

“Estudio de los mecanismos metabólicos y moleculares que participan en la activación del Linfocito T CD4 y su impacto en la respuesta inmune durante la infección por *Trypanosoma cruzi*”.

Bioquímica Yamile Ana

2021



C I B I C I

**CIBICI**  
Centro de Investigaciones en  
Bioquímica Clínica e Inmunología





Universidad  
Nacional  
de Córdoba

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
Departamento de Bioquímica Clínica



Tesis doctoral  
Doctorado en Ciencias Químicas  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Nacional de Córdoba

“Estudio de los mecanismos metabólicos y moleculares que participan en la activación del Linfocito T CD4 y su impacto en la respuesta inmune durante la infección por *Trypanosoma cruzi*”.

Bioquímica Yamile Ana

2021

## Directora

**Dra. Cinthia Carolina Stempin**

*Investigadora Adjunta (CONICET)*

*Centro de Investigación en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)*

*Profesora Adjunta, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.*

## Comisión Asesora de Tesis

**Dra. María Carolina Touz**

*Investigadora Independiente (CONICET)*

*Laboratorio de Microbiología e Inmunología del Instituto Ferreyra.*

**Dra. Carolina Lucía Montes**

*Investigadora Independiente (CONICET)*

*Centro de Investigación en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)*

*Profesora Asociada, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba*

**Dr. José Luis Daniotti**

*Investigador Principal (CONICET)*

*Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC)*

*Profesor Titular de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.*

## Evaluadora Externa

**Dra. Karina Andrea Gómez**

*Investigadora Independiente (CONICET)*

*Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular "Dr. Héctor N. Torres" -  
(INGEBI)*



*Esta tesis doctoral fue desarrollada en el*

*Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas,  
Universidad Nacional de Córdoba.*

*Centro de Investigación en Bioquímica Clínica e Inmunología  
(CIBICI)*

*Este trabajo de tesis fue financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SeCyT-UNC) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT-FonCyT).*





## AGRADECIMIENTOS

Ciertamente, los logros que alcanzamos nunca son individuales. Son el resultado innegable de la colaboración de muchas personas, que, en mi experiencia, aportaron no solo su conocimiento y trabajo, sino predisposición, compañerismo y, sobre todo, corazón.

Agradezco a mi comisión asesora, que me brindó un acompañamiento excepcional, siempre con valiosos aportes a mi trabajo desde su vasta experiencia y destacada trayectoria. Gracias Carolina Montes, Carolina Touz y José Luis Daniotti por estos años que compartimos.

Gracias a la Dra. Karina Gómez, que tan amablemente aceptó evaluar esta tesis doctoral. Es un honor para mí, considerando la excelencia de su trayectoria.

Agradezco a todo el instituto por haberme brindado el espacio para realizar este trabajo de tesis, a todos los servicios y el personal técnico que hacen posible el desarrollo de cada uno de los proyectos. Gracias al personal de cultivo celular, al personal de bioterio, y al servicio de citometría.

Quisiera agradecerle a mi directora Cinthia, por haber confiado en mí y por haberme hecho tal espacio donde el trabajo cotidiano se transformó en un real trabajo en equipo. Gracias por todo lo que me enseñaste a diario, por trabajar codo a codo siempre que era necesario, y por estar pendiente de lo que necesitara. Tu acompañamiento fue esencial. También, gracias por enseñarme a través de tu generosidad, que la ciencia es una construcción comunitaria y que un trabajo contributivo es, siempre, un trabajo de excelencia. Tu incansable dedicación a la docencia y tu intención constante de ser y hacer cada vez mejor, convierten tu tarea en una verdadera inspiración y motivación.

Quiero agradecerle a Fabio, por haberme incluido en su grupo dándome un voto de confianza. Gracias por haberme hecho sentir parte de ustedes desde el primer día. Gracias por estar dispuesto siempre que necesité de tu consejo, y por transmitirnos tan generosamente tu experiencia. La calidez del grupo hace que el trabajo sea más disfrutable.

Gracias Pilar y Cristina por estar a disposición, por proveernos ese ambiente de confianza y diálogo dentro del laboratorio. Adri y Eva, gracias por su generosidad y por su compromiso con cada miembro del instituto, por el paradigma cooperativo que practican a diario, y gracias por su calidez humana en el trabajo cotidiano y en nuestra formación como docentes. Las admiro profundamente.

Deivid querido, éste va a ser un agradecimiento más de los otros tantos que ya te he hecho. Creo que tu bondad y amistad fueron el eslabón clave para vincularme con ese mundo nuevo al que estaba entrando. Tu capacidad de incluir, de hacer parte al otro, tu humildad y tu pedagogía, hicieron que me tome poco tiempo darme cuenta que ahí era donde quería estar. Gracias, por el día a día, por compartir, por las risas. Gracias por tu generosidad, por tu guía y por habernos regalado a diario tu genuinidad tan hermosa.

Elita de mi corazón, tu compañerismo no tiene fronteras. Trabajar con vos es saber que vamos a pasar el mejor de los ratos. Poder disfrutar de tu sonrisa inagotable, tu abrazo matutino, tu acompañamiento incansable y tu compromiso con el trabajo de todos es un regalo, definitivamente. Aprendí tanto de vos, no solo laboral, sino personalmente. Sabes que te admiro y te agradezco tu generosidad conmigo siempre.

A mi querido 103, que fue y es, sin dudas, el mayor tesoro que me llevo de este doctorado. Esa cultura del amor que me enseñaron: amor por el trabajo y el conocimiento, amor por la enseñanza, y amor por la justicia. Con ustedes aprendí que lo más importante es la causa, que si estamos juntxs los logros son mayores, que, aunque las cosas vayan mal, el saldo siempre es positivo. Capitalizar los momentos negativos en buenas experiencias fue fácil porque siempre estuvieron ustedes. No sentirse solo en este mundo de presiones y desgaste hace que una pueda seguir, y seguir feliz. Todxs para unx y unx para todxs. Ustedes son resiliencia. Son un bálsamo de alegría y amistad entre tanta dificultad. Gracias por tantas luchas compartidas, por sembrar el compromiso con el otrx, por convivir en una real comunidad donde todxs somos parte de algo mucho más grande que nosotrxs mismos. Gracias por esta amistad llena de aceptación y cariño. Cada unx tiene un lugar muy importante en mi corazón. Gracias Cris, Facu, Fer Canale, Cinti, Fer Suárez, Loli, Flaquito y Xime, por acogerme y mostrarme su mundo hermoso. Gracias a mis contemporánexs Natu, Sabri, Coquita, Santi, Lalita, por nuestro cluster de comprensión y amor; gracias Carito, Belu, Biri y Yami, por su cariño, por las risas y los abrazos. Encontrar tanta gente hermosa en el mismo lugar parecía una utopía hasta que conocí el 103.

Gracias a mis amigas y amigos de la vida, porque caminar con su afecto y contención hace que todo sea posible, que nada sea tan difícil y que todo valga el esfuerzo. Gracias Pipucha, mi hermana de la vida, por andar incondicionalmente juntas esta vida. Gracias por su amor y amistad.

Nito, gracias por tu compañía y empatía en este camino que a veces es complicado. Por elegir compartir la vida y por el amor y compañerismo que me brindas a diario. También gracias por ser una inspiración y por haberme enseñado tantas cosas sobre la vida. Te admiro profundamente. A mi Pupita, agradezco por alegrarme la vida desde el día en que llegó. Gracias a vos y a la Pupi por la vida en familia que disfrutamos.

Gracias a mi familia, a mis abuelos que siempre me acompañaron, apoyaron y alentaron, y están presentes en cada paso que doy.

Gracias a mi mamá y a mi papá, porque les debo todo lo que soy. Gracias por sus ejemplos de trabajo arduo, por la tenacidad en todo lo que emprendieron siempre, por enseñarme que las cosas se hacen bien, o no se hacen. Por darme todas las herramientas para enfrentar la vida. Pero, sobre todo, por creer en mí siempre. Por apoyarme incondicionalmente en todo lo que me propuse y por su amor que para mí es una fuente inagotable de motivación y vida. Los abrazos de mi mamá y las risas de mi papá son los regalos más hermosos. Los admiro desde siempre y para siempre. Gracias a mi hermana, Meli, que es de las personas que más admiro y más me ha enseñado, con su fortaleza sin igual y su bondad tan enorme, y a mis sobrinas Uma y Fran, lo más hermoso de mi vida, por darle sentido a todo. Gracias por su apoyo incondicional y por acompañarme día a día, siempre dándome alegría y tantas razones que me dan la certeza de que soy feliz. Estoy muy orgullosa de ustedes.

Y finalmente, gracias a mi país por darme esta oportunidad que me posiciona en el privilegio de haber sido parte de la ciencia en este territorio tan maravilloso. Espero poder retribuir todo que recibí.

Simplemente, gracias.

# Índice general

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
Desarrollo de la Respuesta inmune .....	9
Activación de Linfocitos T CD4 .....	10
Señales iniciales.....	10
Vías metabólicas.....	13
Vías metabólicas involucradas en la activación y función de células T CD4 .....	16
Producción de especies reactivas del oxígeno (ROS).....	23
Mecanismos de control de los niveles de ROSm.....	27
Proteínas desacoplantes .....	28
Sistemas antioxidantes.....	30
Dinámica mitocondrial .....	34
Fusión y fisión.....	34
Mitofagia .....	37
Tratamientos antioxidantes .....	39
N-Acetil cisteína (NAC) .....	40
Ribósido de Nicotinamida .....	41
Enfermedad de Chagas .....	42
Epidemiología.....	42
Historia natural de la infección .....	43
Respuesta inmune en la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	45
<b>ANTECEDENTES E HIPÓTESIS</b> .....	<b>49</b>
Objetivos .....	50
Objetivo general.....	50
Objetivos específicos.....	50
<b>RESULTADOS I</b> .....	<b>51</b>
Perfil metabólico y estado mitocondrial de células T CD4 durante la infección por <i>T. cruzi</i> .....	51
1. Las células T CD4 provenientes de ratones infectados en la fase aguda presentan un metabolismo exacerbado.....	52

2. Durante la FA de la infección por <i>T. cruzi</i> se evidencia una acumulación de mitocondrias disfuncionales en células T CD4. ....	59
3. La acumulación de mitocondrias disfuncionales podría deberse a alteraciones en la dinámica mitocondrial y a un defecto en el flujo mitofágico. ....	68
Conclusiones capítulo I.....	73
<b>RESULTADOS II .....</b>	<b>74</b>
Caracterización del fenotipo de linfocitos T CD4 con daño mitocondrial.....	74
1.El daño mitocondrial observado durante la FA de la infección se evidencia en células T CD4 activadas.....	75
Conclusiones capítulo II.....	84
<b>RESULTADOS III .....</b>	<b>85</b>
Impacto de las especies reactivas del oxígeno mitocondriales en la funcionalidad de células T CD4 .....	85
1. La funcionalidad de la célula T CD4 que expresa PD-1 y produce ROSm, se ve disminuida durante la FA de la infección.....	86
2. Una alta tasa de apoptosis prevalece en la población de células T CD4 con daño mitocondrial. ....	87
3. La expresión de sistemas antioxidantes se encuentra incrementada en las células T CD4 durante la infección. ....	89
4. La contribución exógena del antioxidante N-acetil cisteína (NAC) previene la apoptosis en células T CD4 de ratones infectados en FA. ....	92
Conclusiones capítulo III.....	96
<b>RESULTADOS IV .....</b>	<b>97</b>
Eventos desencadenantes del daño mitocondrial en las células T CD4 en la infección por <i>T. cruzi</i> .....	97
1. Eventos desencadenantes del daño mitocondrial en las células T CD4 durante la infección por <i>T. cruzi</i> .....	98
Conclusiones capítulo IV .....	106
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>107</b>
<b>CONCLUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>120</b>
<b>PROYECCIONES.....</b>	<b>123</b>
<b>GLOSARIO .....</b>	<b>124</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>127</b>
Modelo de infección con <i>T. cruzi</i> en ratón.....	127
Modelo experimental.....	127
Aislamiento de esplenocitos .....	127

Purificación de células T CD4 .....	128
Transferencia adoptiva e inmunización .....	128
Cultivo celular.....	129
Ensayos de Seahorse .....	129
Prueba de estrés mitocondrial .....	129
Ensayo de determinación de la tasa de glucólisis .....	130
Citometría de flujo .....	131
Tinción de superficie .....	131
Tinción de intracelular.....	132
Determinación de viabilidad .....	132
Parámetros mitocondriales.....	132
Especies reactivas del O <sub>2</sub> mitocondriales.....	132
Apoptosis.....	133
Captación de glucosa.....	133
Microscopía de epifluorescencia.....	133
Microscopía confocal .....	134
Evaluación de mitofagia .....	134
Western Blotting .....	135
Tratamiento <i>in vitro</i> con N-Acetil Cisteína (NAC).....	136
Purificación de poblaciones mediante clasificación o “ <i>cell sorting</i> ” .....	136
Determinación de citoquinas por ELISA .....	136
Microscopía electrónica de transmisión .....	137
Tratamientos <i>in vivo</i> .....	137
Declaraciones éticas para el modelo animal.....	137
Análisis de datos.....	138
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>141</b>
<b>PRODUCCIÓN CIENTÍFICA .....</b>	<b>152</b>

## Índice de figuras (Introducción)

<b>Figura In 1.</b> Señales iniciales que conducen a la activación del Linfocito T. ....	12
<b>Figura In 2.</b> Vías metabólicas implicadas en la biología celular. ....	16
<b>Figura In 3.</b> Reprogramación metabólica de Linfocitos T como consecuencia de su activación. ....	18

<b>Figura In 4.</b> Vías de señalización que tienen lugar tras la activación del linfocito T.....	19
<b>Figura In 5.</b> Características metabólicas durante las distintas fases de la respuesta de células T. ..	20
<b>Figura In 6.</b> Vías metabólicas involucradas en los distintos subtipos de linfocitos T. ....	23
<b>Figura In 7.</b> Hiperpolarización de la membrana mitocondrial y generación de ROSm.....	24
<b>Figura In 8.</b> Producción de ROS inducida por señalización vía TCR: efectos en la activación.....	27
<b>Figura In 9.</b> Expresión de UCPs y control de la producción de superóxido (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ). ....	29
<b>Figura In 10.</b> Enzimas antioxidantes. ....	32
<b>Figura In 11.</b> Síntesis del GSH.....	33
<b>Figura In 12.</b> El balance ROS/GSH permite un correcto control de los reguladores transcripcionales durante la activación de células T. ....	34
<b>Figura In 13.</b> Dinámica mitocondrial.....	37
<b>Figura In 14.</b> Mecanismos de mitofagia.....	39
<b>Figura In 15.</b> Historia natural de la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i> . ....	44
<b>Figura In 16.</b> Respuesta inmune frente a la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	48

