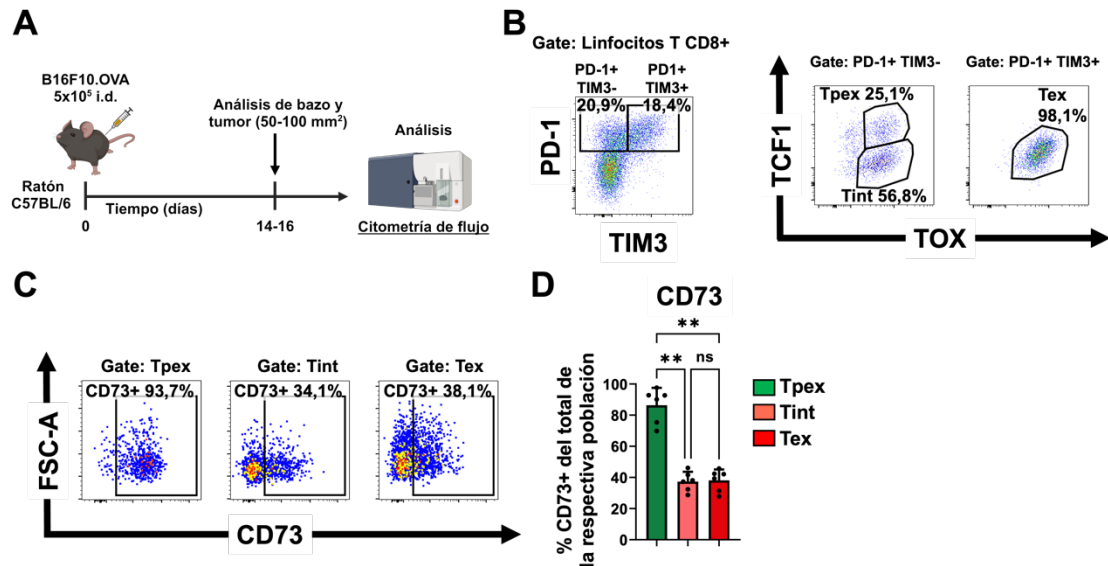


Figura 19. Expresión de CD73 en linfocitos T CD8+ presentes en el nicho tumoral y con diferentes grados de agotamiento.

Ratones C57/BL6 se inyectaron *i.d.* con 5×10^5 células del melanoma B16.OVA y se disectó el tumor cuando tenía un tamaño de $50-100 \text{ mm}^2$ y las células se recuperaron tal como se señala en Materiales y Métodos, sección 2.3. **A.** Esquema experimental. **B.** Citometría de flujo representativa del análisis de linfocitos Tpex, Tex y Tint intratumorales. **C.** Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD73 en linfocitos T CD8+ agotados Tpex, Tint y Tex. Se muestra una figura representativa. **D.** Análisis del porcentaje de células CD73+ del total de linfocitos Tpex, Tint y Tex. Las citometrías de flujo mostradas en **B** y **C** corresponden a un concatenado de 4 muestras de tumor. En **D** $n=6$ y ANOVA de una vía de medidas repetidas con corrección de Bonferroni. ** $p \leq 0,01$ y ns = no significativo.

Las poblaciones de células T CD8+ intratumorales y en bazo se evaluaron mediante un análisis de reducción de dimensionalidad t-SNE de los datos de citometría de tumor y bazo, y posteriormente se hizo un análisis de agrupamiento a través del algoritmo DBSCAN (Fig. 20). Con el t-SNE se generó un mapa de densidad que incluye linfocitos T CD8+ de bazo y tumor (Fig. 20A). En este mapa se muestran los distintos parámetros con los que se realizó el t-SNE (Fig. 20B). A partir de esta información y con el algoritmo de agrupamiento se logró identificar 14 poblaciones de linfocitos T CD8+ presentes entre bazo y tumor (Fig. 20C). Entre estos, el clúster 5 presentó características de células Tpex (PD-1+, TOX+,

TCF1+, LY108+, TIM3-, CD39-), mientras que los clústeres 13 y 14 presentaron fenotipos asociados a células Tex (PD-1+, TOX+, TCF1- o bajo, LY108- o bajo, TIM3+, CD39+). El clúster de células con fenotipo Tpex expresó niveles altos de CD73, y solo observamos expresión de CD73 en el clúster 13 de Tex que llamamos Tex CD73+. Por otro lado, parte del clúster 14 carece de TIM3 similar a la población Tint observada por citometría de flujo, pero no se logró separar como un clúster independiente ni se observó expresión de CD73 en esta población. Interesantemente, este análisis demuestra que los linfocitos T CD8+ agotados están presentes en el tumor y no en bazo (Fig. 20D). La expresión de CD73 además fue abundante en varias de las poblaciones de linfocitos T CD8+ detectadas en bazo, así como también en el clúster 10, una población con características de linfocito de memoria (PD-1 bajo, TCF1+, LY108+, TOX-) presente tanto en bazo como en tumor (Fig. 20C y D). No se observó expresión de CD73 en el clúster 11 que presenta un fenotipo efector (Tef, KLRG1+, TCF1-), o el clúster 12 con un fenotipo de memoria (TCF1+ LY108+) (Fig. 20C).

En resumen, CD73 está presente en distintas poblaciones de linfocitos T CD8+ intratumorales y en el bazo, pero entre las poblaciones de linfocitos agotados, CD73 está presente principalmente en Tpex y en una subpoblación de Tex que llamamos Tex CD73+.

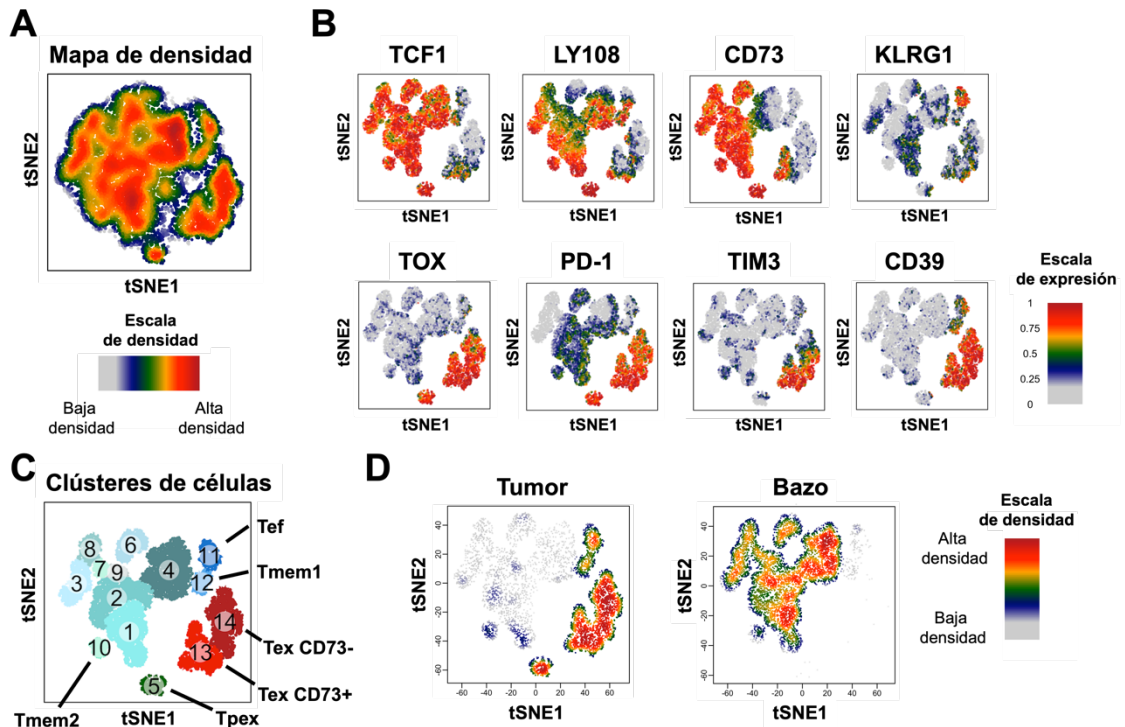


Figura 20. Linfocitos T_{pex} en tumor expresan principalmente CD73.

Análisis de poblaciones de linfocitos T CD8⁺ de bazo y tumor B16.OVA a través de t-SNE y DBSCAN. El t-SNE se realizó con un concatenado de linfocitos T CD8⁺ de 4 muestras de bazo y uno de linfocitos T CD8⁺ de 4 muestras de tumor. Cada concatenado se hizo agrupando 3000 eventos de linfocitos T CD8⁺ por muestra de bazo o tumor según el respectivo concatenado. **A.** Mapa de densidad poblacional representativo de células T CD8⁺ presentes en bazo y tumor. **B.** *Heatmap* o mapa de calor sobre el t-SNE generado mostrando la expresión de los distintos marcadores estudiados en el t-SNE. **C.** t-SNE mostrando las poblaciones identificadas a través de DBSCAN. **D.** Mapa de densidad poblacional reflejando el enriquecimiento diferencial de poblaciones entre tumor y bazo.

Objetivo 2.2. Estudiar el papel de CD73 en la distribución de linfocitos T CD8⁺ agotados y precursores agotados en el nicho tumoral.

Para estudiar cómo influye la expresión de CD73 en la distribución de los linfocitos T CD8⁺ agotados en el nicho tumoral, realizamos la cotransferencia de linfocitos OT-I WT y CD73 KO vírgenes a ratones C57BL/6 portadores del tumor B16.OVA (Fig. 21A). Las células vírgenes se obtuvieron a través de *cell sorting* de células de bazo previamente enriquecida por separación inmunomagnética (ver Materiales y Métodos, sección 2.10) en linfocitos T CD8⁺ obtenido de los

ratones WT y CD73 KO. Al utilizar células vírgenes eliminamos la posibilidad que los resultados observados se deban a diferencias en la activación de las poblaciones de los ratones WT y CD73 KO. Para diferenciar entre las células transferidas y las poblaciones de linfocitos T CD8+ endógenos utilizamos ratones con diferentes marcadores congénicos (alelos diferentes de CD45). Los linfocitos OT-I CD73 WT expresan los alelos CD45.1 y CD45.2, los linfocitos CD73 KO solo el alelo CD45.2 y los ratones receptores expresan solo el alelo CD45.1 (Fig. 22A). Las células vírgenes OT-I WT y CD73 KO se cotransfirieron a los ratones receptores 12 días después de la inyección de las células tumorales, en una razón 1:1, 6×10^5 células de cada tipo (Fig. 21A). Posterior a la cotransferencia, el crecimiento tumoral no presentó diferencias significativas con el de ratones sin transferencia inyectados con PBS (Fig. 21B) y se decidió analizar los tumores entre 7 a 9 días después de la cotransferencia.

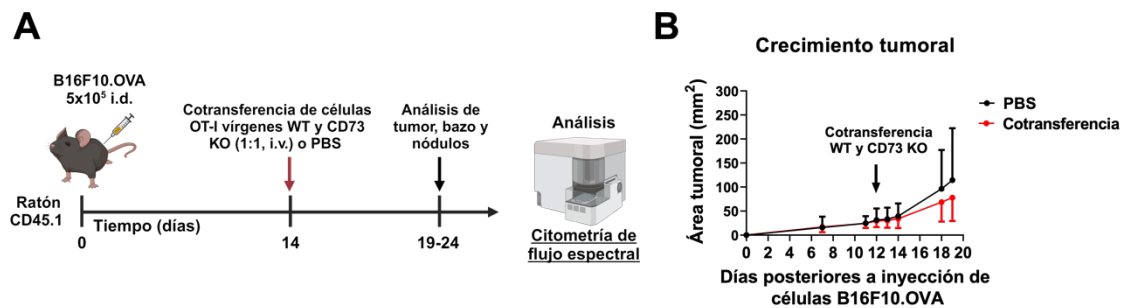


Figura 21. Modelo de estudio *in vivo* para analizar el papel de CD73 en el agotamiento y crecimiento tumoral.

Linfocitos OT-I vírgenes WT y CD73 KO fueron cotransferidos por vía i.v. a ratones portadores de tumor B16.OVA para el posterior análisis por citometría de flujo de los linfocitos T CD8+ en diferentes órganos linfoides y tumor. Como control, algunos ratones se inyectaron con PBS. **A.** Esquema experimental. **B.** Curvas de crecimiento tumoral promedio de ratones con y sin cotransferencia. En el gráfico se muestra el valor promedio y la desviación estándar de 2 experimentos independientes, con un n total de 4 para PBS y 8 para las cotransferencias. En **B** se hizo un ANOVA de dos vías con corrección de Bonferroni que no encontró diferencias significativas entre los grupos.

La Fig. 22A muestra el análisis de las células cotransferidas en el bazo, tumor, nódulo linfático inguinal no drenante y drenante del tumor utilizando los marcadores CD45.1 y CD45.2 para diferenciar los linfocitos transferidos OT-I WT

(CD45.1+CD45.2+) de los OT-I CD73 KO (CD45.2+). A partir de este análisis se pudo determinar que, de todos los órganos analizados, las células cotransferidas se encontraron más representadas en el tumor y en el nódulo drenante (Fig. 22A, B, E y F). El bazo presentó una frecuencia baja de linfocitos transferidos (WT: 0,29% y CD73 KO: 0,25%) del total de linfocitos T CD8+ mientras que el nódulo no drenante del tumor carecía de estas células (promedio WT: 0,07% y CD73 KO: 0,07%, Fig. 22A, B, D y E). Por otro lado, en el total de linfocitos T CD8+ del nódulo drenante del tumor se encontró una mayor frecuencia de linfocitos OT-I CD73 KO (2,24% promedio) que WT (1,46% promedio) (Fig. 22E), mientras que, en el tumor, los linfocitos OT-I CD73 KO fueron superiores en frecuencia (WT: 2,36% y KO: 4,03% promedio) y número (WT: 46.741 versus CD73 KO: 78.264 células/g de tumor) relativo a su contraparte WT (Fig. 22F). Interesantemente, ensayos de proliferación marcando con *CellTrace Violet* linfocitos OT-I vírgenes WT y CD73 KO agotados *in vitro*, mostraron que al menos hasta el segundo día de activación, los linfocitos no muestran diferencias significativas en su capacidad de proliferación (datos no mostrados) por lo que las diferencias en frecuencia observadas *in vivo* entre estas células podrían deberse a otras razones.