## Índice de figuras (Resultados)

<b>Figura 1.</b> Las células T CD4 de animales infectados evidencian una incrementada captación de glucosa y durante la FA tienen mayor expresión de CD98. ....	54
<b>Figura 2.</b> Durante la FA de la infección, las células T CD4 presentan un metabolismo glucolítico exacerbado.....	56
<b>Figura 3.</b> Durante la FA de la infección, las células T CD4 presentan un metabolismo altamente oxidativo.....	58
<b>Figura 4.</b> Durante la FA de la infección se evidenció un incremento en la producción de ROSm. ...	60
<b>Figura 5.</b> Durante la FA de la infección se encuentra incrementada la frecuencia de linfocitos T CD4 con depolarización mitocondrial.....	61
<b>Figura 6.</b> Las células productoras de ROSm evidencian depolarización mitocondrial y hay una mayor frecuencia de dicha población durante la FA de la infección por <i>T. cruzi</i> .....	64
<b>Figura 7.</b> La depolarización mitocondrial evidenciada durante la FA en células T CD4, es precedida por una hiperpolarización a tiempos iniciales de la infección. ....	66
<b>Figura 8.</b> Las células T CD4 acumulan mitocondrias depolarizadas durante la FA de la infección...	67

<b>Figura 9.</b> Durante la FA de la infección las células T CD4 presentan diferencias en la morfología mitocondrial. ....	68
<b>Figura 10.</b> Células T CD4 de ratones infectados evidencian una incrementada expresión de OPA1. ....	70
<b>Figura 11.</b> Flujo mitofágico reducido a nivel lisosomal en células T CD4 de la FA de la infección. ..	72
<b>Figura 12.</b> Las células T CD4 convencionales constituyen la población productora de ROSm, y durante la FA de la infección las células efectoras presentan mayor frecuencia de depolarización mitocondrial. ....	76
<b>Figura 13.</b> Durante la FA hay una alta frecuencia de células T CD4 CD11a+CD49d- que producen ROSm. ....	78
<b>Figura 14.</b> El potencial de membrana mitocondrial disminuye a medida que incrementa la producción de ROSm en células T CD4 activadas durante la infección por <i>T. cruzi</i> . ....	80
<b>Figura 15.</b> La producción de ROSm se correlaciona negativamente con la captación de glucosa en las células T CD4 activadas. ....	81
<b>Figura 16.</b> Durante la FA se encuentra incrementada la frecuencia de células T CD4 con depolarización mitocondrial que expresan PD-1 y producen ROSm. ....	82
<b>Figura 17.</b> Las células T CD4 productoras de ROSm que expresan PD-1 presentan menor capacidad de liberar IL-2 y de proliferar. ....	87
<b>Figura 18.</b> La frecuencia de células apoptóticas es significativamente mayor en células T CD4 de ratones en FA de la infección, que presentan depolarización mitocondrial. ....	88
<b>Figura 19.</b> Incrementada expresión nuclear de FOXO3A en las células T CD4 de ratones infectados. ....	90
<b>Figura 20.</b> Incremento en la expresión de SOD2 y citocromo c durante la FA de la infección. ....	91
<b>Figura 21.</b> El agregado de NAC a linfocitos T CD4 provenientes de ratones infectados en FA, previene su apoptosis. ....	92
<b>Figura 22.</b> El tratamiento con NR disminuye la frecuencia de células con mitocondria depolarizada y la apoptosis durante la FA de la infección. ....	94
<b>Figura 23.</b> Esquema experimental de infección en ratones OT-II y C57BL/6. ....	98
<b>Figura 24.</b> La señalización a través del TCR es requerida para la producción de ROSm y la generación de daño mitocondrial durante la FA de la infección. ....	100
<b>Figura 25.</b> Esquema experimental diseñado para comparar los eventos desencadenados por activación de células T CD4 en la FA de la infección, con una inmunización. ....	101

<b>Figura 26.</b> Activación de células T CD4 en animales inmunizados e infectados. ....	102
<b>Figura 27.</b> Las células T CD4 OT-II de animales TI incrementan la expresión de ROSm y la frecuencia de células productoras de ROSm, al igual que las células T CD4 de ratones infectados en FA. ....	103
<b>Figura 28.</b> Las células T CD4 OT-II CD44+ de animales TI no presentan daño mitocondrial, a pesar de tener un incremento en la producción de ROSm.....	104
<b>Figura 29.</b> La frecuencia de células T CD4 CD44+ apoptóticas aumenta significativamente durante la FA de la infección y no así en el modelo de inmunización.....	105
<b>Figura 30.</b> Análisis de Componentes Principales (ACP).....	120
<b>Figura 31.</b> Resumen gráfico. ....	122



## RESUMEN

La enfermedad de Chagas fue catalogada en 2005 por la OMS, como una de las enfermedades tropicales desatendidas del mundo. Su prevalencia e incidencia se han incrementado no solo en los países donde la transmisión es principalmente vectorial, sino también en países no endémicos como consecuencia de la globalización. Si bien se conoce que las complicaciones de la infección crónica ocurren en un 30-40% de los infectados, se estima que a causa del sub-diagnóstico, la falta de consultas y controles de las personas o de la reducida sensibilidad de las pruebas que se realizan, podría ser mayor. De hecho, constituye una enfermedad inhabilitante, con un gran deterioro en la calidad de vida y una alta tasa de mortalidad.

Los tratamientos son escasos, y es necesario profundizar en los mecanismos que conducen a la infección crónica persistente de modo que sea posible descubrir objetivos terapéuticos eficaces ya sea para mejorar el pronóstico y destino de la patología o en un mejor escenario, para erradicar la infección.

A pesar de décadas dedicadas al estudio de la respuesta inmune frente a esta infección, poco se conoce sobre las causas que conducen a los defectos en la respuesta efectora. En este trabajo de tesis doctoral nos enfocamos en el fenotipo metabólico y mitocondrial que adquiere la célula T CD4 durante la infección y sus repercusiones funcionales, que podrían explicar las fallas en dicho compartimiento celular.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis demuestran que, durante la fase aguda de la infección, los linfocitos T CD4 adquieren un perfil metabólico glucolítico y oxidativo exacerbado con altos niveles de especies reactivas del oxígeno mitocondrial (ROSm) cuya acumulación se evidencia desde tiempos tempranos de la infección. Los altos niveles de ROSm observados durante la fase aguda se correlacionan con un incremento en la depolarización o daño mitocondrial. Observamos que las células T CD4 efectoras se ven fuertemente afectadas con estas alteraciones durante la fase aguda de la infección. Estas células, además, presentan menor funcionalidad y son más susceptibles a la apoptosis. Esta última podría relacionarse a un déficit de sistemas antioxidantes, así como a alteraciones en la dinámica mitocondrial. En este sentido, el tratamiento *in vitro* con el antioxidante NAC, redujo la apoptosis en células T CD4 con daño mitocondrial. Adicionalmente, el tratamiento *in vivo* durante la fase aguda de la infección con ribósido de nicotinamida (NR), un precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) que es capaz de

estimular la mitofagia, disminuyó la frecuencia de células T CD4 con mitocondria depolarizada y productoras de ROSm. Más aún, demostramos que los defectos mitocondriales son dependientes de la señalización del TCR y están relacionados al contexto de la infección, ya que no se producen en un modelo de inmunización.

En conjunto, estos resultados son los primeros en demostrar que la infección aguda por *T. cruzi* desencadena alteraciones metabólicas y mitocondriales en células T CD4 que están vinculadas a una función deficiente y a la inducción de apoptosis. De esta forma, estos eventos contribuirían a la incapacidad de la respuesta inmune del hospedador de eliminar al parásito. Por lo tanto, estos resultados proporcionan nuevos conocimientos que permiten comprender los procesos moleculares y metabólicos que impulsan la disfunción y destino de las células T CD4 durante la infección.

**Palabras claves:** *Trypanosoma cruzi*, Linfocito T CD4, ROSm, metabolismo, mitocondria, apoptosis.

## ABSTRACT

Chagas disease was classified in 2005 by WHO as one of the neglected tropical diseases around the world. Its prevalence and incidence have increased not only in countries with vector transmission but also in non-endemic countries as a globalization consequence. Although it is known that complications of chronic infection occur in 30-40% of cases, because of underdiagnoses, lack of medical checkups, in addition to reduced test sensitivity, this proportion could be higher. In fact, it constitutes a disabling disease with a great impairment of life quality and high mortality rate.

Treatments are limited and is necessary to further in mechanisms that lead to the persistent chronic infection. Thus, enable the discovery of new therapeutic targets that allow getting a positive prognosis, or in a better scenario, achieving the parasite clearance.

In spite of decades dedicated to studying the immune response against this infection, little is known about causes that drive defects in the effector response. In this Ph.D. project, we focused on the metabolic and mitochondrial phenotype acquired by CD4 T lymphocytes during infection, and its functional consequences that could explain failures in this cell compartment.

Results obtained along this thesis demonstrate that CD4 T cells during the acute phase of infection, acquire an exacerbated glycolytic and oxidative metabolic profile, with high levels of mitochondrial reactive oxygen species (mROS) which accumulates since the early stages of the infection. High mROS levels observed during acute phase of infection correlates with increased mitochondrial damage. We observed that effector CD4 T cells are strongly affected by these alterations during the acute phase. Furthermore, these cells are less functional and more prone to apoptosis. Increased apoptosis could be related to deficient antioxidant systems, as well as mitochondrial dynamics alterations. In this sense, *in vitro* treatment with the antioxidant NAC, reduced the frequency of apoptosis of CD4 T cells with depolarized mitochondria. Moreover, *in vivo* treatment with Nicotinamide Riboside (NR), a Nicotinamide Adenine Nucleotide (NAD<sup>+</sup>) that is capable of inducing mitophagy, diminished frequency of mROS producing cells with depolarized mitochondria. Even more, we demonstrated that mitochondrial defects are TCR signaling-dependent and are related to the infection context, as they do not happen in an immunization model.

Altogether, these results are the first in demonstrating that *T. cruzi* acute infection triggers metabolic and mitochondrial alterations in CD4 T cells that are linked to a deficient function and apoptosis induction. Thus, these events would contribute to the host immune response inability of

clearing the parasite. Therefore, these results provide new knowledge to understand molecular and metabolic processes that drive the dysfunction and the outcome of CD4 T cells during infection.

**Key words:** *Trypanosoma cruzi*, CD4 T cell, mROS, metabolism, mitochondria, apoptosis.

## ABREVIATURAS

**2-DG:** 2-Deoxiglucosa

**2-NBDG:** 2-( N -(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il) amino)-2-desoxiglucosa

**AA:** Antimicina A

**ACP:** Análisis de componentes principales

**AG:** Ácidos Grasos

**AP-1:** Proteína Activadora 1

**ATP:** Adenosina Trifosfato

**CCCP:** Carbonil cianida 3-clorofenilhidrazona

**CD:** Células Dendríticas

**CoA:** Coenzima A

**CPA:** Célula Presentadora de Antígeno

**CTLA-4:** Antígeno 4 del Linfocito T Citotóxico

**d.p.i.:** Días post infección

**DLP1/Drp1:** Proteína 1 Similar/Relacionada a la Dinamina

**ECAR:** Tasa de Acidificación Extracelular

**ETC:** Cadena Transportadora de Electrones

**FA:** Fase Aguda

**FADH<sub>2</sub>:** Flavina Adenina Dinucleótido

**FAO:** Oxidación de Ácidos Grasos

**FC:** Fase Crónica

**FCCP:** cianuro de carbonilo-4- (trifluorometoxi) fenilhidrazona

**FOXO:** "Forkhead Box" Clase O

**FoxP3:** Forkhead box P3

**GAPDH:** D-gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

**GFP:** Proteína Fluorescente Verde

**GL:** Ganglio Linfático

**GLUT1:** Transportador de Glucosa 1

**GPX:** Glutación Peroxidasas

**GRX:** Glutarredoxinas

**GSH:** Glutación

**HIF1 $\alpha$ :** Factor Inducible por Hipoxia  $\alpha$

**HK:** Hexoquinasa

**i.p.:** Intraperitoneal

**IFM:** Intensidad de Fluorescencia Media

**IFN $\gamma$ :** Interferón  $\gamma$

**IL:** Interleuquina

**LDH:** Lactato Deshidrogenasa

**LIR:** Regiones de Interacción con LC3

**L-OPA1:** "Long" OPA1

**Mc:** Macrófagos

**MET:** Microscopía Electrónica de Transmisión

**Mff:** Factor de Fisión Mitocondrial

**Mfn1:** Mitofusina 1

**Mfn2:** Mitofusina 2

**MHC:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad

**MME:** Membrana Mitocondrial Externa

**MMI:** Membrana Mitocondrial Interna

**mTOR:** Blanco de Rapamicina en mamíferos

**NAC:** N-Acetil Cisteína

**NADH:** Nicotinamida Adenina Dinucleótido

**NADPH:** Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

**NFAT:** Factor Nuclear de Activación de células T

**NF $\kappa$ B:** Factor Nuclear Potenciador de cadena liviana Kappa en células B

**NI:** No Infectado

**NK:** "Natural Killer"

**NOX:** NADPH Oxidasas

**NR:** Ribósido de Nicotinamida/Nicotinamida Ribosa

**OCR:** Tasa de Consumo de Oxígeno

**OPA1:** Proteína de Atrofia Óptica 1

**OT-II:** TCR de Linfocitos T CD4 OVA-específicos

**OVA:** Ovoalbúmina

**OXPPOS:** Fosforilación Oxidativa

**PAMPS:** Patrones Moleculares Asociados a Patógenos

**PD-1:** Proteína de muerte celular programada 1 Muerte Programada 1

**PD-L1:** Ligando 1 de PD-1

**PINK1:** Quinasa Putativa 1 Inducida por PTEN

**p-MHC:** complejo péptido-MHC

**PMM:** Potencial de Membrana Mitocondrial

**PPP:** Vía de las Pentosas Fosfato

**PRR:** Receptores de Reconocimiento de Patógenos

**PRX:** Peroxiredoxinas

**ROS:** Especies Reactivas del Oxígeno

**ROSm:** ROS mitocondrial

**Rot.:** Rotenona

**SF:** Solución Fisiológica

**SH:** Tioles

**SIA:** Sistema Inmune Adaptativo

**SII:** Sistema Inmune Innato

**Sirt1:** Sirtuina 1

**SOD2d:** dímero de SOD2

**SOD2m:** monómero de SOD2

**SODs:** Superóxido Dismutasas

**S-OPA:** "Short" OPA1

**SRC:** Capacidad Respiratoria de Reserva

**TCA:** Ácido Tricarboxílico

**TCR:** Receptor de Célula T

**Tef:** T efectora

**Tfh:** T colaboradoras foliculares

**TGF- $\beta$ :** Factor Transformante de Crecimiento  $\beta$

**Th:** T colaboradoras

**TI:** Transferidos Inmunizados

**TLR:** Receptores Tipo Toll

**Tn:** T naive o vírgen

**TNF:** Factor de Necrosis Tumoral

**TNI:** Transferidos No Inmunizados

**Treg:** T regulatorias

**TRX:** Tiorredoxinas

**Ub:** Ubiquitina

**UCPs:** Proteínas Desacoplantes

**VDAC:** Canales de Aniones Dependientes del Voltaje

**WT:** Salvaje



## Desarrollo de la Respuesta inmune

Las infecciones microbianas son reconocidas por el sistema inmunológico innato tanto para evocar una defensa inmediata como para generar una respuesta adaptativa. Para detectar y responder a variados grupos de patógenos, el sistema inmunológico innato cuenta con varios sistemas de reconocimiento los cuales se basan en la detección de estructuras conservadas asociadas con diferentes clases de microorganismos. La detección de estas características por las vías de reconocimiento del Sistema Inmune Innato (SII), se traduce en diferentes tipos de respuestas efectoras<sup>1</sup>.

La respuesta inmune innata se inicia con el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (de sus siglas en inglés, PAMPs), por parte de células innatas como las células dendríticas (CD) y macrófagos (Mc) a través de sus receptores de reconocimiento de patrones (del inglés, PRR). Ello conduce a la inducción de respuestas inflamatorias y la consecuente activación del Sistema Inmune Adaptativo (SIA) necesarios para enfrentar al patógeno en cuestión<sup>1</sup>.

Luego de su activación antígeno-específica, las células T naive (Tn) pueden diferenciarse en las diferentes subpoblaciones de Th<sup>2</sup>. En general, las citoquinas típicamente producidas por células presentadoras de antígenos, orquestan decisiones de linaje de células T CD4 activadas y la producción distintiva de citoquinas define las subpoblaciones de células T colaboradoras (del inglés, Th) con sus respectivas capacidades funcionales<sup>2</sup>. La heterogeneidad y plasticidad de las células Th las han ponderado como efectores de gran importancia en la respuesta inmune, siendo que son capaces de adaptarse rápidamente a cualquier estímulo.

La respuesta contra bacterias y protozoarios intracelulares requiere respuesta de células Th1 productoras de Interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) con activación de células T CD8 citotóxicas, que se desarrolla como consecuencia de la activación de PRR como los receptores tipo Toll (del inglés, TLR) por PAMPs que promueven la producción de interleuquina (IL) 12<sup>1</sup>, mientras que la IL-4 conduce a una diferenciación del tipo Th2 con producción de IL-4, IL-5 e IL-13<sup>1,3</sup>. El subgrupo de células Th17 se

especializa en la eliminación de bacterias y hongos extracelulares. La diferenciación a Th17 productoras de IL-17A, IL-17F e IL-22 es promovida por IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-21, IL-23, IL-1 $\beta$  y factor transformante de crecimiento  $\beta$  (del inglés, TGF- $\beta$ ) por parte de las células del SII, particularmente CD y Mc<sup>1</sup>. Además, la IL-21 e IL-6 induce células T foliculares (del inglés, Tfh) que son importantes en la colaboración con células B para la producción y el cambio de isotipo de anticuerpos<sup>1,3</sup>. Las células T regulatorias (Treg), a diferencia de otras células T CD4 efectoras, pueden ser generadas directamente en el timo, aunque también pueden inducirse en la periferia por señales mediadas por TGF- $\beta$  e IL-2. La polarización de los distintos fenotipos está conducida por reguladores maestros. Pero, por otra parte, las células Th son capaces de adoptar perfiles de expresión alternativos y producir citoquinas asociadas a linajes alternativos como las Tfh, debido a posibles modificaciones epigenéticas. En otras palabras, las células Th permanecen "preparadas" para adoptar un subconjunto alternativo de programas transcripcionales al recibir las señales apropiadas<sup>2,4,5</sup>.

Dichas citoquinas producidas por el SIA polarizan respuestas efectoras de distintos tipos celulares como células innatas incluyendo macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos, así como de células B, células epiteliales, neuronas sensoriales, endotelio y células de músculo liso. Estas células realizan diversas funciones efectoras, incluida la barrera de defensa, la destrucción y expulsión de patógenos, la producción de anticuerpos y la reparación de tejidos<sup>1</sup>.

Por último, la determinación de la respuesta efectora está definida no solo por la clase de patógeno, sino también por el costo que implica cierta respuesta inmune. Los síntomas de enfermedades infecciosas son causados por el daño generado por el patógeno, así como por la respuesta inmune en sí misma, lo que se denomina como inmunopatología. Las diferentes respuestas adaptativas presentan un potencial inmunopatológico asociado. La inmunopatología es generalmente considerada como una consecuencia de la respuesta excesiva, y por ello, la magnitud y la duración de la misma deben ser optimizadas para proveer una máxima protección en la infección con una mínima inmunopatogénesis<sup>1</sup>.

## Activación de Linfocitos T CD4

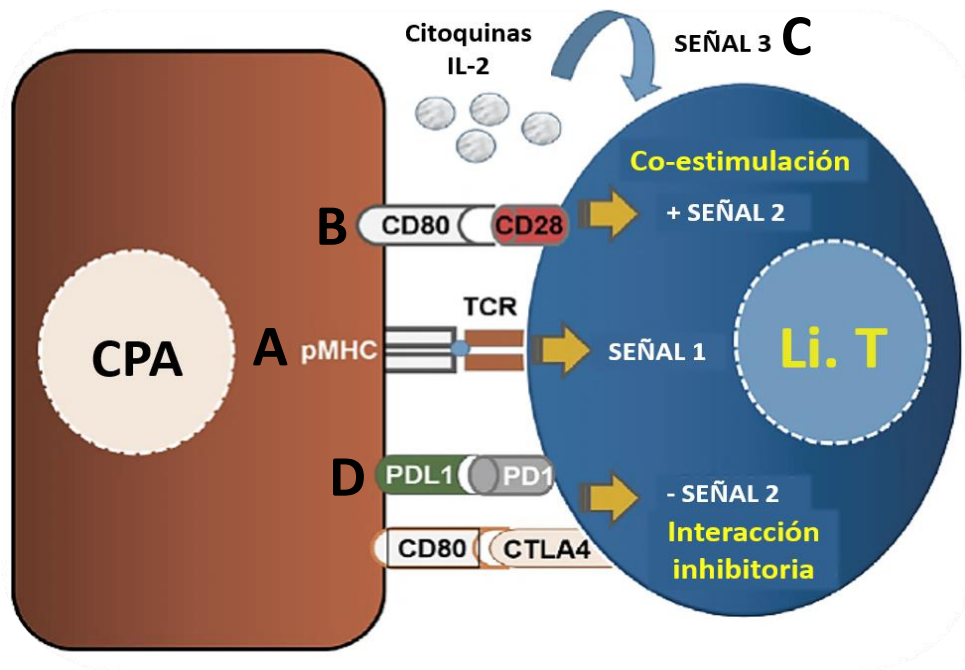
### Señales iniciales

Como mencionamos previamente, las células T CD4 son un componente esencial del sistema inmune. Las células Tn que emergen del timo, circulan en el torrente sanguíneo y continuamente migran a tejidos linfoides secundarios en busca de patógenos invasores o células malignas. En su estado quiescente, las células Tn transitan por los ganglios linfáticos y el bazo para centralizar su búsqueda y aumentar la probabilidad de encuentro con sus antígenos específicos. Cuando se encuentra con el antígeno, la célula T se activa y sale de la quiescencia para comenzar la expansión clonal, supervivencia y diferenciación<sup>2,6,7</sup>.

La activación y expansión de la célula T es un proceso complejo regulado por la interacción de varias vías de señalización. La activación del linfocito T requiere de 3 señales iniciales (Fig. In1). La primera señal involucra el receptor de célula T (del inglés, TCR) a través del cual se gatilla la señalización mediante presentación del antígeno por parte de las células presentadoras de antígeno (CPA) profesionales como las CD a través de un proceso altamente regulado llamado presentación antigénica. Las CPA captan antígenos y los procesan, convirtiéndolos en péptidos antigénicos cortos los cuales son cargados en las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés, MHC) formando un complejo péptido-MHC (p-MHC). El complejo p-MHC es expuesto en la superficie de la CPA y posteriormente reconocido por la célula T a través del TCR específico para dicho antígeno (Fig. In1A)<sup>8,9</sup>.

Luego de la primera señal, es necesaria una segunda señal o coestimulación antígeno-inespecífica<sup>8</sup>. Muchos pares de moléculas de la superficie de linfocitos T y CPA pueden contribuir a la señal de coestimulación. De hecho, un amplio rango de interacciones estimuladoras e inhibitorias entre receptores expresados en las células T y sus ligandos sobre la superficie de las CPA conducen a la segunda señal. De este modo, dichas interacciones en conjunto determinarán el nivel de activación de la célula T<sup>8</sup>. Probablemente las vías implicadas en la interacción entre B7/CD28 y CD40/CD40L son las más importantes y mejores caracterizadas en la activación T. La coestimulación ocurre cuando B7-1 o CD80 y B7-2 o CD86 que se encuentran en la superficie de la CPA, interaccionan con CD28 presente en la superficie del linfocito T (Fig. In1B). Estas dos señales activan vías principales de transducción de señales que resultan en la producción de numerosos factores, incluyendo la IL-2, la cadena  $\alpha$  de su receptor que es la molécula CD25 y CD40L. CD40 se expresa sobre la CPA (CD, Mc, y linfocitos B) y su ligando CD40L está en los linfocitos T CD4 activados. La estimulación de CD40 gatilla señales importantes para la producción de anticuerpos por parte de las células B e induce fuertemente la expresión de B7 y MHC sobre las CPA. De esta manera, la interacción CD40/CD40L

amplifica la presentación antigénica. La unión del TCR y del correceptor (CD4) al péptido presentado en el contexto de MHC (señal 1) y la co-estimulación (señal 2) gatillan una multitud de cascadas de señalización, principalmente mediadas por reacciones de fosforilación, incluyendo la vía PI3K-Akt. La tercer señal implica la unión de IL-2 a su receptor (Fig. In1C), lo cual activa la vía del blanco de Rapamicina en mamíferos (del inglés, mTOR), resultando en proliferación clonal y la generación de células T efectoras (Tef)<sup>9</sup>.



**Figura In 1. Señales iniciales que conducen a la activación del Linfocito T.**

Las células T reconocen el péptido antigénico a través del TCR presentado por las CPA en el contexto de moléculas de MHC (pMHC). Esta interacción o primera señal gatilla eventos intracelulares (A). Simultáneamente, recibe señales a través de moléculas co-estimuladoras que se expresan en la membrana de la célula T y reconocen a su ligando en la superficie de la CPA, se ejemplifica la interacción entre CD28-CD80 (segunda señal) (B). La tercera señal es provista por citoquinas como la IL-2 cuya señal constituye un factor de supervivencia y crecimiento para la célula T (C). Las moléculas PD-1 y CTLA-4 expresadas sobre la célula T interactúan con PD-L1 y CD80 respectivamente regulando de manera negativa la activación de las células T (D). *Figura modificada de Arasanz, H. et al. PD1 signal transduction pathways in T cells. Oncotarget 8, 51936–51945 (2017).*

Luego de la activación, la célula T incrementa la expresión de la molécula de membrana CD44, y su expresión es sostenida tanto en células efectoras como en aquellas células que sobreviven luego de la contracción de la respuesta inmune para la generación de células de memoria. La molécula CD44 es el marcador de exposición al antígeno más ampliamente usado, y es bien conocido como

regulador crítico de procesos biológicos que involucran la migración celular, incluyendo el reclutamiento de células T efectoras y otros leucocitos al sitio de injuria<sup>10</sup>.

Por otra parte, ciertas interacciones inhibitorias tienen lugar entre las CPA y las células T, las cuales modulan la fuerza y duración de las señales estimulatorias. Moléculas inhibitorias expresadas por los linfocitos T como el Antígeno 4 del Linfocito T Citotóxico (del inglés, CTLA-4) y la molécula de Muerte Programada 1 (del inglés, PD-1) que interaccionan con CD80 y el ligando 1 de PD-1 (PD-L1) en la CPA, respectivamente, antagonizan la coestimulación inducida por la interacción CD80-CD28. PD1 unido a PD-L1 contrarresta fuertemente la transducción de señales de TCR y la coestimulación de CD28 incluso a niveles muy bajos de expresión de PD-1 (Fig. In1D). Como resultado, PD-1 anula la producción de citoquinas, provoca la detención del ciclo celular y reduce las señales de sobrevivencia celular<sup>8</sup>.

## Vías metabólicas

El inmunometabolismo comprende un campo de estudio emergente que implica establecer las interacciones entre las vías metabólicas y la respuesta inmune<sup>11</sup>. En este sentido, ciertas rutas metabólicas tales como la glicólisis, la respiración mitocondrial y la oxidación de ácidos grasos, pueden determinar el desarrollo de las funciones efectoras de las células del sistema inmune<sup>12,13</sup>.

### Glucólisis

Esta vía metabólica, presente en el citosol, involucra la degradación de glucosa generando piruvato y la producción de energía. Luego de ingresar a la célula, la glucosa, es rápidamente fosforilada por la hexoquinasa (HK), produciendo glucosa 6-fosfato<sup>14</sup>. A partir de dicho paso, esta vía puede ramificarse en la llamada **vía de las pentosas fosfato** (del inglés, **PPP**), consumiendo la glucosa 6-fosfato mediante reacciones tanto oxidativas como no oxidativas para generar nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) que otorga equivalentes reductores para otras reacciones (Fig. In2A) como la síntesis de lípidos y además produce ribosa que constituye un componente esencial para la síntesis de ácidos nucleicos<sup>15</sup>. Continuando con la glucólisis, este proceso puede generar moléculas de alta energía, tales como nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y adenosina trifosfato (ATP). Sin un metabolismo mitocondrial activo, el piruvato que se produce por la glucólisis puede ser metabolizado en el citosol por la lactato deshidrogenasa (LDH) para generar lactato<sup>14</sup> (Fig. In2A).

### **Ciclo del ácido tricarboxílico (ciclo del TCA)**

El piruvato generado en la glucólisis puede ser degradado en citosol a Acetil Coenzima A (CoA) e ingresar como tal a la mitocondria, o ingresa directamente como piruvato y ser degradado por las reacciones del ciclo del ácido tricarboxílico (del inglés, TCA). Brevemente, dentro de la matriz mitocondrial el piruvato es carboxilado y produce oxaloacetato, o es descarboxilado y combinado con CoA para formar acetil-CoA. Luego, el oxaloacetato se combina con acetil-CoA para producir citrato. Durante el ciclo del TCA, el oxaloacetato es regenerado y recombinado con una nueva molécula de acetil-CoA. Este ciclo produce dos agentes reductores llamados NADH y flavina adenina dinucleótido ( $\text{FADH}_2$ )<sup>14,16</sup>. En general, estas reacciones aportan los equivalentes reductores que proveen electrones a la cadena de transporte de electrones (del inglés, ETC) (Fig. In2B).

### **ETC**

Existen 4 complejos enzimáticos (I-IV) involucrados en la transferencia de electrones en la ETC. Cada complejo consta de varias moléculas, incluidos los grupos de hierro-azufre (Fe-S), citocromos y grupos prostéticos que ayudan en la transferencia de electrones. Estos complejos llevan a cabo reacciones redox, permitiendo la transferencia de electrones entre ellos<sup>16</sup>. Durante el proceso de transferencia de electrones, los protones ( $\text{H}^+$ ) dentro de la matriz son bombeados al espacio intermembrana a través de los complejos I, III y IV, generando un potencial de membrana mitocondrial (PMM)<sup>16,17</sup> (Fig. In2C).