De esta manera, los resultados sugieren que la expresión de CD73 afecta la distribución de los linfocitos T CD8+ en el nódulo drenante y el tumor, disminuyendo la proporción de estas células en dichos órganos.

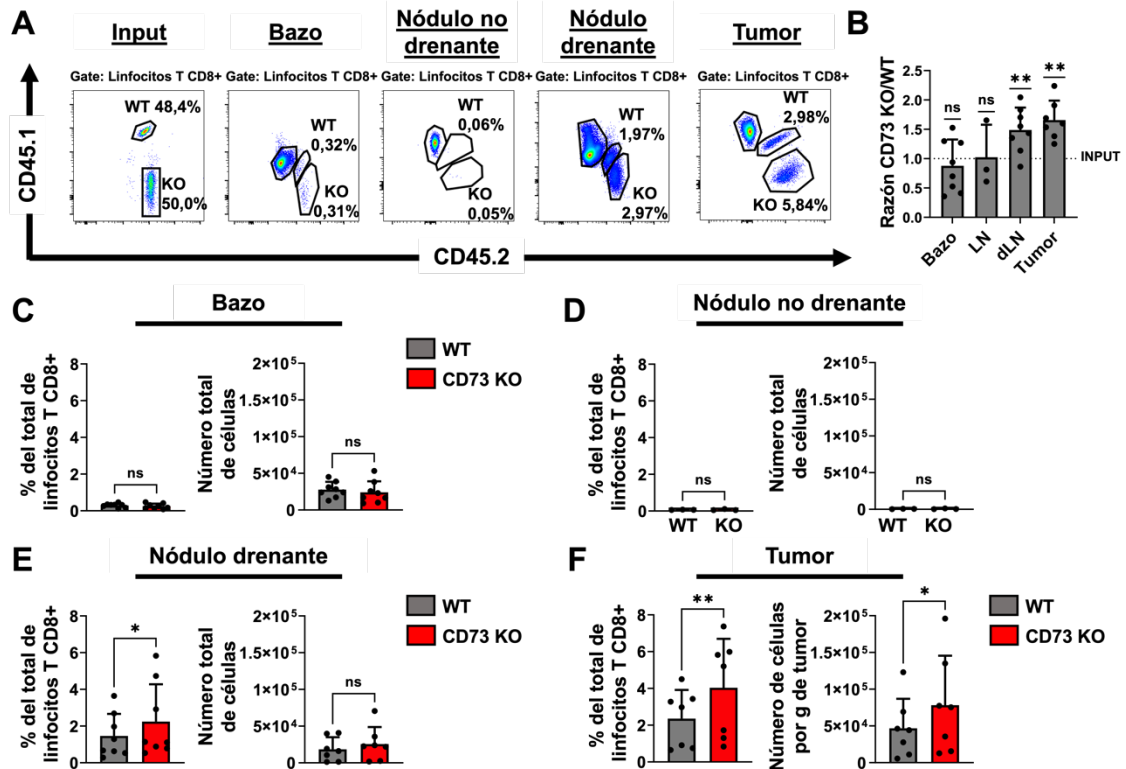


Figura 22. CD73 reduce la frecuencia de células T CD8+ intratumorales y en el nódulo drenante del tumor.

Distribución de linfocitos OT-I cotransferidos WT y CD73 KO en bazo, nódulo no drenante, nódulo drenante y tumor de ratones con melanoma B16.OVA, entre 7 y 9 días posterior a la cotransferencia de estas células. **A.** Citometría de flujo representativa del porcentaje de células OT-I WT y OT-I CD73 KO del total de linfocitos T CD8+, antes de la cotransferencia (Input) y al final del experimento en bazo, nódulo no drenante, nódulo drenante y tumor. **B.** Razón CD73 KO/WT para cada órgano. LN de *lymph node*, indica nódulo no drenante y dLN de *Draining lymph node*, indica nódulo drenante del tumor. **C-F.** Porcentaje (izquierda) y número de células totales o por g de tumor (derecha) de linfocitos OT-I WT y OT-I CD73 KO en los distintos órganos analizados. Para bazo n=8, LN n=3, dLN n=8 en frecuencia y n=7 en número total de células, tumor n=7. Para **B**, t-test de una muestra comparando contra un valor teórico 1 que representa la situación hipotética en la que hay porcentajes iguales de células WT y CD73 KO. Para **C-F**, t-test pareado, excepto para frecuencia en **E**, donde se usó Wilcoxon. * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01 y ns = no significativo.

El análisis por citometría de flujo de los linfocitos T CD8+ cotransferidos reveló que tanto los linfocitos OT-I WT como CD73 KO intratumorales presentaron fenotipos agotados (Fig. 23). Si bien, fue posible detectar en tumor tanto linfocitos T_{pex} como T_{ex} derivados de las poblaciones cotransferidas, tanto los linfocitos WT como CD73 KO se encontraron enriquecidos en poblaciones

Tpex (Fig. 23A). Entre las poblaciones transferidas, los linfocitos OT-I CD73 KO estaban levemente más enriquecidos en Tpex en frecuencia del total de células KO (promedio 78,23%) y número (59.224 células por g de tumor) respecto su contraparte WT (promedio 72,01% y 32.377 células por g de tumor) (Fig. 23A). Por otro lado, los linfocitos Tex convencionales presentaron frecuencias y números bajos en relación con lo observado para Tpex, y no se encontraron diferencias significativas entre células WT y CD73 KO para estos parámetros (Fig. 23B). En relación con el nódulo drenante del tumor, también se observaron principalmente células Tpex derivadas de las células transferidas, con un leve mayor enriquecimiento de estas células dentro de la población de linfocitos CD73 KO (promedio 87,19%) respecto a las WT (promedio 81,7%) (Fig. 23C). Sin embargo, en la mayoría de los casos las células transferidas carecían de poblaciones PD-1+ TIM3+ (Fig. 23D) y en consecuencia de Tex convencionales en los nódulos drenantes. Interesantemente, a diferencia de lo observado en el tumor donde los linfocitos Tpex tenían niveles altos de PD-1, en el nódulo drenante poseían niveles más bajos o intermedios de esta molécula, asemejándose más al fenotipo descrito para estas células en la literatura (Gebhardt et al., 2023) (Fig. 23E). Esta expresión mayor de PD-1 en Tpex intratumorales respecto al nódulo puede ser un reflejo del proceso de activación y diferenciación en Tex, mientras que los Tpex del nódulo podrían servir como un reservorio de estas células.

En general, estos resultados sugieren que la expresión de CD73 en los linfocitos T CD8+ limita el número de células T CD8+ en el contexto de la inmunidad tumoral y, de manera más leve, disminuye la frecuencia de linfocitos Tpex en los órganos estudiados. De este modo, CD73 limitaría características asociadas a células más troncales como su capacidad de mantención en el nicho tumoral o en el órgano linfoide drenante del tumor.

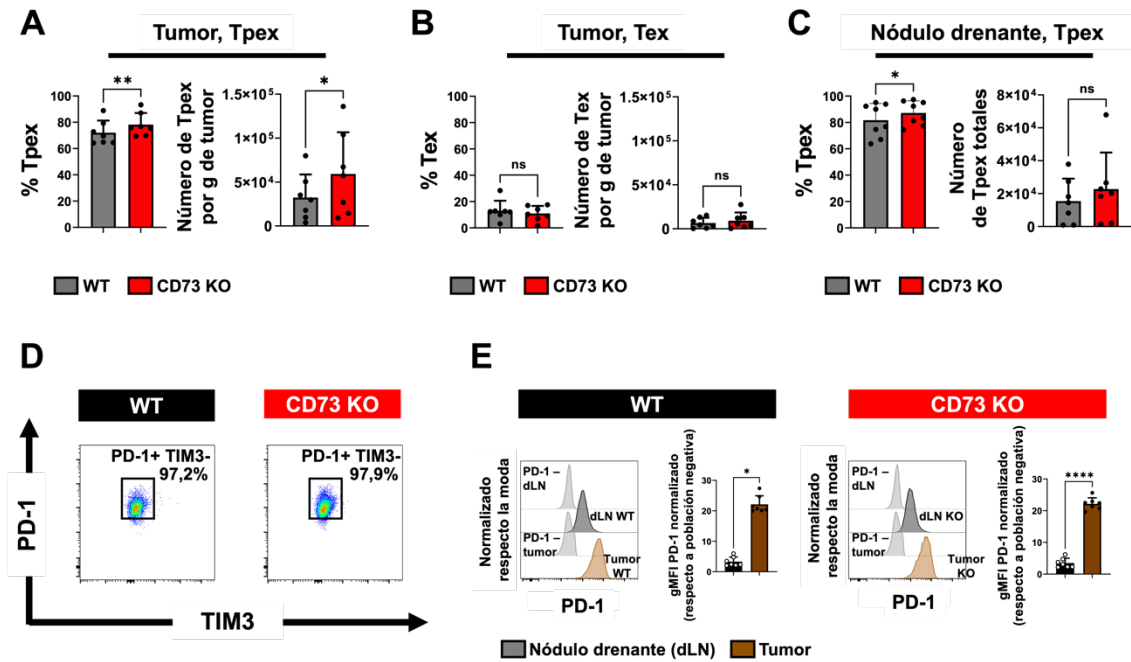


Figura 23. CD73 limita levemente la adquisición de un fenotipo TpeX en linfocitos T CD8+ *in vivo*.

Análisis por citometría de flujo de linfocitos TpeX y Tex derivados de células OT-I WT y OT-I CD73 KO cotransferidas a ratones con melanoma B16.OVA, en tumor y nódulo drenante (dLN). **A.** Porcentaje (izquierda) y número por g de tumor de TpeX (derecha) del total de células OT-I WT y OT-I CD73 KO en tumor. **B.** Porcentaje (izquierda) y número por g de tumor de Tex (derecha) del total de células OT-I WT y OT-I CD73 KO en tumor. **C.** Porcentaje (izquierda) y número (derecha) de TpeX del total de células OT-I WT y OT-I CD73 KO en dLN. **D.** Citometría de flujo representativa de la expresión de PD-1 y TIM3 en los linfocitos OT-I WT y OT-I CD73 KO en dLN. **E.** Histograma representativo de la expresión de PD-1 en linfocitos TpeX en dLN y tumor que son derivados de linfocitos OT-I WT y OT-I CD73 KO. Se muestra en gris además el histograma de la expresión de PD-1 de linfocitos T CD8+ que no expresan PD-1 (PD-1-) en dLN y tumor, que sirven de control negativo y que están en las mismas muestras de dLN y tumor con las que se hizo el histograma. Para **A**, n=7 con t-test pareado. Para **B**, n=7, análisis de frecuencia con Wilcoxon y del número de células con t-test pareado. Para **C**, análisis de frecuencia n=8 y del número de células n=7, t-test pareado. Para **E**, n=7 dLN y tumor, análisis en WT con Wilcoxon y en CD73 KO con t test pareado. * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, **** p ≤ 0,0001 y ns = no significativo.

Para profundizar en el estudio de las diferencias fenotípicas entre los linfocitos cotransferidos intratumorales y evaluar la influencia de estos en las poblaciones endógenas de linfocitos T CD8+ en el tumor, los datos se analizaron a través de t-SNE y DBSCAN. Para esto se comparó un número equivalente de linfocitos T CD8+ intratumorales de un ratón sin cotransferencia, células T CD8+ endógenas

de ratones con cotransferencia, linfocitos OT-I WT y OT-I CD73 KO intratumorales (Fig. 24). Considerando el bajo número de eventos de linfocitos OT-I WT y OT-I CD73 KO obtenidos en la mayoría de los tumores, para ambos tipos de células se decidió concatenar todos los eventos relativos a estas células de todos los tumores analizados. Así, se obtuvo un mapa de densidad representativo de todas las muestras analizadas (Fig. 24A) sobre el cuál se mostró la distribución de la expresión de las distintas proteínas analizadas (Fig. 24B) para el posterior análisis de agrupamiento con DBSCAN (Fig. 24C). De esta manera se pudieron reconocer 18 clústeres de células, entre los que se pudieron identificar poblaciones con características de células efectoras, de memoria, Tex convencionales y Tpex (Fig. 24C). A través de un mapa de densidad y conociendo la ubicación de las distintas subpoblaciones, se analizó la distribución de estas en cada grupo utilizado para el análisis (Fig. 24D). Así, de forma cualitativa y similar a lo observado por citometría de flujo, los linfocitos OT-I WT como los OT-I CD73 KO se observaron enriquecidos principalmente en Tpex (Fig. 24D). Por otro lado, las poblaciones endógenas intratumorales carecían de poblaciones Tpex, tanto en el ratón sin transferencia como con cotransferencia, observándose pocos eventos relativo al resto de poblaciones observadas (Fig. 24D). Además, la distribución de las poblaciones endógenas se vio alterada por la transferencia de células, ya que los linfocitos T CD8+ endógenos de los ratones transferidos presentaban una mayor proporción de Tex y menor proporción de Tef respecto a las poblaciones observadas en la muestra sin transferencia (Fig. 24D).

Así, de forma cualitativa se observó un fenotipo similar entre células OT-I WT y OT-I CD73 KO intratumorales, siendo principalmente Tpex, y, que la transferencia de estas células altera la distribución de poblaciones endógenas de linfocitos T CD8+ intratumorales.