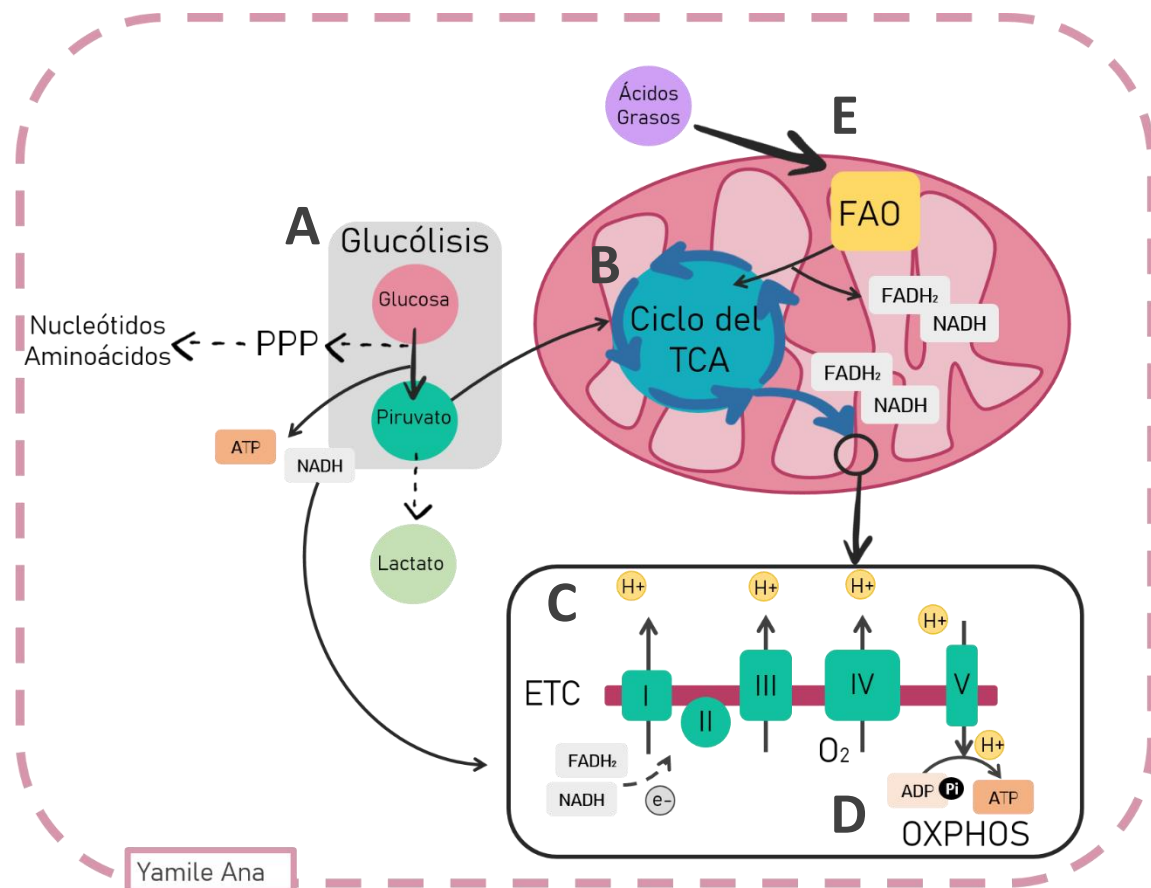
### **Fosforilación oxidativa (OXPHOS)**

Es un proceso celular que aprovecha la reducción del oxígeno ( $\text{O}_2$ ) para generar enlaces fosfato de alta energía, en la forma de ATP. Los múltiples complejos y coenzimas de la ETC son requeridas para conducir la OXPHOS<sup>17</sup>. Consiste en una serie de reacciones redox que involucra la transferencia de electrones desde el NADH y  $\text{FADH}_2$  (los cuales se obtienen de reacciones como las del ciclo del TCA) al  $\text{O}_2$  a través de la ETC. La OXPHOS utiliza  $\text{O}_2$  elemental como aceptor final de electrones<sup>14,16</sup>. El gradiente de protones en el espacio intermembrana generado por la ETC conduce a la síntesis de ATP mediante la ATP sintasa (complejo mitocondrial V)<sup>17</sup> que emplea la fuerza protón motriz generada por el PMM, para catalizar la unión de adenosina difosfato (ADP) al fosfato inorgánico<sup>16</sup> (Fig. In2D). La gran cantidad de energía liberada durante el curso de las transferencias de electrones alimenta la producción de alrededor de 30 moléculas de ATP mediante la OXPHOS<sup>18</sup>. Sin embargo,

la OXPHOS no es un mecanismo perfecto. Hay un 0,2-2% de fuga de electrones en los complejos I, II y III, principalmente I y III, resultando en la formación de superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )<sup>17</sup>.

### Oxidación de ácidos grasos (FAO)

Los ácidos grasos (AG) son también una fuente vital de energía y se metabolizan en la mitocondria mediante la vía de FAO. Los AG citosólicos son convertidos en acil-CoA grasos e ingresan a la matriz mitocondrial para incluirse en las reacciones de la FAO y de esa forma generar acetil-CoA, contribuyendo al conjunto mitocondrial de acetil-CoA que resulta generalmente oxidado en el ciclo de TCA. Además, contribuyen a la producción de equivalentes reductores ( $NADH$  y  $FADH_2$ ) que sirven como dadores de electrones a la ETC, de esta forma acoplado la FAO a la OXPHOS<sup>19,20</sup> (Fig. In2E). De esta manera, la FAO genera una gran cantidad de ATP. El metabolismo glucolítico es necesario para mantener la FAO a un ritmo constante<sup>20</sup>.



### **Figura In 2. Vías metabólicas implicadas en la biología celular.**

La degradación de la glucosa mediante la vía de la glucólisis genera intermediarios metabólicos, NADH y ATP, además de la obtención final de piruvato (A). Dicho sustrato puede ingresar al ciclo del TCA (B) y ser parte de la serie de reacciones que conducen a la generación de equivalentes reductores como el NADH y FADH<sub>2</sub> que participan en el transporte de electrones en la ETC (C). A su vez, el TCA puede también ser alimentado por productos de la FAO (E). Los equivalentes reductores (NADH y FADH<sub>2</sub>) además de ser generados por la glucólisis, también se obtienen de la FAO y principalmente por el ciclo del TCA, los cuales son esenciales para el transporte de electrones a través de la ETC (C) que conduce al bombeo de protones al espacio intermembrana mitocondrial, generando el potencial de membrana mitocondrial y la consecuente OXPHOS y síntesis de ATP (D).

### **Glutaminólisis**

Es un proceso mediante el cual las células convierten la glutamina en metabolitos del ciclo del TCA mediante una serie de reacciones enzimáticas<sup>14,21</sup>. La oxidación de glutamina en el ciclo del TCA genera NADH y FADH<sub>2</sub>, proveyendo a la ETC de equivalentes reductores que promuevan la OXPHOS, es decir, la síntesis de ATP. La glutamina es el aminoácido circulante más abundante, y una vez incorporado a la célula, sirve como donante de grupos amida y amino para síntesis de purinas y pirimidinas que facilitan la síntesis de nucleótidos durante la proliferación celular, y de aminoácidos no esenciales que abastecen su disponibilidad para otros procesos. Además, la glutamina es fuente de glutamato para la síntesis de glutatión (GSH), un tripéptido antioxidante esencial para las células<sup>18,21</sup>.

Resumiendo, cuando el ciclo del TCA está acoplado a la ETC, la fuerza protón motriz generada por la acumulación de los protones que fueron bombeados al espacio intermembrana como producto de la ETC, promueve la generación de ATP mediante la OXPHOS llevada a cabo por la ATP sintasa. El ciclo del TCA puede estar alimentado por intermediarios metabólicos de otras vías catabólicas como lo son la glucólisis, FAO y la glutaminólisis. Además, estas vías pueden aportar los equivalentes reductores NADH y FADH<sub>2</sub> necesarios para llevar a cabo la transferencia de electrones en la ETC, promoviendo la generación de ATP mediante la OXPHOS (Fig. In2).

### **Vías metabólicas involucradas en la activación y función de células T CD4**

Para llevar a cabo la proliferación y diferenciación de las subpoblaciones de linfocitos que van a gatillar la respuesta inmune adecuada para combatir infecciones, el sistema inmune compromete una serie de señales de crecimiento y proliferación coordinadas, incluyendo señales que modulan el metabolismo celular<sup>18</sup>.



Luego de los eventos iniciales de activación, las citoquinas del microambiente promueven la diferenciación de linfocitos Tn a linfocitos Tef (Fig. In3). Consistente con los diferentes roles correspondientes a las subpoblaciones de linfocitos T CD4, estos emplean programas metabólicos específicos que permiten la modulación metabólica de la inmunidad<sup>22</sup>.

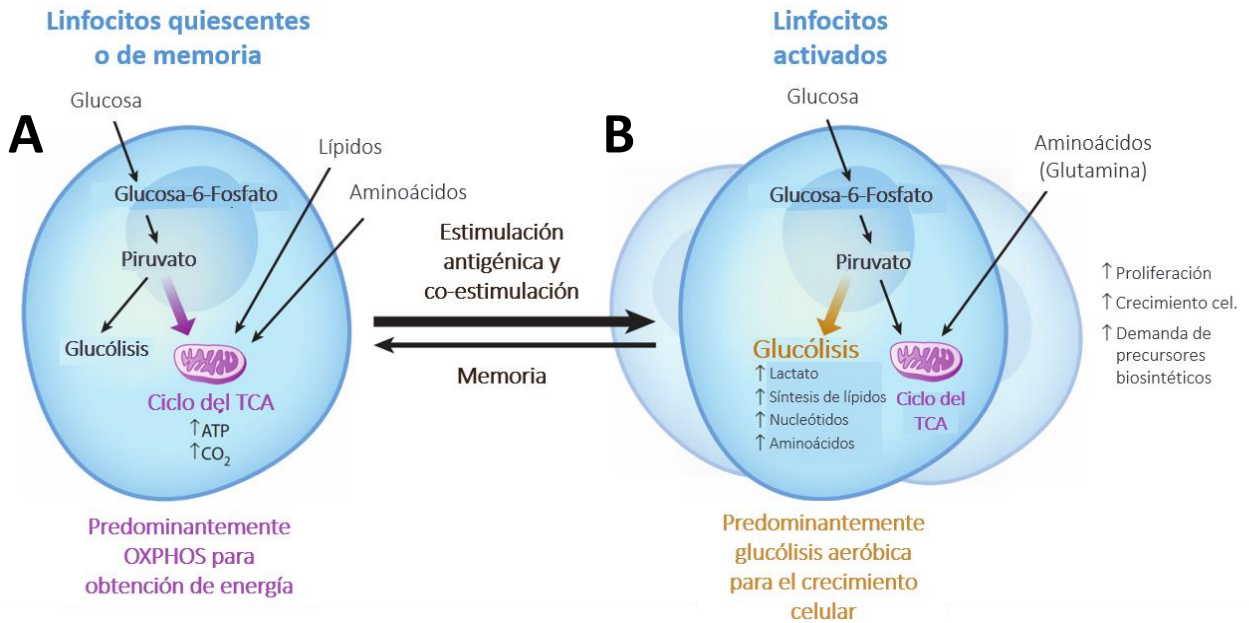
### **Linfocitos Tn**

Los linfocitos Tn abandonan el timo, circulan por el torrente sanguíneo y finalmente alcanzan los tejidos linfáticos secundarios tales como el bazo y ganglios linfáticos. Estas células permanecen en quiescencia y solo acumulan bloques de construcción celular esenciales como lo son los aminoácidos y nucleótidos<sup>17</sup>. Su actividad comprende la vigilancia inmunológica, la cual es garantizada por un programa metabólico que favorece la producción energética por sobre la biosíntesis y en general depende de la oxidación mitocondrial, alimentada por la FAO o aminoácidos<sup>18,23-25</sup>. De esta forma, la FAO asegura una suficiente producción de ATP para la supervivencia y vigilancia<sup>17</sup>.

### **Activación y diferenciación de la célula T**

La señalización a través del TCR, la co-estimulación y las señales provistas por citoquinas, son requisito para una completa activación del linfocito T. Dicha activación se evidencia mediante la proliferación, producción de citoquinas, diferenciación y función efectora, que constituyen procesos que deben ser alimentados mediante un incremento en el metabolismo anabólico<sup>6</sup>.

Durante la fase inicial de activación, el metabolismo oxidativo disminuye, mientras que las vías biosintéticas incrementan<sup>18</sup>. Los linfocitos Tef cambian la prevalencia de OXPHOS como vía casi exclusiva, por la glucólisis aerobia<sup>17</sup>. Esto ocurre con el fin de producir ATP rápidamente y promover el crecimiento y la proliferación de células T mediante la producción de precursores biosintéticos<sup>26,27</sup> (Fig. In3).

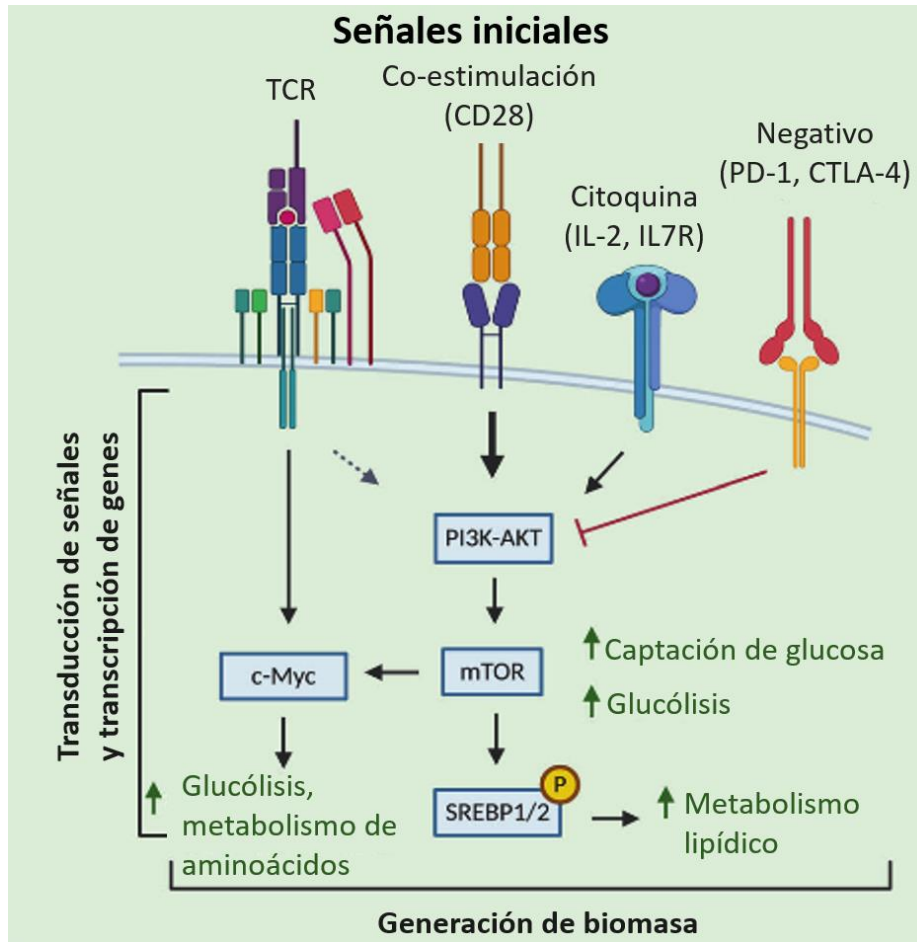


**Figura In 3. Reprogramación metabólica de Linfocitos T como consecuencia de su activación.**

Posterior a la estimulación antigénica y al co-estímulo, la célula sufre una reprogramación metabólica. Las células quiescentes ya sean naive o de memoria, dependen de la OXPHOS para su supervivencia y vigilancia (A). Posterior a su activación, se inducen programas metabólicos que favorecen el crecimiento celular, la proliferación y función efectora. Los linfocitos T activados emplean preferentemente la glucólisis y glutaminólisis para la generación de intermediarios biosintéticos (B). *Figura modificada de Maclver, N. J., Michalek, R. D. & Rathmell, J. C. Metabolic Regulation of T Lymphocytes. Annu. Rev. Immunol. 31, 259–283 (2013).*

La activación de linfocitos T CD4 gatilla una red dinámica de cambios transcripcionales y traduccionales que van de la mano de adaptaciones metabólicas para alcanzar las demandas bioenergéticas y anabólicas de células en proliferación, con capacidad de producir factores solubles como las citoquinas, entre otras funciones<sup>18,23–25</sup>. Las señales a través del TCR y la co-estimulación inducen la activación de la vía mTOR y del factor de transcripción Myc<sup>28,29</sup> necesarios para la reprogramación metabólica de las células T (Fig. In4). mTOR es un complejo con actividad serina/treonina quinasa responsable de integrar el estado energético y nutricional, regulando la supervivencia, crecimiento y proliferación celular; mientras que Myc regula genes implicados en el metabolismo de la glucosa y la glutamina, la proliferación y la apoptosis celular<sup>30</sup>. Además, Myc en conjunto con el factor inducible por hipoxia  $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ), orquesta la expresión de enzimas glucolíticas y transportadores de glucosa que facilitan el incremento en la captación y catabolismo de glucosa<sup>18</sup>. Las enzimas glutaminolíticas y su transportador son también inducidos de forma Myc-dependiente<sup>18</sup>. Durante la activación, la glucólisis aeróbica produce la mayor parte del ATP (~ 60%).

Como resultado, se puede exportar más citrato fuera de las mitocondrias para generar acetil-CoA y promover la acetilación de histonas en loci de genes seleccionados<sup>31</sup>. El rol de la glucólisis en la función de linfocitos Tef se fundamenta tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*, donde bloqueando la glucólisis con 2-deoxiglucosa (2-DG, un análogo de la glucosa que no puede metabolizarse) se previene la producción de citoquinas Th1, Th2 y Th17<sup>6</sup>.

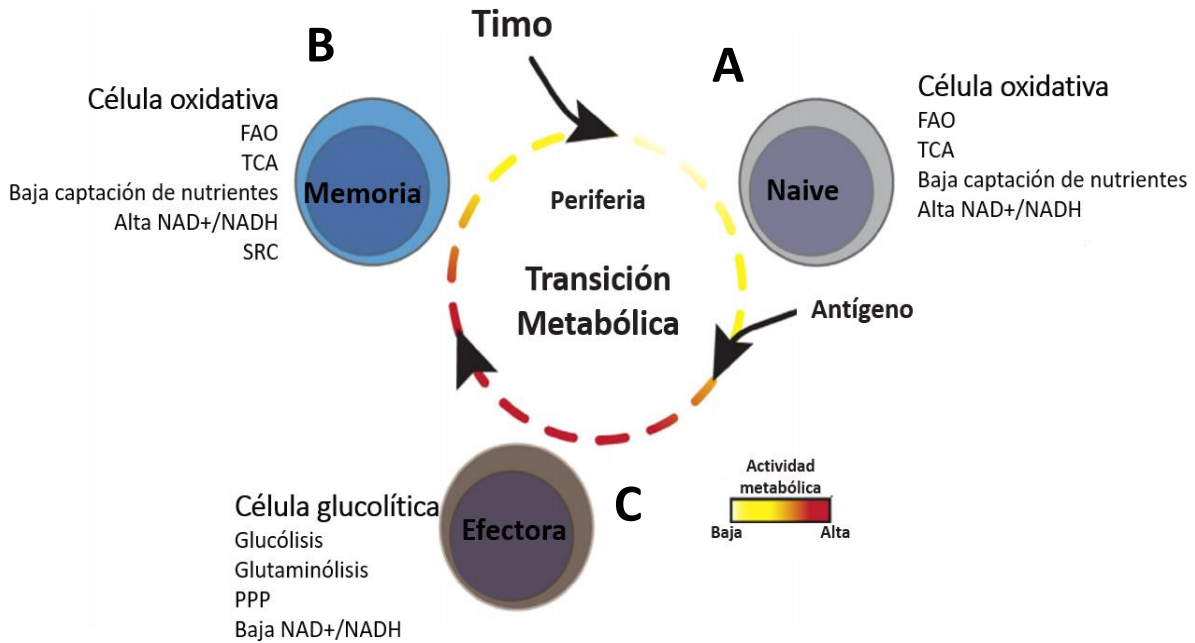


**Figura In 4. Vías de señalización que tienen lugar tras la activación del linfocito T.**

Las señales iniciales de activación conducen a una cascada de fosforilaciones que promueve la activación del regulador maestro mTOR y del factor de transcripción Myc, induciendo un cambio en los programas metabólicos preferentemente hacia el anabolismo, con un balance positivo hacia la glucólisis y el metabolismo de aminoácidos como la glutaminólisis. *Figura modificada de Shyer, J. A. Metabolic signaling in T cells. Cell Research 11 (2020).*

Otras vías como la PPP, la síntesis lipídica y OXPHOS están incrementadas en linfocitos Tef<sup>27,31,32</sup> (Fig. In5C). Las vías lipogénicas son cruciales en la reprogramación metabólica, de modo que las células T requieren AG para la síntesis de membrana, así como otros procesos celulares como lo son la señalización y producción energética<sup>18</sup>. Además, se incrementa la expresión de enzimas

mitocondriales involucradas en el ciclo del TCA, así como enzimas que median el metabolismo mitocondrial de mono-carbonados crucial para la síntesis de nucleótidos<sup>32</sup>.



**Figura In 5. Características metabólicas durante las distintas fases de la respuesta de células T.**

En los linfocitos T<sub>n</sub> (A) al igual que en linfocitos T<sub>mem</sub> (B) prevalece el metabolismo oxidativo, con la diferencia de que los linfocitos T<sub>mem</sub> tienen una capacidad respiratoria de reserva mayor. La actividad metabólica de los linfocitos T se incrementa frente a la activación antígeno-específica, conduciendo a la reprogramación metabólica que implica una alta actividad glucolítica por parte de linfocitos T<sub>ef</sub> (C). *Figura modificada de Franchina, D. G., Dostert, C. & Brenner, D. Reactive Oxygen Species: Involvement in T Cell Signaling and Metabolism. Trends in Immunology 39, 489–502 (2018).*

Durante la activación, dependiendo de las citoquinas locales, los linfocitos T CD4 se diferencian en linfocitos T efectoras (T<sub>ef</sub>) de distintas subpoblaciones incluyendo linfocitos Th1, Th2, Th17, T<sub>fh</sub> y T<sub>reg</sub><sup>6</sup>. Es posible describir fenómenos generales en linfocitos T<sub>ef</sub>, pero las diferentes subpoblaciones muestran perfiles metabólicos variados según el proceso de diferenciación que sufren<sup>5,17</sup> (Fig. In6).

### Linfocitos Th1

Los linfocitos Th1 son consideradas células altamente glucolíticas y glutaminolíticas y dependen de estas dos vías para mantener su crecimiento y proliferación. Se ha observado que cuando los

linfocitos Tn son deprivadas de glutamina durante la estimulación vía TCR, se generan células Treg, incluso en condiciones polarizantes de linfocitos Th1<sup>18</sup>.

Por otro lado, se ha demostrado que ciertos metabolitos mitocondriales y el complejo I suministran sustratos necesarios para la proliferación y la remodelación epigenética en las primeras etapas de la activación de los linfocitos Th1<sup>33</sup>. Es decir que, a pesar de la disminución del metabolismo mitocondrial, se ha demostrado que el TCA contribuye a la producción de IFN $\gamma$ <sup>33</sup>.

### **Linfocitos Th17**

Tal como los linfocitos Th1, la diferenciación de linfocitos Th17 depende de la glucólisis<sup>22</sup>. Se ha demostrado que las células Th17 captan glucosa e incrementan la glutaminólisis<sup>17</sup>. Además, la síntesis de colesterol y ácidos grasos promueve la diferenciación de los linfocitos Th17 y síntesis de IL-17<sup>27</sup>.

Evidencia reciente sugiere que vías metabólicas de los lípidos juegan un rol en la modulación de la producción de citoquinas por parte de estas células<sup>17,18</sup>. De esta manera, niveles intracelulares alterados de distintas especies de ácidos grasos conducirían al desarrollo de células Th17 patogénicas<sup>18</sup>. En este sentido, se ha demostrado que, la producción aberrante de citoquinas inflamatorias por parte de los linfocitos Th17 puede promover el desarrollo de autoinmunidad<sup>17,18</sup>.

### **Linfocitos Th2**

Del mismo modo que los linfocitos Th1 y Th17, los linfocitos Th2 polarizados *in vitro* muestran altas tasas de glucólisis. Se ha demostrado que el tratamiento con el inhibidor de la glucólisis 2-DG, interfiere con la diferenciación a linfocitos Th2<sup>17,22</sup>. Además, se ha observado que la respuesta de las células Th2 también está asociada con un metabolismo oxidativo. También se evidencia incrementada captación de AG. Es posible considerar que tanto la FAO como el incremento en la actividad glucolítica, serían importantes para mantener los linfocitos Th2 efectores en tejidos periféricos<sup>18</sup>.

### **Linfocitos Tfh**

Los linfocitos Tfh se distinguen de otras células Tef por su participación en la maduración de células plasmáticas y en el desarrollo de células B de memoria<sup>17</sup>. Tienen un rol crítico en la formación y

mantenimiento de centros germinales que promueven la maduración de afinidad de anticuerpos específicos. Se ha encontrado que si bien las Tfh utilizan la glucólisis, dependen principalmente de la respiración mitocondrial<sup>17,18</sup>.

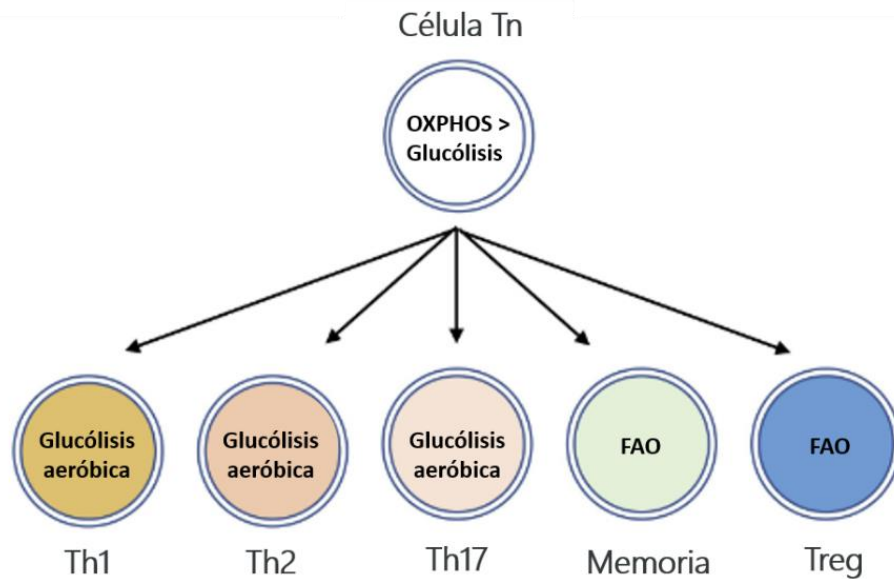
### **Linfocitos Treg**

Los linfocitos Treg son críticos para el mantenimiento de tolerancia inmunológica y la prevención de respuestas inflamatorias deletéreas<sup>17,18</sup>. Generalmente expresan bajos niveles de GLUT1 y para realizar su función supresora dependen de la OXPHOS, la cual es conducida por la FAO. Las Treg requieren altos niveles de actividad mitocondrial para soportar su diferenciación, homeostasis y función tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>2,17,22</sup>.

### **Linfocitos Tmem**

La población de linfocitos Tef que sobrevive se remodela en linfocitos Tmem los cuales luego responderán a futuras amenazas frente a las cuales ya han estado expuestas. A diferencia de los linfocitos Tef altamente glucolíticos, los linfocitos Tmem poseen un metabolismo comparable al de las Treg, ya que dependen de OXPHOS sostenida por FAO para alcanzar sus necesidades metabólicas y mantener su función de vigilancia inmunológica<sup>17,27</sup> (Fig. In5B). Si bien se encuentran en estado quiescente, las mitocondrias de linfocitos Tmem son diferentes a las de linfocitos Tn, ya que tienen mayor masa, son en su mayoría elongadas y fusionadas y tienen una mayor capacidad de reserva respiratoria, la cual se puede atribuir a la FAO<sup>7,22,27,34</sup>.

En resumen, si bien se ha demostrado que las subpoblaciones de linfocitos T utilizan preferencialmente alguna vía metabólica de acuerdo con la disponibilidad de metabolitos y sus funciones, todos los tipos celulares utilizan las diferentes vías metabólicas en cierto punto.



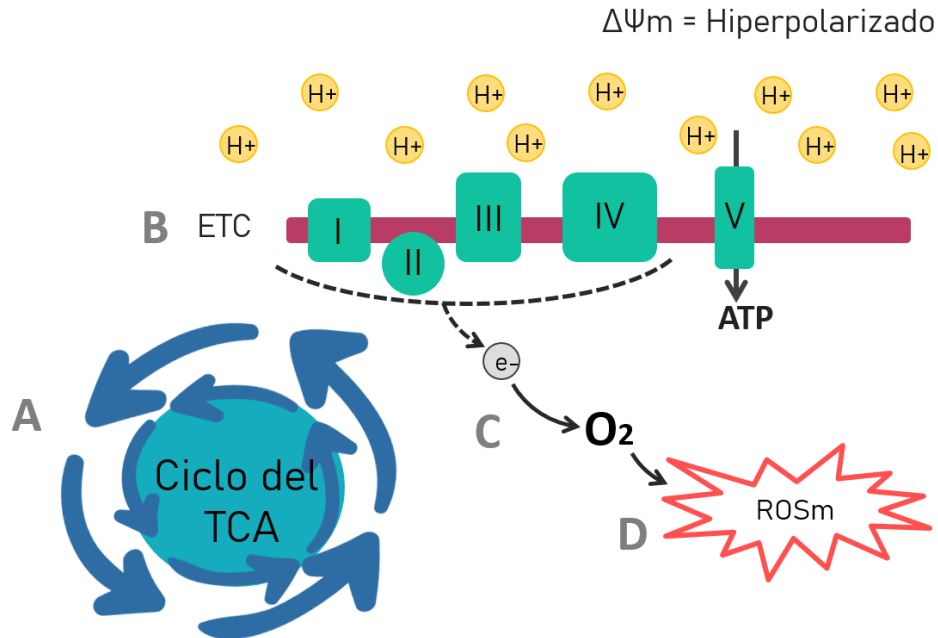
**Figura In 6. Vías metabólicas involucradas en los distintos subtipos de linfocitos T.**

Los linfocitos Tn son células oxidativas, las cuales abandonan la quiescencia para convertirse en células Tef, cuyos subtipos emplean principalmente la vía glucolítica. Tanto en las células Tmem, así como en las Treg, la OXPPOS se sustenta en la FAO. *Figura modificada de Salmond, R. J. mTOR Regulation of Glycolytic Metabolism in T Cells. Front. Cell Dev. Biol. 6, 122 (2018).*

## Producción de especies reactivas del oxígeno (ROS)

Como se explicó previamente en la sección de vías metabólicas, el metabolismo celular de sustratos tales como la glucosa y AG libres genera electrones que son transportados por NADH y FADH<sub>2</sub> a la ETC. Dichos electrones son transportados en última instancia al O<sub>2</sub> molecular el cual se reduce a agua en el último paso de la ETC (Fig. In2C). A medida que los electrones son transferidos a lo largo de la ETC, un cierto número de H<sup>+</sup> son bombeados desde la matriz al espacio intermembrana mitocondrial, estableciéndose de esa forma, un gradiente de H<sup>+</sup> a lo largo de la membrana mitocondrial interna (MMI). La energía que se conserva en este gradiente de protones deriva en la OXPPOS mediada por la ATP sintasa, cuyo cambio conformacional causado por el regreso de los protones a la matriz mitocondrial induce la fosforilación de ADP generando ATP<sup>35</sup> (Fig. In2D). Sin embargo, cuando hay un incremento en el metabolismo ya sea por requerimiento o por disponibilidad de nutrientes y sustratos, dicho proceso puede acelerarse<sup>36</sup> (Fig. In7A). En consecuencia, puede generarse un incremento en el bombeo de H<sup>+</sup> al espacio intermembrana lo que conduce a un incremento del PMM<sup>36</sup> (Fig. In7B). Como consecuencia de dicha hiperpolarización,

pueden ocurrir reacciones de transferencia de un electrón desde los complejos I, II y III de la ETC al  $O_2$  molecular, generando superóxido mitocondrial (ROSm) (Fig. In7C-D). Es decir que, la producción de superóxido se correlaciona positivamente con cambios en el PMM<sup>35</sup>.