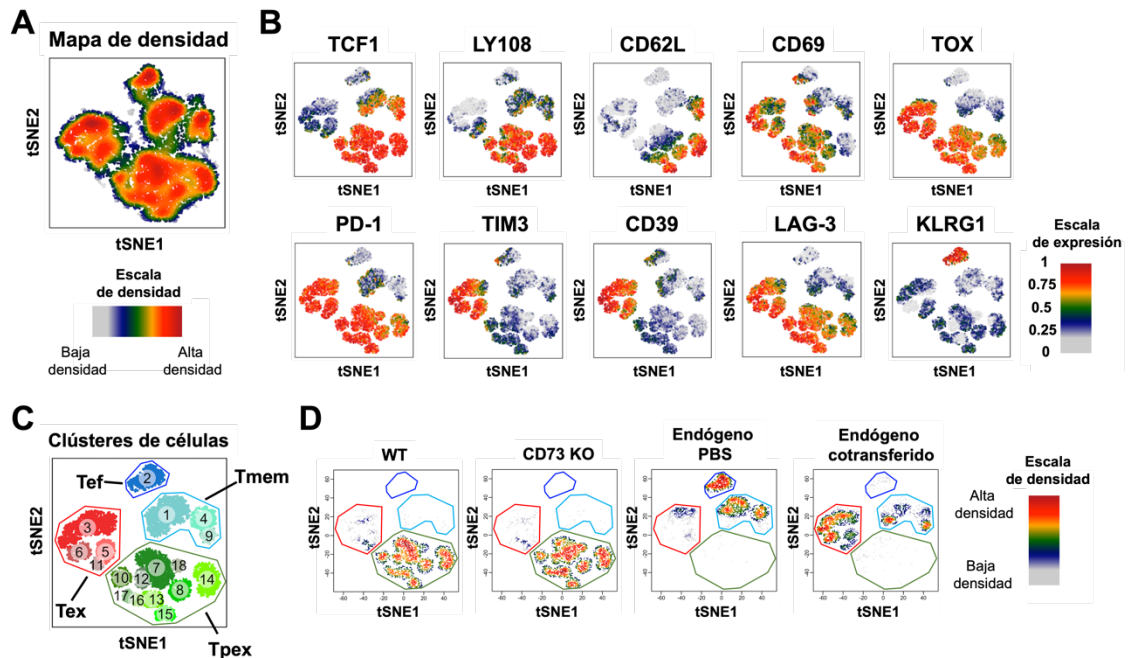


Figura 24. Análisis en t-SNE de las poblaciones de linfocitos T CD8+ intratumorales en el experimento de cotransferencia de células OT-I WT y OT-I CD73 KO.

Análisis de poblaciones de linfocitos T CD8+ de tumor B16.OVA de ratones con o sin cotransferencia de células OT-I vírgenes WT y CD73 KO, a través de t-SNE y DBSCAN. El t-SNE se realizó con linfocitos T CD8+ endógenos de una muestra sin cotransferencia, un concatenado de linfocitos T CD8+ endógenos de 4 muestras de tumor con cotransferencia (5000 eventos por muestra), un concatenado de linfocitos intratumorales OT-I WT y un concatenado de linfocitos intratumorales OT-I CD73 KO de 4 muestras de tumor con cotransferencia (todos los eventos de cada muestra). **A.** Mapa de densidad poblacional representativo de los distintos linfocitos T CD8+ utilizados para el análisis. **B.** *Heatmap* o mapa de calor sobre el t-SNE generado mostrando la distribución de la expresión de los distintos marcadores estudiados en el t-SNE. **C.** t-SNE mostrando las poblaciones identificadas a través de DBSCAN. **D.** Mapa de densidad poblacional reflejando el enriquecimiento diferencial de poblaciones entre los distintos grupos de linfocitos T CD8+ con los que se hizo el t-SNE. En **C** y **D**, se encerró manualmente las poblaciones que presentaban fenotipos similares para facilitar el análisis.

Las diferencias observadas en los t-SNE de poblaciones intratumorales endógenas se verificaron a través de citometría de flujo (Fig. 25). Tanto los linfocitos endógenos de ratones con cotransferencias como el control, poseen bajas frecuencias de linfocitos T_{pex} (promedio endógeno: 1,88% y control: 2,62%) que no eran distintas significativamente entre sí (Fig. 25A). Por otro lado, el porcentaje de linfocitos T CD8+ PD-1+ así como Tex se encontró aumentado significativamente entre los linfocitos T CD8+ endógenos de ratones con

cotransferencia relativo al control (Fig. 25B y C). El análisis por t-SNE sugería una menor frecuencia de linfocitos Tef endógenos en los ratones con cotransferencia respecto al control. Si bien esta diferencia se podría deber a que la muestra control utilizada presentaba una mayor frecuencia de Tef respecto al resto de control, el análisis por citometría de flujo reveló que esta población se encontraba en general aumentada en el control sin cotransferencia respecto a la población endógena de ratones con cotransferencia (Fig. 25D).

Estos resultados sugieren que la cotransferencia aumenta la proporción de células agotadas endógenas mientras que disminuye la frecuencia de células efectoras convencionales en el nicho tumoral.

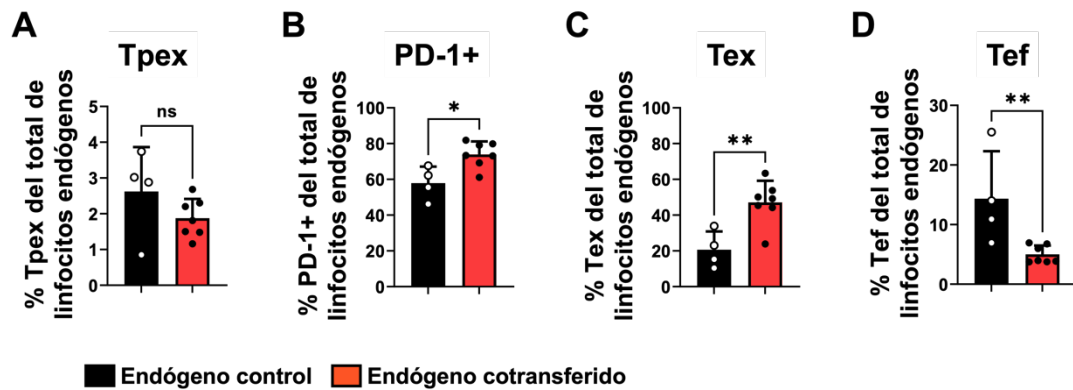


Figura 25. La cotransferencia de linfocitos T CD8+ WT y CD73 KO promueve fenotipos agotados y disminuye la frecuencia de células efectoras en la población endógena de linfocitos T CD8+ intratumorales.

Las observaciones en las poblaciones endógenas de linfocitos T CD8+ intratumorales del análisis por t-SNE fueron corroboradas por citometría de flujo. **A-D.** Porcentaje de linfocitos Tpex (**A**), PD-1+ (**B**), Tex (**C**) y Tef (**D**) del total de linfocitos T CD8+ endógenos intratumorales con y sin (endógeno control) cotransferencia de células OT-I WT y OT-I CD73 KO. Endógeno control n=4 y endógeno cotransferido n=7. Para análisis de Tpex, PD-1+ y Tex, t-test no pareado con corrección de Welch. Para análisis de Tef, Mann-Whitney. * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01 y ns = no significativo.

Objetivo 2.3. Evaluar el rol de la señalización de adenosina por medio de A2AR en el establecimiento de linfocitos T CD8+ agotados y precursores agotados en el nicho tumoral.

Para estudiar el rol que puede tener la señalización de adenosina en el proceso de agotamiento *in vivo* de los linfocitos T CD8+ en el contexto del cáncer se decidió probar en ratones portadores de tumor B16.OVA el efecto de SYN115, un inhibidor farmacológico específico del receptor de adenosina A2AR (Fig. 26). SYN115 es una droga que alcanzó la fase III en los ensayos clínicos para el tratamiento del Parkinson pero que sin embargo fue suspendida por cambios en el recuento sanguíneo de los pacientes que ponían en riesgo la vida de éstos (Jing et al., 2023). No obstante, se trata de un fármaco que ya ha sido utilizado en ensayos con ratones con tumor y se ha demostrado que potencia la terapia anti PD-1 en este modelo (Beavis et al., 2015). Considerando que los linfocitos T_{pex} son los principales respondedores a la terapia anti PD-1 (Kallies et al., 2020; Miller et al., 2019) se decidió evaluar cómo influye SYN115 en las poblaciones agotadas intratumorales en modelo murino. Para esto se inyectó por vía intraperitoneal durante una semana 7 dosis de SYN115 (3mg/kg de ratón) o del vehículo a ratones C57BL/6, 7 días después de la inyección intradérmica de células tumorales B16.OVA (Fig. 26A). Durante este tiempo se monitoreó el crecimiento tumoral sin encontrar diferencias significativas entre el grupo con SYN115 y el grupo con el vehículo (Fig. 26B). Al final del experimento, se analizó por citometría de flujo diferencias en la proporción y número de células T CD8+ totales en bazo, nódulo drenante del tumor y tumor, y no se encontraron diferencias significativas entre los ratones tratados con SYN115 y no tratados (Fig. 26 C-E).

Así, los datos sugieren que el tratamiento con SYN115 a la concentración utilizada no influye en el crecimiento tumoral ni en la proporción, ni en el número de linfocitos T CD8+ en ninguno de los órganos analizados.

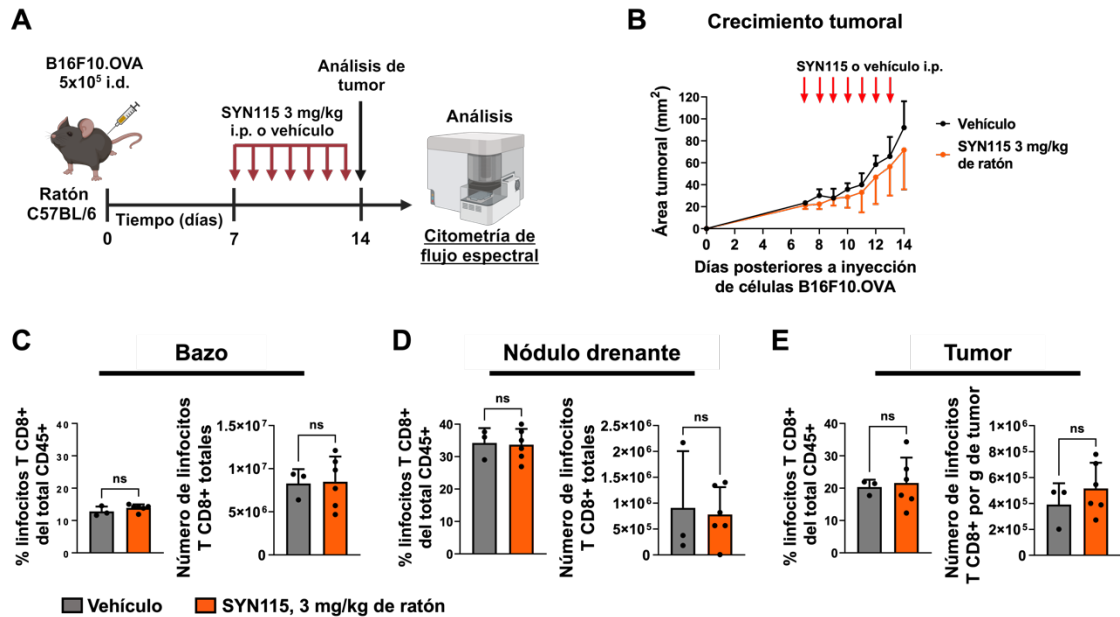


Figura 26. El bloqueo de A2AR con SYN115 en ratones con tumor B16.OVA no cambia la frecuencia y número de linfocitos T CD8+ en los órganos estudiados.

Ratones C57BL/6 portadores de tumor B16.OVA se inyectaron por vía intraperitoneal durante una semana con 7 dosis de SYN115 (3mg/kg de ratón) o del vehículo para el posterior análisis de linfocitos T CD8+ en bazo, nódulo drenante y tumor. **A.** Esquema del experimento. **B.** Crecimiento tumoral promedio en el grupo control (vehículo) y en el grupo con tratamiento con SYN115. Cada medición promedio en el tiempo muestra \pm desviación estándar. **C-E.** Frecuencia (izquierda) y número de linfocitos T CD8+ totales o por g de tumor (derecha) en bazo (**C**), Nódulo drenante (**D**) y en tumor (**E**). Para vehículo $n=3$, para SYN115 $n=6$. En **B** se hizo un ANOVA de dos vías con corrección de Bonferroni que no encontró diferencias significativas entre los grupos. Para **C-E**, t-test no pareado con corrección de Welch. ns = no significativo.

Lo siguiente a estudiar fue el efecto de SYN115 sobre la distribución de células T_{pex} y T_{ex} intratumorales a través de citometría de flujo. Para esto se analizó la frecuencia y número de linfocitos T_{pex} y T_{ex} en el tumor (Fig. 27). No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia y número de células T_{pex} intratumorales entre los ratones tratados con SYN115 y los ratones control (Fig. 27A). El nódulo drenante del tumor también es un sitio donde se pueden observar linfocitos T_{pex}, sin embargo, considerando el bajo número de eventos de linfocitos T CD8+ agotados en varias de las muestras de nódulo drenante, no se pudo analizar si existen diferencias con y sin el tratamiento con SYN115. Por

otro lado, el tratamiento con SYN115 aumentó la frecuencia de células Tex relativo al control (Fig. 27B) pero no así el número de estas.

Así, los datos sugieren que hay un cambio en la distribución de subpoblaciones de linfocitos T CD8+ con el tratamiento con SYN115 que aumenta la proporción de linfocitos Tex intratumorales.

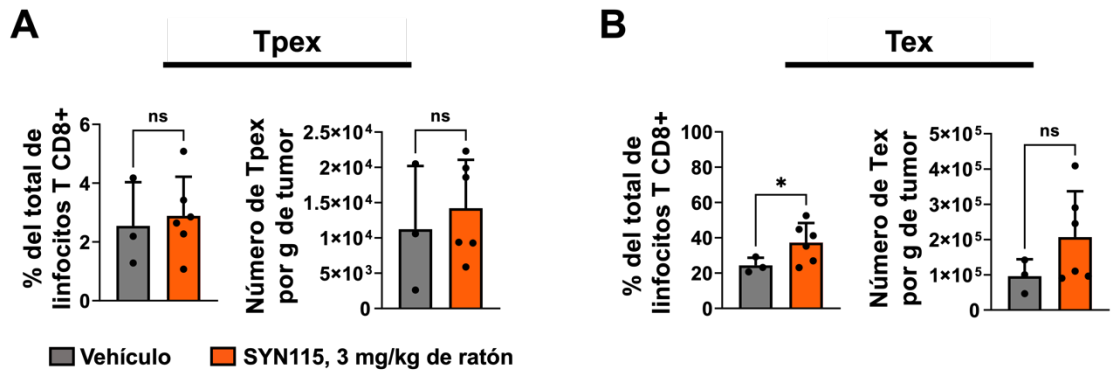


Figura 27. El bloqueo de A2AR con SYN115 en ratones con tumor B16.OVA favorece la formación de linfocitos Tex intratumorales.