**Figura In 7. Hiperpolarización de la membrana mitocondrial y generación de ROSm.**

En presencia de un metabolismo exacerbado o de una disponibilidad de nutrientes incrementada (A), se acelera el transporte de electrones por la ETC (B), bombeándose mayor cantidad de protones hacia el espacio intermembrana. Como consecuencia, el  $O_2$  puede sufrir reducciones incompletas (Cc) y generarse altos niveles de ROSm (D).

Como se detalló previamente, una respuesta inmune adaptativa robusta requiere una fase de explosión proliferativa seguida de la polarización de los linfocitos T en subpoblaciones funcionales. Ambos procesos están asociados con demandas redox, entre otros procesos necesarios. El metabolismo oxidativo produce ROS<sup>37</sup>, generados como subproductos normales de la OXPHOS pero en este caso, de forma TCR-inducida<sup>32</sup>, que están estrechamente controladas por antioxidantes y juegan un papel importante en la regulación de las funciones de las células T<sup>37</sup>.

Además de un incremento rápido de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular, la generación transitoria de bajos niveles de ROS, constituyen eventos de señalización inducidos rápidamente luego de activarse la señalización por el TCR. Un estado intracelular pro-oxidante pasajero es indispensable para la proliferación y activación de células T<sup>32</sup>. Las ROS, como el  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot -}$  son moléculas de vida media corta generadas a partir del  $O_2$  por varias fuentes intracelulares<sup>38</sup>. En general en células T,



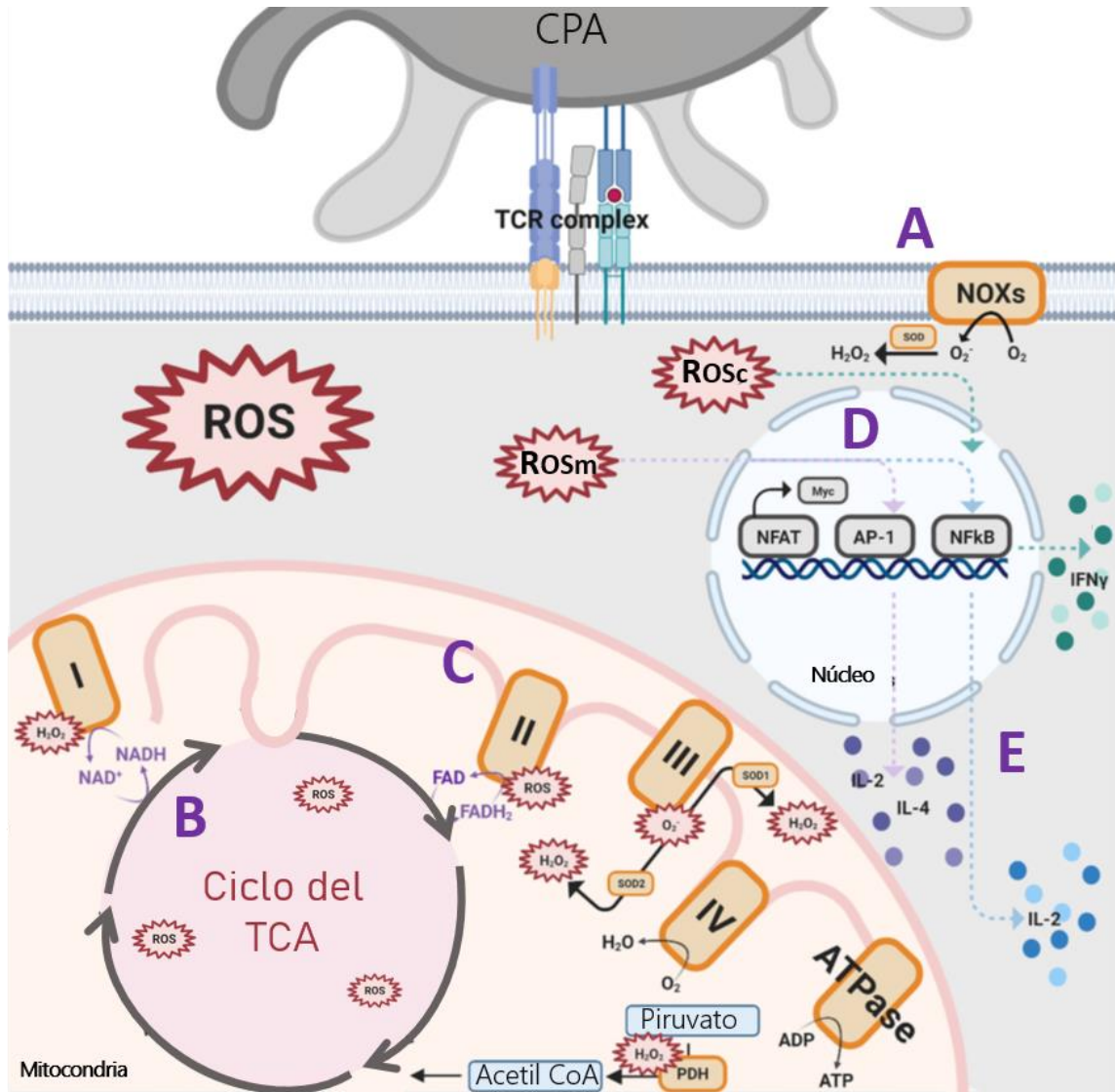
además del metabolismo de los lípidos y otras enzimas, como las ciclooxigenasas<sup>17</sup>, las señales oxidantes inducidas por el TCR son generadas por 2 sistemas enzimáticos principales que son oxidadas dependientes de NADPH (NOX), y complejos de la ETC<sup>32</sup> (Fig. In8).

El  $O_2^{\bullet-}$  es el principal ROS producido por las mitocondrias<sup>39</sup>, por lo que se mencionará indistintamente como  $O_2^{\bullet-}$  o ROSm. Como se explicó previamente, la formación de especies reactivas corresponde a electrones que escapan de la ETC reduciendo de forma incompleta al oxígeno, y de esa forma produciendo radicales libres de corta duración como el  $O_2^{\bullet-}$  que puede convertirse en  $H_2O_2$  ya sea espontáneamente o catalizado por enzimas superóxido dismutasa (SODs)<sup>40</sup>. Más precisamente, el  $O_2^{\bullet-}$  puede generarse en el complejo I a través de ambas direcciones de la reacción. Además, hay evidencia que destaca que la producción de ROSm por el complejo II también juega un papel fundamental a pesar de la insignificante cantidad producida en condiciones normales, mientras que el complejo III produce la segunda mayor cantidad de ROSm. Los complejos I y II crean exclusivamente  $O_2^{\bullet-}$  en la matriz mitocondrial que se convierten rápidamente en  $H_2O_2$  por acción de la enzima SOD2. El complejo III lo produce tanto en la matriz como en el espacio intermembrana. De la misma forma, el  $O_2^{\bullet-}$  producido en la matriz es convertido en  $H_2O_2$  estable por la SOD2<sup>38</sup>, mientras que el producido en el espacio intermembrana, viaja a través de canales de aniones dependientes del voltaje (VDAC) hacia el citosol, donde puede ser convertido en  $H_2O_2$  por la SOD1 citosólica (Fig. In8). Las ROSm generados por el complejo III son de particular interés, ya que tiene una ruta más fácil hacia el citosol, donde puede participar en eventos de señalización celular<sup>41</sup> a través de la oxidación reversible de grupos tioles (SH) de residuos cisteínas presentes en ciertas proteínas<sup>42</sup>.

El  $H_2O_2$  actúa como el principal mensajero de señalización, ya que es lo suficientemente estable y puede atravesar las membranas celulares para reaccionar preferentemente con los grupos tioles (SH) de residuos de cisteína. Cabe señalar que los residuos de cisteína se encuentran entre los residuos de proteínas más conservados y menos abundantes, lo que garantiza una alta selectividad y especificidad para las modificaciones postraduccionales mediadas por oxidación. Durante la señalización redox, el  $H_2O_2$  oxida el anión tiolato a la forma sulfénica (Cys-SOH), que causa cambios alostéricos dentro de la proteína alterando su función. Este proceso se conoce como sulfenilación y se considera como una modificación similar a la fosforilación u otras modificaciones postraduccionales. La forma sulfénica se puede reducir enzimáticamente para devolver la función de la proteína a su estado original. Por eso, la oxidación de primer grado de residuos de cisteína

dentro de proteínas sirve como un mecanismo de transducción de señales reversible<sup>40,43</sup>. Se ha demostrado que múltiples clases de proteínas están reguladas por sulfenilación, incluidas fosfatasa, quinasas, factores de transcripción e histonas desacetilasas, enzimas antioxidantes, entre otras<sup>40</sup>.

Esencialmente, estas especies oxidantes activan el Factor Nuclear de Activación de células T (del inglés, NFAT), la Proteína Activadora 1 (del inglés, AP-1) y al Factor Nuclear Potenciador de cadena liviana Kappa en células B (del inglés, NFκB), los cuales son todos necesarios para la síntesis de citoquinas, proliferación y diferenciación<sup>32,44</sup> (Fig. In9), además de Myc que regula la expresión de enzimas que sostienen el anabolismo dependiente de la glucólisis y metabolismo mitocondrial<sup>6</sup>. Se ha demostrado que la producción de superóxido por parte del complejo III de la ETC es fundamental para la proliferación. De esta manera, las células T con producción reducida de ROSm muestran una disminución de la producción de IL-2 y proliferación<sup>6</sup>.



**Figura In 8. Producción de ROS inducida por señalización vía TCR: efectos en la activación.**

Diversas fuentes de ROS impactan en la activación de la célula T. Estas incluyen las NOX (A), algunas enzimas del ciclo del TCA (B), y los complejos de la ETC mitocondrial (C). Las NOXs transfieren los electrones del  $O_2$  generando superóxido (A). Tanto el ROS citoplasmático (ROSc) como el ROSm activan mediante señalización redox, factores de transcripción claves para la activación de linfocitos T como lo son NFAT, AP-1 y NFκB (D). Ello conduce a la producción de citoquinas efectoras que promueven el crecimiento y función de estas células (E). *Figura modificada de Peng, H.-Y. Metabolic Reprogramming and Reactive Oxygen Species in T Cell Immunity. Frontiers in Immunology 12, 10 (2021).*

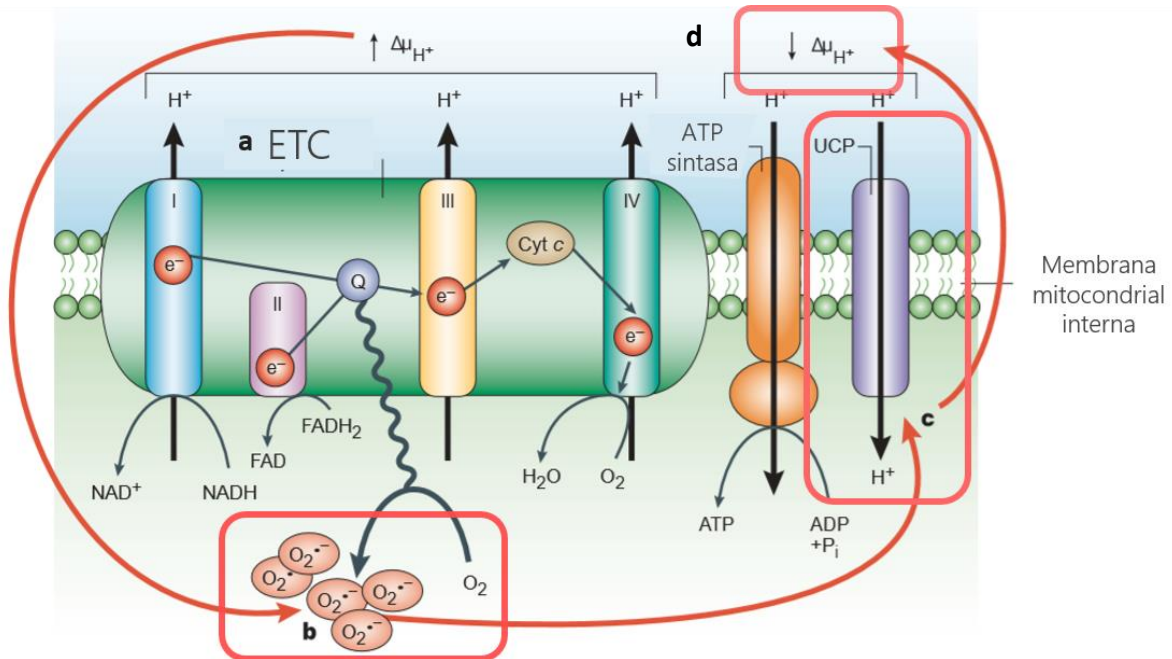
## Mecanismos de control de los niveles de ROSm

Las ROS son subproductos naturales de la respiración mitocondrial que en bajo nivel y en condiciones normales son importantes para homeostasis redox<sup>45</sup>, la señalización molecular<sup>46</sup> y son

esenciales para la activación de los linfocitos T y su reprogramación metabólica<sup>38</sup>. Para permitir la integración de la señalización espacio-temporal, el alcance y la duración de la señal oxidativa deben regularse estrictamente<sup>47</sup>. Pero una acumulación excesiva de ROSm podría promover el estrés oxidativo y desencadenar efectos nocivos, incluyendo lesión tisular e inflamación, así como el desarrollo de diferentes enfermedades metabólicas e inmunes<sup>38</sup>. Sin un estricto control en su producción puede reaccionar con lípidos, proteínas, y ácidos nucleicos y causar daño oxidativo a estas macromoléculas, perjudicando funciones celulares e inducir su muerte<sup>45</sup>. Es por ello que las células han desarrollado una serie de sistemas para mantener las ROS en niveles no tóxicos<sup>46</sup>.