Análisis por citometría de flujo de poblaciones Tpex y Tex en tumor de ratones con melanoma B16-OVA tratados con SYN115 3 mg/kg de ratón o con el vehículo control. **A** y **B**. Análisis del porcentaje del total de linfocitos T CD8+ (izquierda) y número por g de tumor (derecha) de linfocitos Tpex (**A**) o Tex (**B**) de ratones tratados con SYN115 o con el vehículo. Vehículo n=3, SYN115 n=6, t-test no pareado con corrección de Welch. * $p \leq 0,05$ y ns = no significativo.

Para profundizar en el estudio del efecto del bloqueo con SYN115 de la señalización de adenosina a través de A2AR en el fenotipo y distribución de células T CD8+ intratumorales y tener un panorama general de esto, los datos se analizaron a través de t-SNE y DBSCAN. Para esto, tanto con los datos del grupo control como del grupo tratado con SYN115 se tomó una muestra representativa y del mismo número de células T CD8+ (2000 eventos) de cada ratón, con las que se hizo un concatenado representativo de cada grupo para hacer los análisis (Fig. 28). Así, se obtuvo un mapa de densidad representativo de todas las muestras analizadas (Fig. 28A) sobre el cuál se mostró la expresión de las distintas proteínas analizadas (Fig. 28B) para el posterior análisis de agrupamiento con DBSCAN (Fig. 28C). De este modo se pudieron reconocer 8

clústeres de células, entre los que se pudieron identificar poblaciones con características de células efectoras, de memoria, Tex convencionales y Tpex (Fig. 28C). A través de un mapa de densidad y conociendo la ubicación en el t-SNE de las distintas subpoblaciones, se analizó la distribución de estas en el nicho tumoral con o sin el tratamiento con SYN115 (Fig. 28D). De forma cualitativa entonces se pudo observar que mientras la densidad de la población Tpex no pareció cambiar respecto al control, los linfocitos Tex se encontraban enriquecidos con el tratamiento con SYN115 (Fig. 28D), similar a lo observado por citometría de flujo (Fig. 27B). Además, de forma cualitativa se pudo apreciar que la mayoría de las poblaciones de linfocitos T CD8+ CD73+ con excepción de los linfocitos Tpex se observaron disminuidos con el tratamiento con SYN115 relativo al control, incluyendo a la población Tex CD73+ que había sido observada en la Fig. 20C y que se volvió a observar en este experimento (Fig. 28D).

De esta manera, los resultados sugieren que el tratamiento con SYN115 promueve un cambio en la distribución de los linfocitos T CD8+ intratumorales que lleva a un aumento en la población de células más diferenciadas Tex en desmedro de las poblaciones no agotadas.

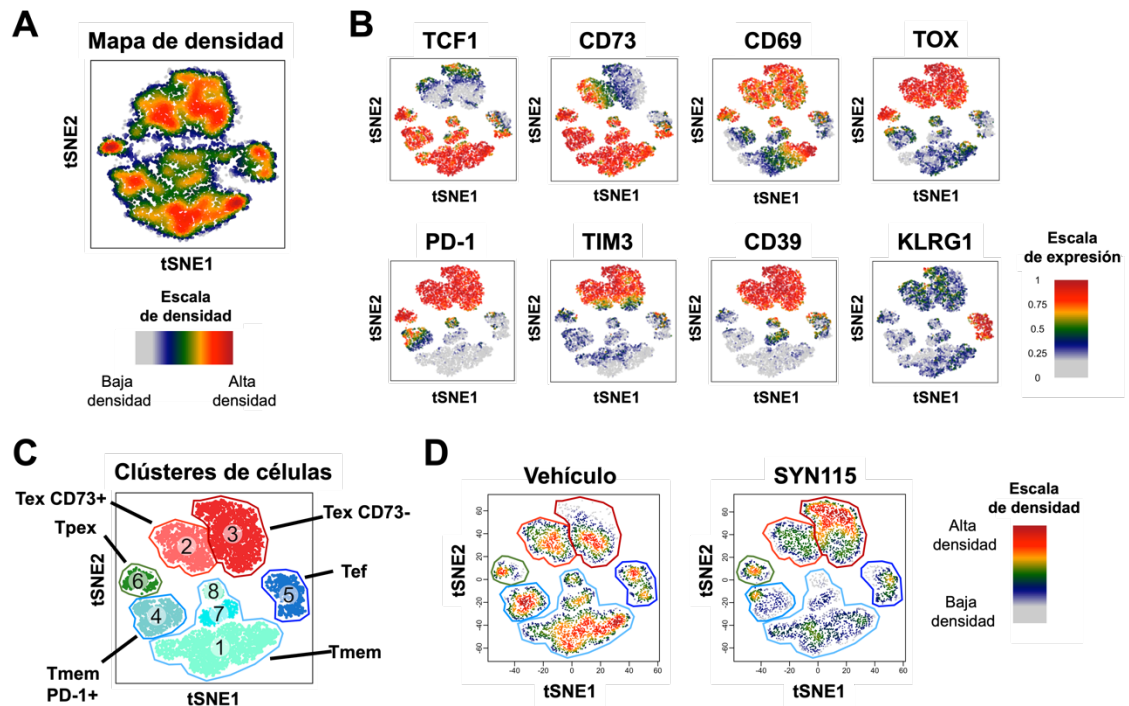


Figura 28. Análisis en t-SNE de las poblaciones de linfocitos T CD8+ intratumorales con y sin el tratamiento con SYN115.

Análisis a través de t-SNE y DBSCAN de poblaciones de linfocitos T CD8+ de tumor B16.OVA de ratones con tratamiento con SYN115 (3 mg/kg de ratón) o con el vehículo. El t-SNE se realizó con un concatenado de linfocitos T CD8+ endógenos de 3 muestras de tumor sin tratamiento con SYN115 y un concatenado de linfocitos T CD8+ endógenos de 6 muestras de tumor de ratones tratados con SYN115 (2000 eventos por muestra). **A.** Mapa de densidad poblacional representativo de los linfocitos T CD8+ utilizados para el análisis. **B.** *Heatmap* o mapa de calor sobre el t-SNE generado mostrando la distribución de la expresión de los distintos marcadores estudiados en el t-SNE. **C.** t-SNE mostrando las poblaciones identificadas a través de DBSCAN. **D.** Mapa de densidad poblacional reflejando el enriquecimiento diferencial de poblaciones intratumorales entre los ratones tratados con el vehículo o con SYN115. En **C** y **D**, se encerró manualmente las poblaciones que presentaban fenotipos similares para facilitar el análisis.

Ya que las principales diferencias observadas en los análisis de t-SNE corresponden a cambios en las proporciones de células Tex y de células no agotadas, se analizó, a través de citometría de flujo, cambios en la frecuencia de células que expresan marcadores asociados al agotamiento (TOX, PD-1 y CD39), a la memoria y estados más troncales (CD73 y TCF1), y a las células Tef (KLRG1) (Fig. 29). El análisis reveló que, en relación con el control, el tratamiento con SYN115 generó un incremento significativo en la frecuencia de células T CD8+

TOX+, PD-1hi y CD39hi (siendo este un marcador de células agotadas terminalmente) (Fig. 29A-C). El tratamiento con SYN115 además produjo una reducción significativa en la frecuencia de poblaciones T CD8+ CD73+ y de células T CD8+ TCF1+ en comparación con el control (Fig. 29D y E). Por otro lado, pese a que cualitativamente se puede observar en el t-SNE una reducción con SYN115 de las poblaciones Tef (KLRG1+) en relación con el control (Fig.28D), estas diferencias no fueron significativas (Fig. 29F). El incremento significativo en la expresión de PD-1 dentro de la población de linfocitos T CD8+ observado en la Fig. 29B además no se vio reflejado dentro de las poblaciones T_{pex}, ya que no hubo diferencias en gMFI relativa a la expresión de PD-1 en esta población entre los grupos con y sin tratamiento (Fig. 29G).

De este modo, los resultados sugieren que la señalización de adenosina a través de A2AR limita o retrasa la adquisición de estados agotados en los linfocitos T CD8+ mientras que favorece la mantención de linajes de linfocitos T CD8+ más troncales o de memoria. Esto contrasta con lo descubierto en los experimentos *in vivo* de cotransferencia de ratones OT-I WT y OT-I CD73 KO, donde CD73 tiene un rol limitando características troncales, como la capacidad de mantención de los linfocitos T_{pex} en el nicho tumoral.

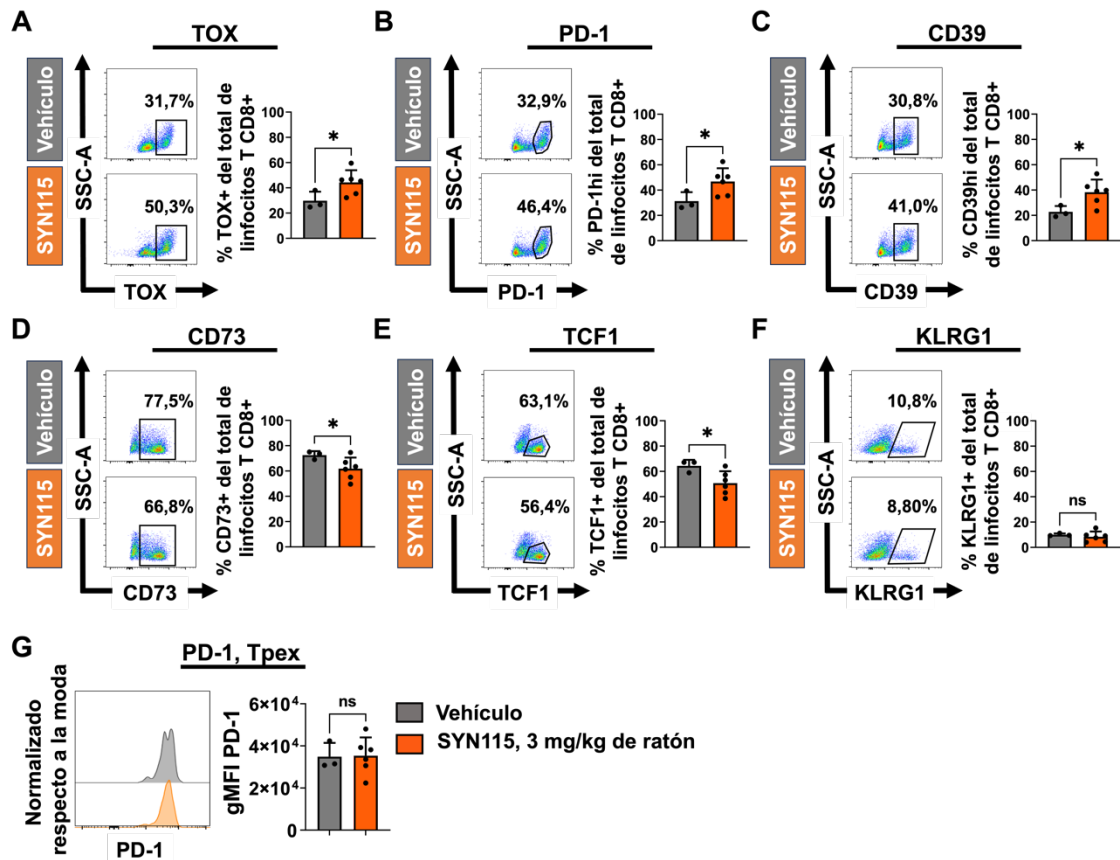


Figura 29. El bloqueo de A2AR con SYN115 en ratones con tumor promueve la formación de linfocitos T CD8+ que expresan marcadores de agotamiento mientras disminuye la frecuencia de linfocitos que expresan marcadores de troncalidad.

Análisis por citometría de flujo del porcentaje de linfocitos T CD8+ que expresan moléculas asociadas al agotamiento (TOX, PD-1, CD39), a la troncalidad o memoria (CD73 y TCF1), o a un fenotipo efector (KLRG1) en tumores de ratones tratados con SYN115 (3 mg/kg de ratón) o con el vehículo. **A-F.** Citometría de flujo representativa (izquierda) de la expresión de TOX (**A**), PD-1 (**B**), CD39 (**C**), CD73 (**D**), TCF1 (**E**) y KLRG1 (**F**), y porcentaje de células que expresan estas moléculas del total de linfocitos T CD8+ (derecha). Se utiliza hi para indicar una expresión alta de la proteína. **G.** Histograma representativo de la expresión de PD-1 (izquierda) y estadística del gMFI de PD-1 en linfocitos T_{pex} intratumorales de ratones con y sin tratamiento con SYN115. Vehículo n=3, SYN115 n=6, t-test no pareado con corrección de Welch. * $p \leq 0,05$ y ns = no significativo.

4. DISCUSIÓN

En este trabajo estudiamos el papel de CD73 y la señalización de adenosina a través de A2AR en el agotamiento de los linfocitos T CD8+. Nuestros resultados muestran que CD73 promueve la diferenciación de linfocitos T CD8+ hacia células Tex más agotadas, proceso independiente de su función como ectonucleotidasa, mientras que la señalización de adenosina a través de A2AR retrasa la diferenciación desde linfocitos Tpex hacia Tex.

CD73 se expresa en linfocitos T precursores agotados.