## Proteínas desacoplantes

Las proteínas desacoplantes (del inglés, UCPs) son proteínas mitocondriales transportadoras de aniones que tienen un rol en minimizar la emisión de ROS en la ETC<sup>46</sup>. El  $O_2^{\cdot -}$  producido activa la expresión de UCP, incrementando de ese modo la fuga de  $H^+$  a través de la MMI. La fuga de protones mediada por UCPs, desacoplan el proceso de transporte de electrones y generación de gradiente de protones, de la síntesis de ATP mediante OXPHOS. Con la disminución o pérdida del gradiente de protones, la energía derivada de la oxidación de sustratos es disipada en forma de calor<sup>35</sup>. La fuga incrementada de  $H^+$  disminuye el PMM, lo que limita la producción de  $O_2^{\cdot -}$  mitocondrial en una retroalimentación regulatoria<sup>35</sup> (Fig. In10). La fuga de protones ha emergido como uno de los principales mecanismos de ajuste y control del PMM para el control en la producción de ROS. Mediante un leve desacoplamiento, la mitocondria puede evitar el excesivo aporte de electrones o equivalentes de reducción a los complejos respiratorios y de esa forma minimizar la probabilidad de reducción incompleta del  $O_2$ . Las isoformas más estudiadas corresponden a UCP1, 2 y 3. La UCP1 está ampliamente descrita en procesos de termorregulación en la grasa parda. UCP2 y 3 se encuentran en otros tejidos y su activación es promovida por las ROS o los subproductos de ROS para inducir la fuga de  $H^+$ , proveyendo de ese modo una retroalimentación negativa para el control en la producción de ROS. Se ha encontrado que UCP3 disminuye las ROS mediante una disminución en el PMM, y que particularmente limita la producción de ROS mediante el incremento en la eficiencia de FAO<sup>46</sup>.



**Figura In 9. Expresión de UCPs y control de la producción de superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>).**

La producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> es dependiente del gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna. Cuando el potencial de membrana mitocondrial es alto debido a la exportación de protones desde la matriz mitocondrial (a), la producción de superóxido en la ETC se incrementa (b) como resultado de reducciones inespecíficas e incompletas del O<sub>2</sub> principalmente en los complejos I y III. Luego, el O<sub>2</sub><sup>-</sup> activa las UCP probablemente a través de la acción de sus intermediarios (c), y de esta forma incrementa la fuga de protones a través de la membrana mitocondrial interna. La fuga de protones disminuye el potencial de la membrana mitocondrial (d), limitándose de esta manera la producción de superóxido mitocondrial (ROSm) en una retroalimentación autorreguladora. *Figura modificada de Krauss, S., Zhang, C.-Y. & Lowell, B. B. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. Nat Rev Mol Cell Biol 6, 248–261 (2005).*

Además, se ha demostrado que tanto la actividad de canal de las UCP2 y UCP3 es controlada por modificaciones covalentes por el glutatión (GSH). Es decir, que la activación de UCP2 y 3 es inducida por ROS, la cual es luego modulada directamente por glutatiónilación<sup>46</sup>. La glutatiónilación es la formación de un enlace disulfuro mixto entre la cisteína del GSH y la cisteína de una proteína. Es una modificación postraduccional reversible que ocurre en algunas cisteínas proteicas bajo condiciones normales o de estrés oxidativo y se considera que su posible función es proteger a ciertas cisteínas de oxidaciones irreversibles o transducir señales redox<sup>48,49</sup>. Bajo condiciones normales, la ETC transfiere electrones hasta una completa reducción del O<sub>2</sub>, limitando la emisión de ROSm y así manteniendo el PMM. Entonces, UCP2 y UCP3 se mantienen en un estado glutatiónilado, es decir inactivo. Un incremento en el PMM y en la producción de ROSm conduce a la

deglutinationilación y activación de UCP2 y UCP3, y a la subsecuente fuga de protones, reestableciendo el PMM y disminuyendo las ROSm. Un estrés oxidativo prolongado debido a una producción excesiva de ROSm conduce a la depolarización de la membrana mitocondrial y a la hiperglutinationilación de las proteínas mitocondriales como mecanismo de protección del daño oxidativo. La inhibición de la función de UCP es fundamental para prevenir el colapso del PMM y la inducción de apoptosis<sup>46,50</sup>.

## Sistemas antioxidantes

Como se mencionó previamente, la producción de ROS puede provenir de sistemas enzimáticos como las NOX y también como subproducto de la OXPHOS en la mitocondria<sup>40</sup> (Fig. In10A-B). De hecho, una de las principales fuentes celulares de ROS, son los complejos I y III de la ETC mitocondrial<sup>45</sup>.

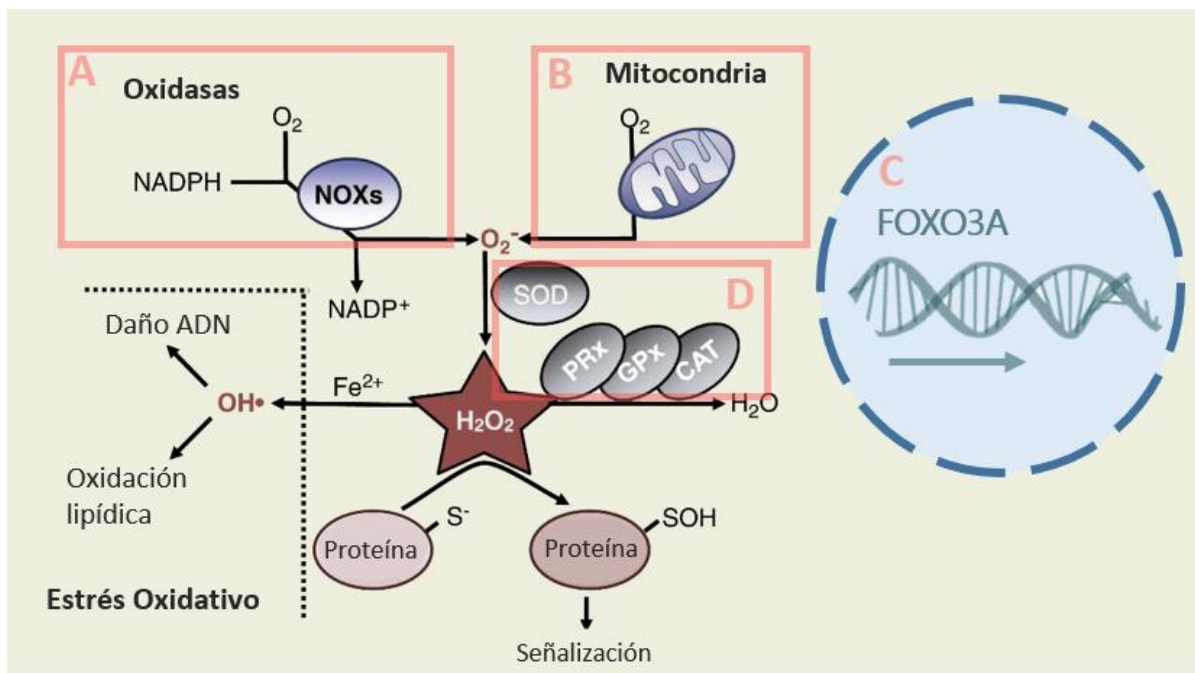
Además del mecanismo de desacoplamiento por las UCPs para reducir la producción de ROSm, las células cuentan con variados sistemas antioxidantes que están involucrados en diferentes procesos y actúan a distintos niveles dependiendo de las necesidades celulares. Dentro de ellos se destacan enzimas como SODs, catalasas, glutatión peroxidasas (GPX), peroxiredoxinas (PRX), tioredoxinas (TRX), glutarredoxinas (GRX), entre otras (Fig. In12), además de pequeñas moléculas antioxidantes no enzimáticas, como GSH, ascorbato, piruvato,  $\alpha$ -cetoglutarato y oxalacetato.

Debido a la abundancia de sistemas antioxidantes en la célula, las ROS no pueden viajar largas distancias y, por lo tanto, transmiten señales solo localmente, en compartimentos confinados<sup>45</sup>.

Por lo tanto, se espera que la generación mitocondrial de especies oxidantes inducida por la señal a través del TCR esté limitada por una respuesta antioxidante posterior<sup>51</sup>. SOD2 es una enzima cuya actividad es muy importante, ya que su ubicación en la matriz proporciona una primera línea de defensa contra el  $O_2^{\bullet-}$  liberado por la ETC como subproducto de la respiración. La SOD2 protege proteínas mitocondriales, lípidos y ADNmt de la acción oxidante del  $O_2^{\bullet-}$  dismutándolo eficientemente en  $H_2O_2$  y  $O_2$ . Además, en las células T activadas, la SOD2 cumple un papel esencial, mediando el primer paso en el proceso mitocondrial de generación de señal oxidativa. Por tanto, es evidente que SOD2 sirve como regulador e interruptor que limita el proceso de generación de señales oxidativas como producto de la activación de células T. El  $H_2O_2$  puede reaccionar con aminoácidos particulares, generalmente cisteínas y metioninas, o puede convertirse en  $OH^{\bullet}$ , HOCl

o  $H_2O$  (por la acción de catalasa, peroxidasa o peroxiredoxina). Tanto el  $OH^\bullet$  como el  $HOCl$  son muy reactivos y, por lo general, dañan de forma irreversible las moléculas cercanas<sup>40</sup>.

La defensa celular antioxidante se encuentra fuertemente regulada por la familia de factores de transcripción "forkhead box" clase O (FOXO). Por un lado, los FOXO estimulan la transcripción de genes que codifican para proteínas antioxidantes localizadas en distintos compartimentos subcelulares tales como la mitocondria (SOD2, peroxirredoxinas 3 y 5) y peroxisomas (catalasa) (Fig. In10C-D). Por otro lado, las ROS modulan la actividad de FOXO a múltiples niveles, incluyendo modificaciones postraduccionales de FOXO (tales como fosforilaciones y acetilaciones), interacciones con co-reguladores, alteraciones en la localización subcelular de FOXO, síntesis proteica y estabilidad. Se ha observado que, bajo condiciones de estrés oxidativo, FOXO3A es acetilado y transloca del citosol al núcleo, donde interacciona con la sirtuina 1 (Sirt1) nuclear que es capaz de desacetilar FOXO3A. A su vez, la actividad de Sirt1 es regulada por el cociente NAD/NADH y actúa como sensor del estado redox celular, activándose cuando los equivalentes reductores son limitados. Se ha demostrado que la actividad transcripcional de los factores de transcripción FOXO, en la mayoría de los casos, se eleva mediante desacetilación<sup>47</sup>. En pocas palabras, los blancos de FOXO incluyen genes que codifican para proteínas antioxidantes, interfiriendo con todos los niveles de reducción del oxígeno que generen ROS y causen daño a biomoléculas<sup>47</sup> (Fig. In10D).



### Figura In 10. Enzimas antioxidantes.

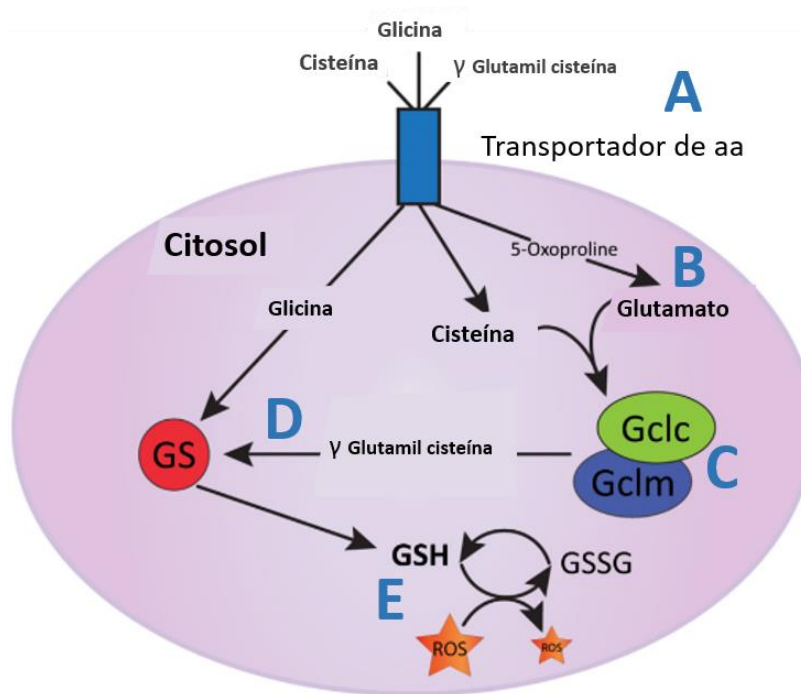
Las principales fuentes de ROS son las oxidasas citoplasmáticas o NOX (A) y los complejos I y III principalmente, de la ETC mitocondrial (B). El incremento en la concentración de ROS conduce a la activación de programas transcripcionales por parte del factor de transcripción FOXO3A (C), que conduce al incremento en la expresión de enzimas antioxidantes, principalmente las SOD (D). *Figura modificada de Schieber, M. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. 24, 10 (2014).*

Con respecto a otros sistemas antioxidantes, GSH, un tripéptido de glutamina, cisteína y glicina, es el antioxidante más abundante capaz de proporcionar equivalentes reductores. Las concentraciones de GSH intracelular están normalmente en un rango de tres órdenes de magnitud más altas que las de GSH extracelular. Los niveles intracelulares de GSH se mantienen tanto por la síntesis *de novo* de GSH como por la regeneración de GSH a través de la vía de reciclaje.

La síntesis *de novo* de GSH se produce a partir de los aminoácidos cisteína, glicina y glutamato mediante las enzimas glutamato-cisteína ligasa (GCL) y glutatión sintasa (GS) (Fig. In11 A-D). Es por ello que durante la activación de las células T el suministro intracelular de estos aminoácidos debe satisfacer la necesidad para la síntesis *de novo* de GSH (Fig. In11). De hecho, los procesos metabólicos que participan en el suministro de estos aminoácidos están estrechamente regulados durante la activación de las células T. Tras la activación de estas células, la glucólisis aumentada, la PPP y la glutaminólisis promueven la captación de cisteína y proporcionan glicina, glutamina y NADPH, favoreciendo la síntesis *de novo* de GSH<sup>37</sup>.

Por otro lado, el reciclado de GSH se produce a través de la glutatión-disulfuro reductasa (GSR) que regenera GSH a partir de su forma oxidada, glutatión disulfuro (GSSG) (Fig. In11E).