Nuestros resultados confirman que CD73 se expresa predominantemente en los linfocitos T CD8+ precursores agotados (Tpex) y que disminuye en etapas más diferenciadas (Tint y Tex), similar a lo recientemente descrito para infecciones crónicas (Gabriel et al., 2021; J. Lee et al., 2023; Restifo & Gattinoni, 2013). *In vitro*, observamos que la expresión de CD73 aumenta inicialmente desde linfocitos OT-I vírgenes hacia un fenotipo Tpex y que disminuye mientras las células avanzan hacia un estado más diferenciado y funcional. Además, con el agotamiento *in vitro* de linfocitos T CD8+ totales se logró observar una correlación negativa entre la expresión de CD73 en el cultivo y la generación de Tex, asociando así la expresión de CD73 a cultivos con menor agotamiento terminal. Con el estudio de las poblaciones agotadas en el nicho tumoral también mostramos que la expresión de CD73 se ve enriquecida principalmente en poblaciones Tpex, siendo baja en linfocitos T más agotados (Tint y Tex). Así, los resultados obtenidos indican a CD73 como un marcador de linfocitos Tpex *in vitro* y en el nicho tumoral, similar a lo descrito en infecciones crónicas en la literatura.

CD73 promueve el agotamiento de los linfocitos T CD8+ de forma independiente a su actividad ectonucleotidasa.

La expresión de CD73 promovió la generación de T_{ex} y de células agotadas productoras de citoquinas efectoras desde T_{pex}, limitó el potencial efector a nivel transcriptómico de las células agotadas *in vitro* y disminuyó la frecuencia y número de linfocitos T CD8+ totales y de T_{pex} tanto en el nicho tumoral como en el nódulo drenante del tumor *in vivo*. El efecto de CD73 en la restricción del fenotipo efector de los linfocitos T CD8+ observado con el RNAseq complementa los hallazgos previos del laboratorio donde se describía que CD73 limitaba el *fitness* mitocondrial y el potencial citotóxico de los linfocitos T CD8+ (Briceño et al., 2021). Además, hallazgos previos del laboratorio (Roseblatt et al., 2021) demuestran que CD73 limita la supervivencia de las células T CD8+ frente a la estimulación antigénica, lo que se vio reflejado en el aumento en la frecuencia y número de linfocitos CD73 KO respecto al WT en el nicho tumoral en los experimentos de cotransferencia (donde las células se expusieron a estímulos antigénicos crónicos). Estos hallazgos sugieren que CD73 puede promover la generación de T_{ex} y limitar características troncales, como la capacidad de mantención de las células. Esta idea además se ve reforzada con lo reportado en la literatura, donde el bloqueo inmunoterapéutico de CD73 en ratones con tumor puede revertir significativamente el fenotipo agotado en los linfocitos T CD8+ (Deng et al., 2018), relacionando a CD73 con la promoción del agotamiento.

Interesantemente, el uso del inhibidor enzimático de CD73 APCP no modificó significativamente la generación de T_{pex} y T_{ex} en cultivo. Así mismo, con la cotransferencia de linfocitos vírgenes OT-I WT y OT-I CD73 KO a un ratón con tumor B16.OVA se observó una presencia mayor de los linfocitos OT-I CD73 KO que OT-I WT en tumor y nódulo drenante, en un contexto donde sí existió expresión endógena de CD73 y por ende adenosina. Además, se ha descrito en la literatura que la adenosina puede seguir siendo producida en los ratones CD73

KO gracias a la expresión de la fosfatasa alcalina de tejido no específico (Wang et al., 2020). De este modo, además de estar expuestos a la adenosina producida por las células endógenas, los linfocitos OT-I CD73 KO cotransferidos potencialmente podrían producir adenosina a través de mecanismos compensatorios. En adición, a diferencia de CD73, que promovió la diferenciación en los linfocitos T CD8+ agotados, en este trabajo se obtuvieron resultados que demuestran que la adenosina parece reducir o retardar el avance de la diferenciación en los linfocitos T_{pex}. Todas estas observaciones sugieren que los efectos que tiene CD73 promoviendo la diferenciación y reduciendo características troncales como la capacidad de mantención en los linfocitos T CD8+ no se deben a la actividad ectonucleotidasa productora de adenosina, sino que a la presencia de esta proteína, lo que refuerza la idea de una función coestimuladora de CD73.

CD73 podría promover el agotamiento en linfocitos T CD8+ actuando como proteína coestimuladora.

Es bien reconocido que CD73 tiene un efecto como proteína coestimuladora en los linfocitos T humanos, además de su función productora de adenosina (Dianzani et al., 1993; Gutensohn et al., 1995; Massaia et al., 1990; Resta et al., 1994; Resta & Thompson, 1997; Resta et al., 1998; Thompson & Ruedi, 1989; Thompson et al., 1989). Se ha reportado que los linfocitos T pueden activarse con anticuerpos contra CD3 o con PMA en concentraciones subóptimas cuando se adiciona un anticuerpo contra CD73, y que las células T CD73+ se activan con concentraciones más bajas de PMA que los CD73- (Massaia et al., 1990; Thompson & Ruedi, 1989). Si bien, CD73 es una proteína anclada a membrana, carente de dominio intracelular mediante el cual señalizar y, por otro lado, es una proteína de la que no se conoce un posible ligando, sí se han podido determinar algunas de las proteínas con las que interactúa así como también proteínas esenciales en la señal de transducción desencadenada por CD73. A

través de experimentos de *cocapping* se ha demostrado que CD73 se asocia fuertemente con la proteína tirosina fosfatasa CD45RC, moderadamente con CD8 y débilmente con CD3, sugiriendo que la señalización de CD73 está acoplada a la del TCR (Dianzani et al., 1993). De hecho, por medio de estudios con células Jurkat lck KO transfectadas para que expresen CD73 humano, se ha demostrado que la tirosina quinasa Lck (importante para el inicio de la cascada de señalización río abajo del TCR) es requerida en la señalización desencadenada por CD73 (Resta et al., 1994). Además, se han estimulado linfocitos T murinos fyn KO con un anticuerpo contra CD73 y PMA a una concentración subóptima y se ha observado que a diferencia de los linfocitos T silvestres, los linfocitos T CD8+ fyn KO son incapaces de proliferar y de secretar IL-2 en estas condiciones, demostrando así el requerimiento de la tirosina quinasa Fyn en la transducción de señales dependiente de CD73 (Yamashita et al., 1998). En adición, a través de experimentos de agotamiento *in vitro* de linfocitos OT-I vírgenes CD73- y CD73+ sorteados, hemos podido observar en el laboratorio que en relación a los CD73-, los cultivos iniciados con células CD73+ tienen niveles de expresión más altos de CD69 y CD25, así como un mayor número de células al día 2 de iniciado el cultivo (Anexo 1D y E). Los niveles de expresión de CD69 y CD25 en los cultivos iniciados con linfocitos OT-I vírgenes CD73-, sin embargo, se observaron más altos que en los cultivos iniciados con células OT-I vírgenes CD73+ al día 5 del cultivo (Anexo 1G), sugiriendo un posible retardo en la activación de los linfocitos OT-I vírgenes CD73- respecto a los CD73+. Por otro lado, se ha descrito además que la actividad catalítica productora de adenosina de CD73 no es requerida para su función como proteína coestimuladora (Gutensohn et al., 1995). De hecho, los anticuerpos contra CD73 con los que se ha probado su actividad coestimuladora son anticuerpos que también inhiben la actividad catalítica de CD73, como el clon 1E9 para CD73 humano o el clon TY/23 para CD73 murino (Dianzani et al., 1993; Thomson et al., 1990; Yamashita et al., 1998). Así, los resultados de este trabajo que apuntan que CD73 promueve la diferenciación de los linfocitos T CD8+ agotados pero que la

adenosina mediante A2AR limita este proceso se explican con una función coestimuladora de CD73 en los linfocitos T CD8+.

CD73 podría ser relevante para promover la progresión de los linfocitos T CD8+ con características troncales a estados más diferenciados.

El término de troncalidad define el potencial de autorrenovación y de diferenciación que posee una célula (Mushtaq et al., 2020). En este trabajo, reportamos expresión de CD73 en linfocitos T_{pex} generados en distintos contextos y que CD73 está involucrado en la capacidad de diferenciación de estas células. Sin embargo, la expresión de CD73 no fue exclusiva de T_{pex} y es posible observarla en otras poblaciones de linfocitos T CD8+ intratumorales (ej: T_{mem} en Fig. 20), y de bazo, que, como los linfocitos T_{pex}, también expresaban moléculas asociadas a troncalidad como TCF1 y LY108 (ver Fig. 20 y 28). Si bien la coestimulación es un proceso que suele asociarse con la activación de células T vírgenes, la expresión de CD73 también puede ser beneficiosa para linfocitos T CD8+ que ya han sido activados. Se ha reportado que linfocitos T CD73+ de sangre periférica pueden activarse con concentraciones más bajas de PMA que linfocitos T CD73-, sugiriendo una mayor sensibilidad en la señalización del TCR en las células T CD73+ (Thompson & Ruedi, 1989). Así, la expresión de CD73 en los linfocitos T CD8+ TCF1+ y T_{pex} observados en este trabajo podría ser necesaria para disminuir el umbral de activación de estas células y, con esto, favorecer una activación y diferenciación más rápida. En el caso de los linfocitos T_{pex}, la señal proporcionada por CD73 podría ser beneficiosa para su diferenciación hacia linfocitos productores de citoquinas efectoras, como se observó en los experimentos de agotamiento *in vitro* de linfocitos OT-I vírgenes WT y CD73 KO en este trabajo (ver Fig. 13). Además, como se mencionaba anteriormente, la coestimulación se suele asociar con la activación de linfocitos T vírgenes y se ha reportado que CD73 proporciona señales accesorias que permiten la activación de estas células via CD3/TCR (Dianzani et al., 1993).

Interesantemente, un estudio reciente demostró que los cambios epigenéticos y transcriptómicos que llevan al agotamiento en los linfocitos T CD8⁺ pueden comenzar dentro de las primeras horas de su activación y que estos se ven estabilizados y/o reforzados con la activación crónica de estas células con el pasar de los días (Rudloff et al., 2023). De este modo, CD73 como molécula de coestimulación podría estar favoreciendo el agotamiento en etapas tempranas de este proceso.

Así, CD73 puede ser relevante para promover la diferenciación y agotamiento de linfocitos T CD8⁺ en etapas tempranas de activación, como lo es para los linfocitos T vírgenes, como también para la diferenciación de linfocitos T_{pex} a T_{ex}. La confirmación de esta hipótesis queda para estudios posteriores.

La adenosina por medio de A2AR disminuye la diferenciación de linfocitos T CD8⁺ agotados.

En contraste con CD73, la adenosina vía A2AR retrasa la diferenciación terminal de los linfocitos T_{pex}. Nuestros experimentos con agonistas y antagonistas específicos de A2AR demostraron que la señalización de adenosina vía A2AR protege a los linfocitos T CD8⁺ del agotamiento terminal.

El estudio de la expresión de los receptores de adenosina en los linfocitos OT-I agotados *in vitro* demostró una expresión predominante del receptor A2AR en estas poblaciones, lo que va de acuerdo con lo descrito con la literatura para los linfocitos T CD8⁺ (Vijayan et al., 2017). Así mismo, y similar a lo descrito en otras células inmunes (Al-Taei et al., 2017; Bao et al., 2016), se observó que el uso del análogo de la adenosina NECA y del agonista específico de A2AR CGS-21680 promovieron la expresión de CD73 en los linfocitos T CD8⁺, corroborando la acción de estos reactivos. Así, si el papel de CD73 promoviendo la diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ y el agotamiento depende de su actividad ectonucleotidasa productora de adenosina, se esperaba que el uso de agonistas de A2AR generara más T_{ex} en cultivo. Sin embargo, mientras que CD73

promovía la generación de células más diferenciadas en cultivo, A2AR resultó disminuir la formación de éstas. El uso de los agonistas en el cultivo de agotamiento promovió un aumento en la frecuencia de células T agotadas que expresan CD73 y CD62L, ambas proteínas asociadas a estados más troncales de diferenciación. Además, los agonistas disminuyeron los niveles de expresión de TOX y PD-1 en los linfocitos T CD8+ agotados *in vitro*, ambas moléculas asociadas al agotamiento. En adición, el uso del agonista específico de A2AR CGS-21680 redujo significativamente la frecuencia de células Tex en los cultivos relativo al control. Por otro lado, el uso del antagonista específico de A2AR SCH58261 redujo el número de células totales al final del cultivo en relación con el control, sugiriendo que la señalización de adenosina puede ser necesaria en algún grado para la mantención de los linfocitos T CD8+.

Con el uso del antagonista específico de A2AR SYN115 en ratones portadores de tumor se observó que la frecuencia de Tex, de células T CD8+ TOX+, PD-1hi y CD39hi aumentaba mientras que el porcentaje de células CD73+ y TCF1+ disminuía significativamente relativo a los ratones control, sugiriendo que A2AR retrasa el agotamiento, en línea con las observaciones *in vitro*.

De esta manera, en su conjunto, los resultados de este trabajo sugieren que la señalización de adenosina por medio de A2AR inhibe el proceso de agotamiento y favorece estados menos diferenciados en los linfocitos T CD8+.

La señalización de adenosina por medio de A2AR reduce el agotamiento terminal al disminuir la fuerza de la señal del TCR.

Con el uso de agonistas y antagonistas de A2AR durante el agotamiento *in vitro* de linfocitos OT-I fue posible comprobar que la señalización de adenosina de A2AR disminuye la expresión de moléculas asociadas a la activación de los linfocitos T, como CD69, CD25 y CD44. Este resultado está de acuerdo con lo que se ha descrito en la literatura, donde la señalización de adenosina por medio de A2AR genera un aumento de AMP cíclico intracelular, seguido por activación

de la proteína quinasa A, la cual disminuye la activación de la vía Akt mediada por la señalización del TCR (Bono et al., 2015). Esto sugiere que la adenosina podría promover estados más troncales al disminuir la fuerza de la señal de activación del TCR y con esto proteger a los linfocitos T CD8+ de un agotamiento excesivo.

Interesantemente, se ha planteado para PD-1 un papel similar al presentado en este trabajo para A2AR, en la reducción de la señal de activación de los linfocitos T (Odorizzi et al., 2015). Si bien PD-1 es una proteína que se ha asociado con el agotamiento, esta no es requerida para generar Tex. De hecho, la ausencia genética de PD-1 en los linfocitos T CD8+ genera una acumulación de Tex en el contexto de infecciones crónicas (Odorizzi et al., 2015). Así, se ha propuesto que PD-1 podría expresarse en los linfocitos T CD8+ agotados para proteger a estas células de una diferenciación terminal excesiva. De modo similar a PD-1, la señalización de adenosina por medio de A2AR podría proteger a los linfocitos T CD8+ del agotamiento terminal, sobre todo considerando que el mecanismo principal por el que PD-1 actúa en los linfocitos T CD8+ también es inhibiendo la señal de activación río abajo del TCR (Hashimoto et al., 2018). Esta idea se ve reforzada con los resultados obtenidos con el uso del antagonista específico de A2AR SYN115 en ratones con tumor, donde el bloqueo de la señalización de adenosina mediante A2AR aumentó la frecuencia de células T CD8+ agotadas intratumorales y disminuyó la frecuencia de células T CD8+ TCF1+ relativo al grupo control, mientras que no alteró la frecuencia de linfocitos T_{pex}. La ausencia de diferencias significativas en el número total de linfocitos T CD8+ con el uso de SYN115 sugiere además que el aumento de los linfocitos Tex se debe a una posible diferenciación y agotamiento desde los linfocitos T CD8+ TCF1+. En adición, se ha reportado que los linfocitos T agotados pueden originarse desde linfocitos T precursores de memoria con baja expresión de KLRG1, que podrían estar presentes dentro de las poblaciones T CD8+ TCF1+ intratumorales observadas en este trabajo (Angelosanto et al., 2012). Finalmente, los resultados obtenidos con el uso del antagonista de A2AR SYN115 durante la

respuesta antitumoral de los linfocitos T CD8+, complementan las observaciones reportadas utilizando aproximaciones genéticas como el uso de linfocitos T A2AR KO, donde la expresión de A2AR resultó importante para la mantención de los linfocitos T y su diferenciación en células efectora/memoria (CD44+) (Cekic & Linden, 2014).

Así, los resultados sugieren que al menos parte de la señalización de adenosina limita el avance del agotamiento en los linfocitos T CD8+.

CD73 y la señalización de adenosina mediante A2AR tienen roles diferentes pero complementarios en el agotamiento de los linfocitos T CD8+.

En conjunto, los resultados apuntan a roles contrapuestos para la adenosina y CD73 en el agotamiento de los linfocitos T CD8+. Mientras la adenosina parece reducir el proceso de agotamiento desde T_{pex} hacia células más diferenciadas, CD73 parece promover el agotamiento de forma independiente a su actividad catalítica. Además, los resultados de este trabajo van en línea con lo que se ha reportado para A2AR como receptor que disminuye la fuerza de la señal del TCR (Bono et al., 2015) y para CD73 como molécula coestimuladora que favorece la activación de las células T (Dianzani et al., 1993; Gutensohn et al., 1995; Massaia et al., 1990; Resta et al., 1994; Resta & Thompson, 1997; Resta et al., 1998; Thompson & Ruedi, 1989; Thompson et al., 1989). Interesantemente, mientras CD73 promovió la expresión de A2AR, la adenosina a través de A2AR promovió la expresión de CD73. Así, los T_{pex} que en este trabajo se caracterizaron por expresar CD73 y A2AR podrían requerir de ambos para mantener la respuesta citotóxica contra el tumor. Por un lado, CD73 podría ser beneficioso para que los linfocitos T_{pex} se diferencien a T_{ex}, que son las células que atacan directamente al tumor. Por otro lado, la señalización de adenosina mediante A2AR podría estar involucrada en la mantención de los linfocitos T_{pex}. Además, es posible que CD73 tome un papel más preponderante en la activación de los linfocito T CD8+ vírgenes y posteriormente en la

diferenciación de Tpex a Tex, ya que los linfocitos Tpex están enriquecidos en CD73, mientras que la señalización de adenosina vía A2AR puede estar evitando una activación excesiva que podría llevar a la muerte, tomando un papel más preponderante promoviendo la mantención de las células Tpex y Tex en el nicho tumoral. De esta manera, los resultados están en línea con lo planteado en la hipótesis científica de este trabajo.

El bloqueo de la señalización de adenosina mediada por A2AR utilizando SYN115 puede potenciar la eficacia de la terapia anti PD-1 al potenciar la diferenciación de linfocitos Tpex hacia linfocitos T CD8+ más diferenciados y funcionales.

Los resultados obtenidos sugieren al menos dos posibles mecanismos por los cuales la inhibición de la señalización de adenosina por medio de A2AR con SYN115 podría potenciar la terapia anti PD-1. El primero correspondería al aumento en los estados de diferenciación que provoca el uso del inhibidor en los linfocitos T CD8+, permitiendo la generación de células reactivas al tumor, más diferenciadas y potencialmente más citotóxicas. Se ha descrito que el uso de la terapia anti PD-1 induce un estallido proliferativo de Tpex que resulta en un aumento del número de estas células y su progenie Tex (Kallies et al., 2020; Miller et al., 2019; Siddiqui et al., 2019). Así, la terapia anti PD-1 genera un mayor número de Tpex que pueden ser objetivo del tratamiento con SYN115 al expresar A2AR, y con esto generar aún más Tex reactivas al tumor. El segundo mecanismo correspondería al aumento en la frecuencia de células que expresan altos niveles de PD-1 que provoca la inhibición de la señalización de la adenosina vía A2AR con SYN115. Al aumentar los niveles de expresión de PD-1 en los linfocitos T CD8+, aumenta también la probabilidad con la que la terapia anti PD-1 se une a su objetivo en la superficie de las células. No obstante, se ha descrito que solo los Tpex y no los Tex responden con el estallido proliferativo a la terapia anti PD-1 (Kallies et al., 2020; Miller et al., 2019; Siddiqui et al., 2019), y en este trabajo

no se encontraron diferencias en los niveles de expresión de PD-1 dentro de la población T_{pex} entre los grupos con y sin el bloqueo de A2AR. Así los resultados apoyan principalmente el primer mecanismo planteado y que va de acuerdo a la hipótesis tecnológica de este trabajo.

Las terapias de transferencia adoptiva de linfocitos T CD8+ deficientes en CD73 pueden ser más efectivas que el bloqueo sistémico de la acción de A2AR o CD73.

En los últimos años se han propuesto terapias sistémicas contra el cáncer que buscan inhibir la actividad enzimática de CD73 como productor de adenosina o la señalización de adenosina mediante A2AR (Allard et al., 2013; Beavis et al., 2015; Deng et al., 2018; Myojin, 2023). Sin embargo, a menudo estas terapias suelen utilizarse en combinación con otras como por ejemplo la terapia anti PD-1 para observar un beneficio mayor, normalmente como efecto sinérgico (Allard et al., 2013; Beavis et al., 2015; Myojin, 2023). De hecho, en este trabajo no se observó una reducción significativa del crecimiento tumoral con el uso del antagonista de A2AR SYN115. Además, los resultados de este trabajo, así como los reportados por el grupo de Cekic (Cekic & Linden, 2014) sugieren que algo de señalización de adenosina vía A2AR puede ser beneficiosa para la mantención de los linfocitos T CD8+ y el retardo de la diferenciación terminal en estas células. Por otro lado, las observaciones sobre el papel de CD73 en el agotamiento en este trabajo sugieren que cumple un rol como coestimulador que puede estar favoreciendo o acelerando la activación y en consecuencia la diferenciación terminal de los linfocitos T CD8+. Experimentos previos sobre el estudio del rol coestimulador de CD73 activando la señal con anticuerpo específicos contra esta molécula se han hecho utilizando anticuerpos que también inhiben su actividad catalítica (Dianzani et al., 1993; Yamashita et al., 1998). De esta manera, las terapias actuales con anticuerpos que bloquean la actividad enzimática de CD73 pueden estar además activando la actividad

coestimuladora de CD73 y acelerando contraproducentemente el agotamiento en los linfocitos T CD8+. En línea con esto, en un estudio en que se bloqueó CD73 con un anticuerpo que inhibe su actividad catalítica en ratones con tumor, si bien se logró restaurar parte de la función efectora de los linfocitos T CD8+, en esa misma publicación se reportó que existían linfocitos T CD8+ “con un fenotipo resistente” a la terapia que de hecho expresaban altos niveles de CD73 y que con la terapia aumentaban la expresión de los receptores inhibitorio PD-1 y CTLA-4 (Deng et al., 2018). Así la inhibición sistémica de la actividad catalítica de CD73 o de la señalización de adenosina vía A2AR pueden tener efectos negativos para la supervivencia o el potencial efector de los linfocitos T CD8+.

En este trabajo se observó mediante aproximaciones *in vitro* e *in vivo* que los linfocitos T CD8+ CD73 KO alcanzaban un estado T_{pex}, pero que a diferencia de los linfocitos T CD8+ silvestres, presentaban mayor mantención y un retardo o una disminución en la adquisición de características de células menos troncales y más agotadas. Así para las terapias de transferencia adoptiva de linfocitos T CD8+ o de células T con receptor quimérico de antígeno, evitar la expresión de CD73 en estas células puede resultar en un mejoramiento en la mantención de los linfocitos T CD8+ reinfundidos y respuestas antitumorales más eficaces al retardar el agotamiento de estas células en el paciente.

5. CONCLUSIONES

En base a este trabajo se obtuvieron resultados que evidencian que CD73 y el producto de su actividad catalítica, adenosina, tienen papeles diferentes en el agotamiento (Figura 30). Por un lado, los resultados sugieren que CD73 de manera independiente a su actividad catalítica promueve la diferenciación de linfocitos T_{pex} a células agotadas más diferenciadas *in vitro* mientras disminuye la capacidad de sobrevivir o mantención de los linfocitos T CD8⁺ en el contexto del agotamiento *in vivo*. Por otro lado, la adenosina mediante su señalización a través de A2AR reduce la diferenciación desde linfocitos T_{pex} a T_{ex} tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, mientras CD73 promovió la expresión de A2AR, la activación de A2AR promovió la expresión de CD73, indicando un posible mecanismo de retroalimentación entre ambos componentes que podría estar regulando el proceso de agotamiento en los linfocitos T CD8⁺.

Los resultados de este trabajo además indicaron que el bloqueo de la señalización de adenosina favorece la generación de linfocitos T CD8⁺ agotados sin disminuir la proporción de T_{pex} en el nicho tumoral. Con esto, los datos proporcionados por este trabajo apoyan un mecanismo por el cuál la inclusión de este tratamiento puede potenciar la terapia anti PD-1 al favorecer la generación de células diferenciadas reactivas al tumor derivadas desde T_{pex}. Sin embargo, las observaciones de este trabajo también sugieren el desarrollo de terapias de transferencia adoptiva de linfocitos T CD8⁺ que carezcan de expresión de CD73 por sobre el bloqueo sistémico de CD73 o A2AR.

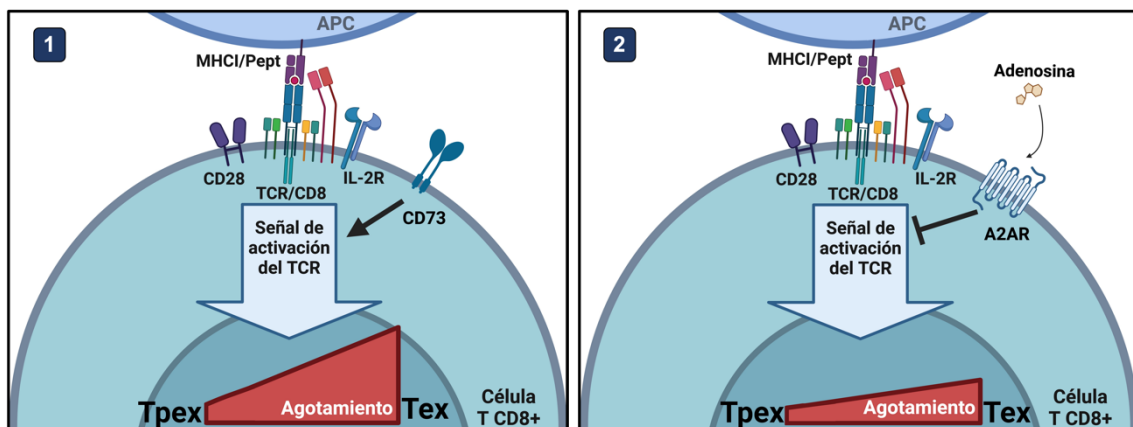


Figura 30. CD73 contribuye al avance del agotamiento de Tpex a Tex mientras la adenosina vía A2AR retarda este proceso.

1. La expresión de CD73 en los linfocitos T CD8+ se asocia al fenotipo Tpex y favorece la diferenciación de los linfocitos T CD8+ hacia un estado más agotado en contextos de estímulo crónico, potencialmente actuando como molécula coestimuladora. **2.** La señalización de adenosina mediante A2AR en los linfocitos T CD8+ promueve características troncales como la supervivencia o mantención y retarda la formación de Tex, potencialmente al reducir la señal de activación del TCR.

6. PROYECCIONES

Con los resultados obtenidos en este trabajo sobre el papel de CD73 y de la señalización de adenosina en el proceso de agotamiento de los linfocitos T CD8+ quedan abiertas algunas preguntas que pueden entregar más información relevante para el desarrollo de inmunoterapias. Entre estas queda por evaluar si la expresión de CD73 cumple un papel relevante para los linfocitos Tpex en su diferenciación a Tex. Para responder a esto se proponen experimentos de cotransferencia de linfocitos Tpex OT-I WT y OT-I CD73 KO generados *in vitro* a ratones portadores de tumor B16.OVA. De manera similar, también queda por estudiar si la activación de A2AR influye sobre el agotamiento de los linfocitos T CD8+ antes y/o después de la formación de Tpex. El agotamiento *in vitro* de linfocitos OT-I A2AR KO y su contraparte WT o experimentos de cotransferencia

de estas células a ratones portadores de tumor B16.OVA también pueden complementar los resultados de este trabajo. Además, queda abierta la pregunta sobre cuál es el ligando de CD73 que activa su actividad coestimuladora, para mejorar el entendimiento sobre el mecanismo por el cual actúa esta ectoenzima y su aprovechamiento en inmunoterapias. Finalmente, se propone el estudio de las poblaciones Tpex y Tex frente a una terapia combinada con SYN115 y anti PD-1 en ratones con tumor B16.OVA. El aumento en la frecuencia y número de linfocitos Tex relativo al control solo con administración de SYN115 y solo de anti PD-1 terminaría por validar la hipótesis tecnológica de este trabajo. La respuesta a estas preguntas pendientes y los resultados de este trabajo pueden entregar información valiosa que se podría aprovechar por ejemplo en terapia de transferencia celular adoptiva, generando células T CD8+ deficientes en la expresión de CD73 con un receptor de antígeno quimérico obtenidas desde el paciente, y expandiéndolas *in vitro* para posteriormente reinfundirlas en el paciente. En relación con A2AR y el aprovechamiento de su señalización en terapias contra el cáncer, se podría evaluar si los linfocitos Tpex generados con estímulo crónico *in vitro* en presencia de IL-7 e IL-15 y de un agonista de A2AR (para favorecer la adquisición de características troncales), son más efectivos en generar protección frente a un tumor de melanoma en ratón que los linfocitos Tpex generados sin el agonista.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Taei, S., Salimu, J., Spary, L. K., Clayton, A., Lester, J. F., & Tabi, Z. (2017). Prostaglandin E. *Oncoimmunology*, 6(2), e1268308. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1268308>
- Allard, B., Pommey, S., Smyth, M. J., & Stagg, J. (2013). Targeting CD73 enhances the antitumor activity of anti-PD-1 and anti-CTLA-4 mAbs. *Clin Cancer Res*, 19(20), 5626-5635. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-13-0545>
- Angelosanto, J. M., Blackburn, S. D., Crawford, A., & Wherry, E. J. (2012). Progressive loss of memory T cell potential and commitment to exhaustion during chronic viral infection. *J Virol*, 86(15), 8161-8170. <https://doi.org/10.1128/JVI.00889-12>
- Bao, R., Shui, X., Hou, J., Li, J., Deng, X., Zhu, X., & Yang, T. (2016). Adenosine and the adenosine A2A receptor agonist, CGS21680, upregulate CD39 and CD73 expression through E2F-1 and CREB in regulatory T cells isolated from septic mice. *Int J Mol Med*, 38(3), 969-975. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2679>
- Barber, D. L., Wherry, E. J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J. P., Sharpe, A. H.,...Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*, 439(7077), 682-687. <https://doi.org/10.1038/nature04444>
- Bastid, J., Cottalorda-Regairaz, A., Alberici, G., Bonnefoy, N., Eliaou, J. F., & Bensussan, A. (2013). ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene*, 32(14), 1743-1751. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.269>
- Beavis, P. A., Milenkovski, N., Henderson, M. A., John, L. B., Allard, B., Loi, S.,...Darcy, P. K. (2015). Adenosine Receptor 2A Blockade Increases the Efficacy of Anti-PD-1 through Enhanced Antitumor T-cell Responses. *Cancer Immunol Res*, 3(5), 506-517. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.Cir-14-0211>
- Beavis, P. A., Stagg, J., Darcy, P. K., & Smyth, M. J. (2012). CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends Immunol*, 33(5), 231-237. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.02.009>
- Berner, F., Bomze, D., Diem, S., Ali, O. H., Fässler, M., Ring, S.,...Fitz, L. (2019). Association of Checkpoint Inhibitor-Induced Toxic Effects With Shared Cancer and Tissue Antigens in Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol*, 5(7), 1043-1047. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.0402>
- Blackburn, S. D., Shin, H., Freeman, G. J., & Wherry, E. J. (2008). Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by alphaPD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(39), 15016-15021. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801497105>
- Boison, D., & Yegutkin, G. G. (2019). Adenosine Metabolism: Emerging Concepts for Cancer Therapy. *Cancer Cell*, 36(6), 582-596. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.10.007>

- Bono, M. R., Fernández, D., Flores-Santibáñez, F., Roseblatt, M., & Sauma, D. (2015). CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. *FEBS Lett*, 589(22), 3454-3460. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.07.027>
- Briceño, P., Rivas-Yañez, E., Roseblatt, M. V., Parra-Tello, B., Farías, P., Vargas, L.,...Sauma, D. (2021). CD73 Ectonucleotidase Restrains CD8+ T Cell Metabolic Fitness and Anti-tumoral Activity. *Front Cell Dev Biol*, 9, 638037. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.638037>
- Brummelman, J., Mazza, E. M. C., Alvisi, G., Colombo, F. S., Grilli, A., Mikulak, J.,...Lugli, E. (2018). High-dimensional single cell analysis identifies stem-like cytotoxic CD8. *J Exp Med*, 215(10), 2520-2535. <https://doi.org/10.1084/jem.20180684>
- Caserta, S., Borger, J. G., & Zamoyska, R. (2012). Central and effector memory CD4 and CD8 T-cell responses to tumor-associated antigens. *Crit Rev Immunol*, 32(2), 97-126. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v32.i2.10>
- Cekic, C., & Linden, J. (2014). Adenosine A2A receptors intrinsically regulate CD8+ T cells in the tumor microenvironment. *Cancer Res*, 74(24), 7239-7249. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-13-3581>
- Cekic, C., Sag, D., Day, Y. J., & Linden, J. (2013). Extracellular adenosine regulates naive T cell development and peripheral maintenance. *J Exp Med*, 210(12), 2693-2706. <https://doi.org/10.1084/jem.20130249>
- Chávez-Galán, L., Arenas-Del Angel, M. C., Zenteno, E., Chávez, R., & Lascurain, R. (2009). Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol*, 6(1), 15-25. <https://doi.org/10.1038/cmi.2009.3>
- Curtsinger, J. M., & Mescher, M. F. (2010). Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr Opin Immunol*, 22(3), 333-340. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.02.013>
- Deng, W. W., Li, Y. C., Ma, S. R., Mao, L., Yu, G. T., Bu, L. L.,...Sun, Z. J. (2018). Specific blockade CD73 alters the "exhausted" phenotype of T cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, 143(6), 1494-1504. <https://doi.org/10.1002/ijc.31534>
- Dianzani, U., Redoglia, V., Bragardo, M., Attisano, C., Bianchi, A., Di Franco, D.,...Pileri, A. (1993). Co-stimulatory signal delivered by CD73 molecule to human CD45RAhiCD45ROlo (naive) CD8+ T lymphocytes. *J Immunol*, 151(8), 3961-3970.
- Esfahani, K., Roudaia, L., Buhlaiga, N., Del Rincon, S. V., Papneja, N., & Miller, W. H. (2020). A review of cancer immunotherapy: from the past, to the present, to the future. *Curr Oncol*, 27(Suppl 2), S87-S97. <https://doi.org/10.3747/co.27.5223>
- Farhood, B., Najafi, M., & Mortezaee, K. (2019). CD8. *J Cell Physiol*, 234(6), 8509-8521.

<https://doi.org/10.1002/jcp.27782>

- Flores-Santibáñez, F., Fernández, D., Meza, D., Tejón, G., Vargas, L., Varela-Nallar, L.,...Sauma, D. (2015). CD73-mediated adenosine production promotes stem cell-like properties in mouse Tc17 cells. *Immunology*, 146(4), 582-594. <https://doi.org/10.1111/imm.12529>
- Franco, F., Jaccard, A., Romero, P., Yu, Y. R., & Ho, P. C. (2020). Metabolic and epigenetic regulation of T-cell exhaustion. *Nat Metab*, 2(10), 1001-1012. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-00280-9>
- Frebel, H., Nindl, V., Schuepbach, R. A., Braunschweiler, T., Richter, K., Vogel, J.,...Oxenius, A. (2012). Programmed death 1 protects from fatal circulatory failure during systemic virus infection of mice. *J Exp Med*, 209(13), 2485-2499. <https://doi.org/10.1084/jem.20121015>
- Gabriel, S. S., Tsui, C., Chisanga, D., Weber, F., Llano-León, M., Gubser, P. M.,...Kallies, A. (2021). Transforming growth factor- β -regulated mTOR activity preserves cellular metabolism to maintain long-term T cell responses in chronic infection. *Immunity*, 54(8), 1698-1714.e1695. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.06.007>
- Gartshteyn, Y., Askanase, A. D., Song, R., Bukhari, S., Dragovich, M., Adam, K., & Mor, A. (2023). SLAMF6 compartmentalization enhances T cell functions. *Life Sci Alliance*, 6(2). <https://doi.org/10.26508/lsa.202201533>
- Gattinoni, L., Klebanoff, C. A., & Restifo, N. P. (2012). Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell. *Nat Rev Cancer*, 12(10), 671-684. <https://doi.org/10.1038/nrc3322>
- Gattinoni, L., Lugli, E., Ji, Y., Pos, Z., Paulos, C. M., Quigley, M. F.,...Restifo, N. P. (2011). A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med*, 17(10), 1290-1297. <https://doi.org/10.1038/nm.2446>
- Gattinoni, L., Zhong, X. S., Palmer, D. C., Ji, Y., Hinrichs, C. S., Yu, Z.,...Restifo, N. P. (2009). Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8+ memory stem cells. *Nat Med*, 15(7), 808-813. <https://doi.org/10.1038/nm.1982>
- Gebhardt, T., Park, S. L., & Parish, I. A. (2023). Stem-like exhausted and memory CD8(+) T cells in cancer. *Nat Rev Cancer*, 23(11), 780-798. <https://doi.org/10.1038/s41568-023-00615-0>
- GLOBOCAN. (2024). *Population factsheets: Chile 2022*. Retrieved 26 de marzo from <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/152-chile-factsheet.pdf>
- Guan, Q., Han, M., Guo, Q., Yan, F., Wang, M., Ning, Q., & Xi, D. (2023). Strategies to reinvigorate exhausted CD8(+) T cells in tumor microenvironment. *Front Immunol*, 14, 1204363. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1204363>

- Gupta, P. K., Godec, J., Wolski, D., Adland, E., Yates, K., Pauken, K. E.,...Haining, W. N. (2015). CD39 Expression Identifies Terminally Exhausted CD8+ T Cells. *PLoS Pathog*, 11(10), e1005177. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005177>
- Gutensohn, W., Resta, R., Misumi, Y., Ikehara, Y., & Thompson, L. F. (1995). Ecto-5'-nucleotidase activity is not required for T cell activation through CD73. *Cell Immunol*, 161(2), 213-217. <https://doi.org/10.1006/cimm.1995.1029>
- Hasan Ali, O., Diem, S., Markert, E., Jochum, W., Kerl, K., French, L. E.,...Flatz, L. (2016). Characterization of nivolumab-associated skin reactions in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology*, 5(11), e1231292. <https://doi.org/10.1080/2162402x.2016.1231292>
- Hashimoto, M., Kamphorst, A. O., Im, S. J., Kissick, H. T., Pillai, R. N., Ramalingam, S. S.,...Ahmed, R. (2018). CD8 T Cell Exhaustion in Chronic Infection and Cancer: Opportunities for Interventions. *Annu Rev Med*, 69, 301-318. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-012017-043208>
- Jansen, C. S., Prokhnjevskaja, N., Master, V. A., Sanda, M. G., Carlisle, J. W., Bilen, M. A.,...Kissick, H. (2019). An intra-tumoral niche maintains and differentiates stem-like CD8 T cells. *Nature*, 576(7787), 465-470. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1836-5>
- Jing, X. Z., Yuan, X. Z., Luo, X., Zhang, S. Y., & Wang, X. P. (2023). An Update on Nondopaminergic Treatments for Motor and Non-motor Symptoms of Parkinson's Disease. *Curr Neuroparmacol*, 21(8), 1806-1826. <https://doi.org/10.2174/1570159x20666220222150811>
- Kallies, A., Zehn, D., & Utzschneider, D. T. (2020). Precursor exhausted T cells: key to successful immunotherapy? *Nat Rev Immunol*, 20(2), 128-136. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0223-7>
- Kaminski, H., Lemoine, M., & Pradeu, T. (2021). Immunological exhaustion: How to make a disparate concept operational? *PLoS Pathog*, 17(9), e1009892. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009892>
- Khalil, D. N., Smith, E. L., Brentjens, R. J., & Wolchok, J. D. (2016). The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 13(5), 273-290. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.25>
- Khan, O., Giles, J. R., McDonald, S., Manne, S., Ngiow, S. F., Patel, K. P.,...Wherry, E. J. (2019). TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8. *Nature*, 571(7764), 211-218. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1325-x>
- Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2001). Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell*, 106(3), 263-266. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00455-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00455-x)
- Lee, J., Lee, K., Bae, H., Lee, K., Lee, S., Ma, J.,...Im, S. J. (2023). IL-15 promotes self-renewal of progenitor exhausted CD8 T cells during persistent antigenic

stimulation. *Front Immunol*, 14, 1117092.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1117092>

- Lee, S. W., Lee, G. W., Kim, H. O., & Cho, J. H. (2023). Shaping Heterogeneity of Naive CD8. *Immune Netw*, 23(1), e2. <https://doi.org/10.4110/in.2023.23.e2>
- Leone, R. D., Sun, I. M., Oh, M. H., Sun, I. H., Wen, J., Englert, J., & Powell, J. D. (2018). Inhibition of the adenosine A2a receptor modulates expression of T cell coinhibitory receptors and improves effector function for enhanced checkpoint blockade and ACT in murine cancer models. *Cancer Immunol Immunother*, 67(8), 1271-1284. <https://doi.org/10.1007/s00262-018-2186-0>
- Li, H., van der Leun, A. M., Yofe, I., Lubling, Y., Gelbard-Solodkin, D., van Akkooi, A. C. J.,...Amit, I. (2019). Dysfunctional CD8 T Cells Form a Proliferative, Dynamically Regulated Compartment within Human Melanoma. *Cell*, 176(4), 775-789.e718. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.043>
- Martinez-Usatorre, A., Carmona, S. J., Godfroid, C., Yacoub Maroun, C., Labiano, S., & Romero, P. (2020). Enhanced Phenotype Definition for Precision Isolation of Precursor Exhausted Tumor-Infiltrating CD8 T Cells. *Front Immunol*, 11, 340. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00340>
- Massaia, M., Perrin, L., Bianchi, A., Ruedi, J., Attisano, C., Altieri, D.,...Thompson, L. F. (1990). Human T cell activation. Synergy between CD73 (ecto-5'-nucleotidase) and signals delivered through CD3 and CD2 molecules. *J Immunol*, 145(6), 1664-1674.
- Mastelic-Gavillet, B., Navarro Rodrigo, B., Décombaz, L., Wang, H., Ercolano, G., Ahmed, R.,...Vigano, S. (2019). Adenosine mediates functional and metabolic suppression of peripheral and tumor-infiltrating CD8. *J Immunother Cancer*, 7(1), 257. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0719-5>
- McKinney, E. F., Lee, J. C., Jayne, D. R., Lyons, P. A., & Smith, K. G. (2015). T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection. *Nature*, 523(7562), 612-616. <https://doi.org/10.1038/nature14468>
- Miller, B. C., Sen, D. R., Al Aboosy, R., Bi, K., Virkud, Y. V., LaFleur, M. W.,...Haining, W. N. (2019). Subsets of exhausted CD8(+) T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *Nat Immunol*, 20(3), 326-336. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0312-6>
- Mushtaq, M., Kovalevska, L., Darekar, S., Abramsson, A., Zetterberg, H., Kashuba, V.,...Kashuba, E. (2020). Cell stemness is maintained upon concurrent expression of RB and the mitochondrial ribosomal protein S18-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(27), 15673-15683. <https://doi.org/10.1073/pnas.1922535117>
- Myojin, Y., McCallen, J. D., Ma, C., Bauer, K. C., Ruf, B., Benmehbarek, M. R., ... & Greten, T. F. . (2023). Adenosine A2a receptor inhibition increases the anti-tumor efficacy of anti-PD1 treatment in murine hepatobiliary cancers. *JHEP Reports*, Volume

6(1).

- Nakajima, Y., Chamoto, K., Oura, T., & Honjo, T. (2021). Critical role of the CD44(low)CD62L(low) CD8(+) T cell subset in restoring antitumor immunity in aged mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118(23). <https://doi.org/10.1073/pnas.2103730118>
- Odorizzi, P. M., Pauken, K. E., Paley, M. A., Sharpe, A., & Wherry, E. J. (2015). Genetic absence of PD-1 promotes accumulation of terminally differentiated exhausted CD8+ T cells. *J Exp Med*, 212(7), 1125-1137. <https://doi.org/10.1084/jem.20142237>
- Ohta, A., Gorelik, E., Prasad, S. J., Ronchese, F., Lukashev, D., Wong, M. K.,...Sitkovsky, M. (2006). A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 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. *J Immunol*, 183(9), 5487-5493. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901247>
- Parish, I. A., & Kaech, S. M. (2009). Diversity in CD8(+) T cell differentiation. *Curr Opin Immunol*, 21(3), 291-297. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.05.008>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Rasmussen, R. (2001). Quantification on the LightCycler. In S. Meuer, C. Wittwer, & K.-I. Nakagawara (Eds.), *Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications* (pp. 21-34). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59524-0_3
- Resta, R., Hooker, S. W., Laurent, A. B., Shuck, J. K., Misumi, Y., Ikehara, Y.,...Thompson, L. F. (1994). Glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor is not required for T cell activation through CD73. *J Immunol*, 153(3), 1046-1053.
- Resta, R., & Thompson, L. F. (1997). T cell signalling through CD73. *Cell Signal*, 9(2), 131-139. [https://doi.org/10.1016/s0898-6568\(96\)00132-5](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(96)00132-5)
- Resta, R., Yamashita, Y., & Thompson, L. F. (1998). Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol Rev*, 161, 95-109. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1998.tb01574.x>
- Restifo, N. P., Dudley, M. E., & Rosenberg, S. A. (2012). Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol*, 12(4), 269-281. <https://doi.org/10.1038/nri3191>
- Restifo, N. P., & Gattinoni, L. (2013). Lineage relationship of effector and memory T cells.

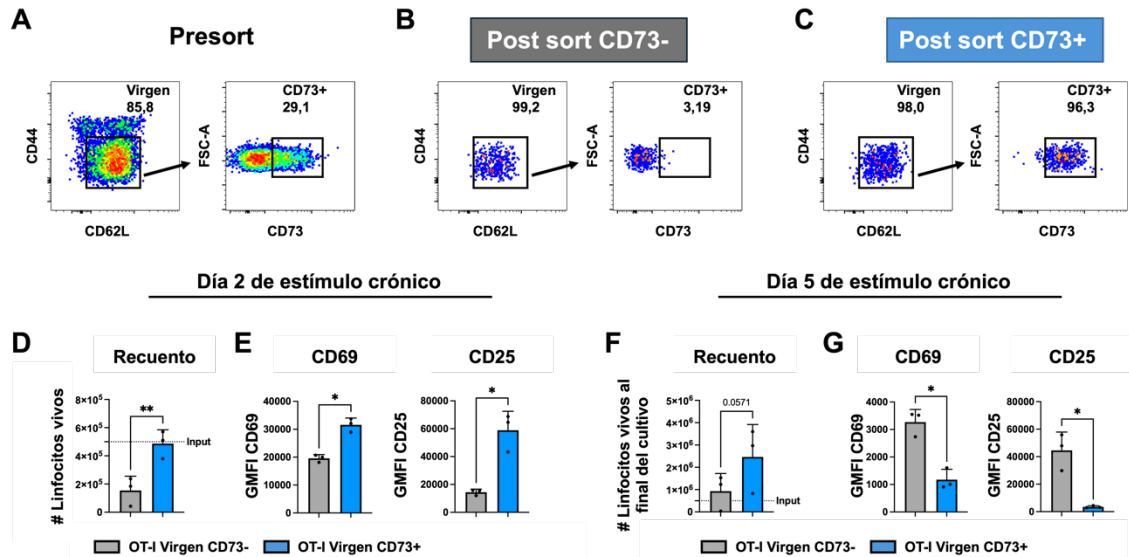
Curr Opin Immunol, 25(5), 556-563. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.09.003>

- Roseblatt, M. V., Parra-Tello, B., Briceño, P., Rivas-Yáñez, E., Tucer, S., Saavedra-Almarza, J.,...Sauma, D. (2021). Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) Regulates the Survival of CD8+ T Cells. *Front Cell Dev Biol*, 9, 647058. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.647058>
- Rudloff, M. W., Zumbo, P., Favret, N. R., Roetman, J. J., Detrés Román, C. R., Erwin, M. M.,...Philip, M. (2023). Hallmarks of CD8+ T cell dysfunction are established within hours of tumor antigen encounter before cell division. *Nature Immunology*, 24(9), 1527-1539. <https://doi.org/10.1038/s41590-023-01578-y>
- Sade-Feldman, M., Yizhak, K., Bjorgaard, S. L., Ray, J. P., de Boer, C. G., Jenkins, R. W.,...Hacohen, N. (2018). Defining T Cell States Associated with Response to Checkpoint Immunotherapy in Melanoma. *Cell*, 175(4), 998-1013.e1020. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.038>
- Sambi, M., Bagheri, L., & Szewczuk, M. R. (2019). Current Challenges in Cancer Immunotherapy: Multimodal Approaches to Improve Efficacy and Patient Response Rates. *J Oncol*, 2019, 4508794. <https://doi.org/10.1155/2019/4508794>
- Samji, T., & Khanna, K. M. (2017). Understanding memory CD8. *Immunol Lett*, 185, 32-39. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.02.012>
- Scott, A. C., Dündar, F., Zumbo, P., Chandran, S. S., Klebanoff, C. A., Shakiba, M.,...Schietinger, A. (2019). TOX is a critical regulator of tumour-specific T cell differentiation. *Nature*, 571(7764), 270-274. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1324-y>
- Seder, R. A., Darrah, P. A., & Roederer, M. (2008). T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol*, 8(4), 247-258. <https://doi.org/10.1038/nri2274>
- Seo, W., Jerin, C., & Nishikawa, H. (2021). Transcriptional regulatory network for the establishment of CD8. *Exp Mol Med*, 53(2), 202-209. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00568-0>
- Shore, N. D. (2015). Advances in the understanding of cancer immunotherapy. *BJU Int*, 116(3), 321-329. <https://doi.org/10.1111/bju.12692>
- Siddiqui, I., Schaeuble, K., Chennupati, V., Fuertes Marraco, S. A., Calderon-Copete, S., Pais Ferreira, D.,...Held, W. (2019). Intratumoral Tcf1. *Immunity*, 50(1), 195-211.e110. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.12.021>
- Sorrentino, C., Hossain, F., Rodriguez, P. C., Sierra, R. A., Pannuti, A., Osborne, B. A.,...Morello, S. (2019). Adenosine A2A Receptor Stimulation Inhibits TCR-Induced Notch1 Activation in CD8+T-Cells. *Front Immunol*, 10, 162. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00162>

- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Thompson, L. F., Eltzschig, H. K., Ibla, J. C., Van De Wiele, C. J., Resta, R., Morote-Garcia, J. C., & Colgan, S. P. (2004). Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J Exp Med*, 200(11), 1395-1405. <https://doi.org/10.1084/jem.20040915>
- Thompson, L. F., & Ruedi, J. M. (1989). Functional characterization of ecto-5'-nucleotidase-positive and -negative human T lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 142(5), 1518-1522. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.142.5.1518>
- Thompson, L. F., Ruedi, J. M., Glass, A., Low, M. G., & Lucas, A. H. (1989). Antibodies to 5'-nucleotidase (CD73), a glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein, cause human peripheral blood T cells to proliferate. *J Immunol*, 143(6), 1815-1821.
- Thomson, L. F., Ruedi, J. M., Glass, A., Moldenhauer, G., Moller, P., Low, M. G.,...Lucas, A. H. (1990). Production and characterization of monoclonal antibodies to the glycosyl phosphatidylinositol-anchored lymphocyte differentiation antigen ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Tissue Antigens*, 35(1), 9-19. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.1990.tb01750.x>
- Todd, K. L., Lai, J., Sek, K., Huang, Y. K., Newman, D. M., Derrick, E. B.,...Beavis, P. A. (2023). A(2A)R eGFP reporter mouse enables elucidation of A(2A)R expression dynamics during anti-tumor immune responses. *Nat Commun*, 14(1), 6990. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42734-0>
- Vijayan, D., Young, A., Teng, M. W. L., & Smyth, M. J. (2017). Targeting immunosuppressive adenosine in cancer. *Nat Rev Cancer*, 17(12), 709-724. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.86>
- Wang, X., Zhang, T., Song, Z., Li, L., Zhang, X., Liu, J.,...Zhang, H. (2019). Tumor CD73/A2aR adenosine immunosuppressive axis and tumor-infiltrating lymphocytes in diffuse large B-cell lymphoma: correlations with clinicopathological characteristics and clinical outcome. *Int J Cancer*, 145(5), 1414-1422. <https://doi.org/10.1002/ijc.32144>
- Wang, Y., Copeland, J., Shin, M., Chang, Y., & Venton, B. J. (2020). CD73 or CD39 Deletion Reveals Different Mechanisms of Formation for Spontaneous and Mechanically Stimulated Adenosine and Sex Specific Compensations in ATP Degradation. *ACS Chem Neurosci*, 11(6), 919-928. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.9b00620>
- Willingham, S. B., Hotson, A. N., & Miller, R. A. (2020). Targeting the A2AR in cancer; early lessons from the clinic. *Curr Opin Pharmacol*, 53, 126-133. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2020.08.003>

- Yamashita, Y., Hooker, S. W., Jiang, H., Laurent, A. B., Resta, R., Khare, K.,...Thompson, L. F. (1998). CD73 expression and fyn-dependent signaling on murine lymphocytes. *Eur J Immunol*, 28(10), 2981-2990. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199810\)28:10<2981::AID-IMMU2981>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199810)28:10<2981::AID-IMMU2981>3.0.CO;2-D)
- Zhang, N., & Bevan, M. J. (2011). CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity*, 35(2), 161-168. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.07.010>
- Zhang, T., Liu, H., Jiao, L., Zhang, Z., He, J., Li, L.,...Wang, X. (2022). Genetic characteristics involving the PD-1/PD-L1/L2 and CD73/A2aR axes and the immunosuppressive microenvironment in DLBCL. *J Immunother Cancer*, 10(4). <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-004114>
- Zhao, M., Kiernan, C. H., Stairiker, C. J., Hope, J. L., Leon, L. G., van Meurs, M.,...Katsikis, P. D. (2020). Rapid in vitro generation of bona fide exhausted CD8+ T cells is accompanied by Tcf7 promoter methylation. *PLoS Pathog*, 16(6), e1008555. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008555>
- Zhou, X., Yu, S., Zhao, D. M., Harty, J. T., Badovinac, V. P., & Xue, H. H. (2010). Differentiation and persistence of memory CD8(+) T cells depend on T cell factor 1. *Immunity*, 33(2), 229-240. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.08.002>

8. ANEXO



Anexo 1. La expresión de CD73 en los linfocitos T CD8+ vírgenes acelera su activación bajo estímulo antigénico crónico *in vitro*.

Linfocitos OT-I vírgenes (CD3+CD8+CD44-CD62L+) CD73- y CD73+ fueron sorteados y activados de forma crónica *in vitro* y se analizó la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD25 por citometría de flujo al día 2 y 5 de iniciado el cultivo. **A.** Citometría de flujo representativa de los linfocitos OT-I antes del *sorting*. **B.** Citometría de flujo representativa de los linfocitos OT-I vírgenes CD73- posterior al *sorting*. **C.** Citometría de flujo representativa de los linfocitos OT-I vírgenes CD73+ posterior al *sorting*. **D.** Recuento celular al día 2 del cultivo por cada 5×10^5 células de input. **E.** gMFI de CD69 (izquierda) y CD25 (derecha) al día 2 del cultivo iniciado con las células indicadas. **F.** Recuento celular al día 5 del cultivo por cada 5×10^5 células de input. **G.** gMFI de CD69 (izquierda) y CD25 (derecha) al día 5 del cultivo iniciado con las células indicadas. **D-G.** n=3, t-test pareado. * p < 0,05, ** p < 0,01.