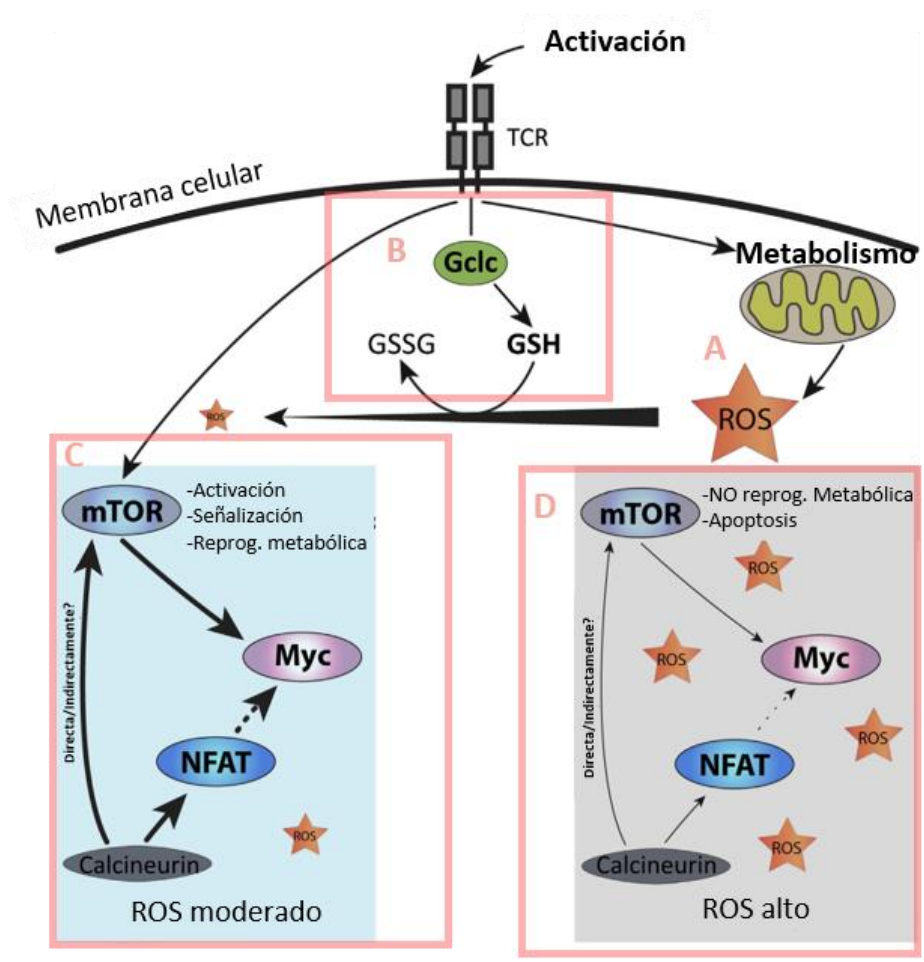




**Figura In 11. Síntesis del GSH.**

El sistema antioxidante celular más abundante es el GSH, un tripéptido  $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-glicina. Los precursores de GSH cisteína, glicina y la  $\gamma$ -glutamil cisteína ingresan a la célula mediante transportadores de aminoácidos (aa) (A). Dentro del citosol, la  $\gamma$ -glutamil cisteína se convierte en glutamato (B). La ligasa compuesta por las subunidades reguladora (Gclm) y catalítica (Gclc), liga al glutamato y la cisteína, constituyéndose como el paso limitante de la síntesis (C). Este dipéptido se une covalentemente a la glicina mediante la GSH-Sintasa (GS) para generar GSH (D). El GSH es parte del ciclo redox de la GSH peroxidasa (GPX), donde se transportan electrones entre su forma reducida (GSH) y oxidada (GSSG) para amortiguar la producción de ROS (E). *Figura modificada de Franchina, D. G., Dostert, C. & Brenner, D. Reactive Oxygen Species: Involvement in T Cell Signaling and Metabolism. Trends in Immunology 39, 489–502 (2018).*

El sistema GSH constituye un regulador muy importante de los niveles de ROS durante la activación de la célula T. Se ha demostrado que la producción excesiva de ROSm después de la ablación de la síntesis *de novo* de glutatión (GSH), suprime la actividad de mTOR y la expresión de factores de transcripción NFAT y c-Myc, evitando la reprogramación metabólica seguida de la activación de células T (Fig. In12)<sup>52</sup>.



**Figura In 12. El balance ROS/GSH permite un correcto control de los reguladores transcripcionales durante la activación de células T.**

La señalización a través del TCR conduce a la activación de mTOR y un concomitante incremento en la producción de ROS (A). Además, se induce la expresión de la ligasa Gclc que promueve la síntesis de GSH (B), garantizando de esta forma la integridad en procesos energéticos y metabólicos requeridos frente a una estimulación antígeno-específica. Los eventos esenciales radican en una activación efectiva de mTOR y Myc, los cuales sufren oxidaciones postraduccionales (C) pero su exposición a las ROS debe ser moderada para evitar la inactividad de dichas vías que comprometen la función y supervivencia celular (D). *Figura modificada de Franchina, D. G., Dostert, C. & Brenner, D. Reactive Oxygen Species: Involvement in T Cell Signaling and Metabolism. Trends in Immunology 39, 489–502 (2018).*

## Dinámica mitocondrial

### Fusión y fisión

Como mencionamos anteriormente, las mitocondrias se remodelan dinámicamente y desempeñan un papel esencial en la activación de las células T<sup>53,54</sup>, junto con las ROSm generadas por la ETC

durante la OXPHOS que actúan a niveles bajos como segundos mensajeros en la señalización, siendo fundamentales para la activación, proliferación y diferenciación<sup>7,54</sup>. Para llevar a cabo sus funciones las mitocondrias responden al estrés intentando mantener su estructura y composición. Esto se consigue, como se comentó anteriormente, a través de la acción de las proteínas desacoplantes, sistemas antioxidantes, reparación del ADN, etc. Adicionalmente, la calidad y actividad mitocondriales se mantienen y ajustan a través de la dinámica mitocondrial. En respuesta al tipo, fuerza y duración del estrés metabólico o genómico, la dinámica mitocondrial regula la fusión, fisión, movilidad, biogénesis y degradación mitocondrial. Particularmente, la fusión y fisión mitocondrial controlan la masa de las mitocondrias y el metabolismo al fusionar o dividir los componentes de la MMI, membrana mitocondrial externa (MME) y de la matriz. La dinámica mitocondrial es fundamental para mantener una población saludable de mitocondrias<sup>55,56</sup>.

Los eventos de fusión y fisión se encuentran condicionados por el entorno y función requerida por la célula. En situaciones como la privación de nutrientes, se induce la formación de una red tubular de mitocondrias al promover la fusión mitocondrial y suprimir la mitofagia (proceso de depuración mitocondrial). Por el contrario, un daño severo y prolongado del ADN conduce a la fisión mitocondrial y facilita la eliminación de las mitocondrias dañadas a través de mitofagia. Por lo tanto, la fusión y la fisión mitocondrial proporcionan un método para ajustar de manera eficiente y flexible la calidad y cantidad mitocondrial<sup>57</sup>.

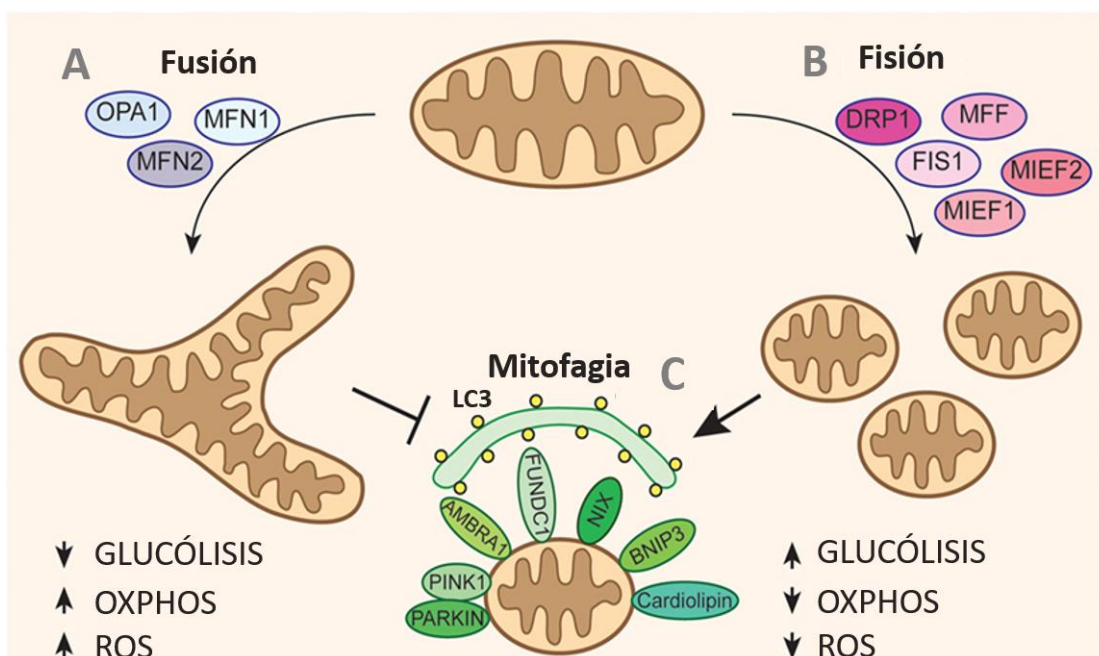
La fusión y fisión mitocondrial están mediadas por un grupo de proteínas similares a dinaminas conservadas filogenéticamente, con actividad GTPasas. Estas proteínas comprenden a la proteína 1 similar a la dinamina (DLP1/Drp1), mitofusina1 (Mfn1), mitofusina2 (Mfn2) y la proteína de atrofia óptica 1 (OPA1), las cuales son reguladas por ubiquitinación y escisión proteolítica<sup>58</sup>.

La fisión mitocondrial implica el reclutamiento y oligomerización de la proteína Drp1 que se encuentra en el citosol. Este proceso es facilitado por proteínas adaptadoras de la MME como el factor de fisión mitocondrial (del inglés, Mff)<sup>59</sup> (Fig. In13). De este modo, Drp1 se ensambla en complejos que envuelven la superficie mitocondrial desencadenando la fisión mitocondrial a través de su actividad GTPasa. Este mecanismo actúa para promover y facilitar la eliminación de mitocondrias disfuncionales<sup>58</sup>.

Por otro lado, las mitofusinas y OPA1 remodelan las membranas promoviendo la fusión de las mitocondrias<sup>57,58</sup>. Las isoformas de mitofusina, Mfn1 y Mfn2, están involucradas en la fusión de la

MME (Fig. In13). Además, pueden formar complejos homoméricos y heteroméricos y se requiere que las moléculas estén presentes en ambas membranas dispuestas para la fusión. Mientras que la proteína OPA1 en su forma no clivada o "Long" (L-OPA1) lleva a cabo la fusión de la MMI, siendo de esta manera una proteína remodeladora que regula tanto la morfología mitocondrial como la energética<sup>34,58,60</sup>. OPA1 es escindida constitutivamente por una proteasa liberando la forma corta soluble (S-OPA1) en el espacio intermembrana<sup>59,61</sup>. El procesamiento constitutivo de L-OPA1 da como resultado un equilibrio entre L-OPA1 y S-OPA1 regulando la fusión y la fisión. Las condiciones de estrés o disfunción mitocondrial, incluida una disminución en el PMM da como resultado un incremento en la escisión de L-OPA1 por una proteasa diferente, y la consecuente liberación de S-OPA1, fragmentación mitocondrial y posible apoptosis<sup>59,61</sup>. Por lo tanto, OPA1 ha sido identificada como un actor importante en la regulación de funciones claves de las mitocondrias, incluida la apoptosis y la capacidad respiratoria<sup>59</sup>.

Se ha demostrado que la dinámica mitocondrial y la remodelación de crestas controlan directamente el perfil y destino metabólico de la célula T. En este sentido, la fragmentación mitocondrial conduce a una disrupción de crestas reduciendo la eficiencia de la ETC y promoviendo la glucólisis aeróbica, predisponiendo a las células T a un fenotipo efector. Por otra parte, las células con mitocondrias fusionadas presentan mayor eficiencia de la ETC que potencia la OXPHOS, además de una alta capacidad respiratoria de reserva características de la FAO. Esta característica mitocondrial promueve el desarrollo de células T de memoria de larga vida. Por otra parte, la eliminación de la proteína OPA1 no solo altera la firma metabólica de las células Tmem, sino también las sesga hacia un fenotipo de célula Tef<sup>62</sup>. De este modo, la remodelación mitocondrial puede considerarse un mecanismo de señalización que instruye a la reprogramación metabólica en las células T<sup>34,53,57</sup> (Fig. In13).



**Figura In 13. Dinámica mitocondrial.**

La activación de la fusión mediada por OPA1-Mfn1/2, promueve la OXPHOS a expensas de la glucólisis, conduciendo a un incremento en los niveles de ROS (A). Por otro lado, los eventos de fisión mitocondrial mediados por Drp1 inhiben el metabolismo oxidativo mediante un incremento en la producción energética por parte de la glucólisis, con una reducción en la producción de ROS (B). La fisión es crítica para una correcta activación de mitofagia (C). *Figura modificada de Bordi, M., Nazio, F. & Campello, S. The Close Interconnection between Mitochondrial Dynamics and Mitophagy in Cancer. Front. Oncol. 7, 81 (2017).*

## Mitofagia

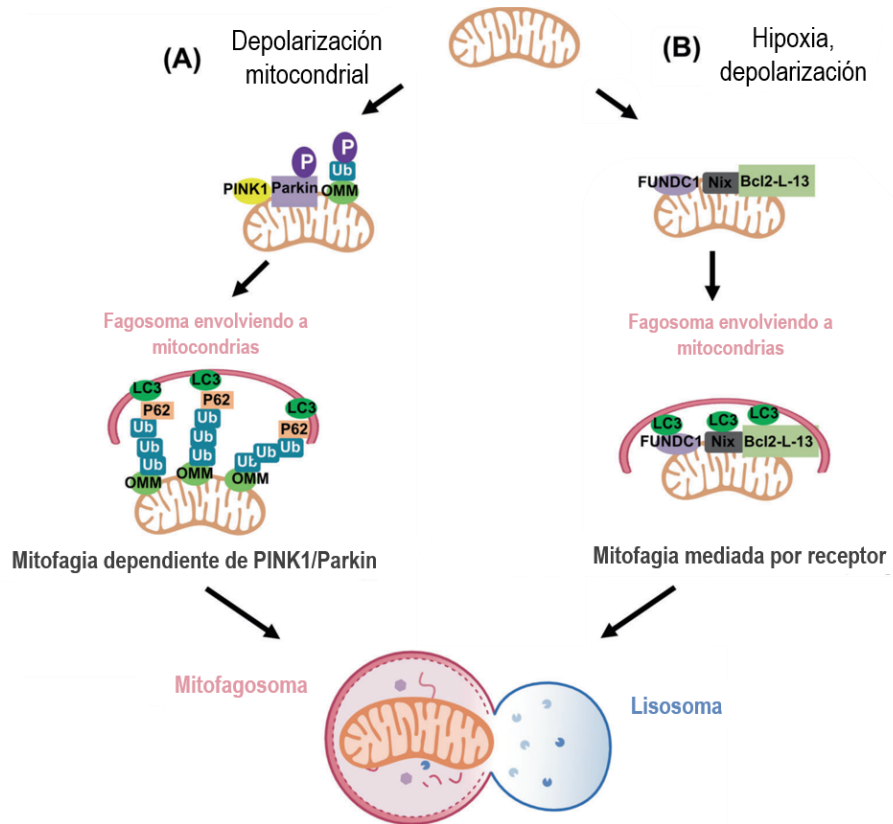
Como se mencionó previamente, otro proceso involucrado en el mantenimiento y depuración mitocondrial, es la mitofagia (Fig. In13). La mitofagia es una forma selectiva de autofagia que se dirige específicamente a mitocondrias para su degradación. En este proceso, una serie de receptores o adaptadores específicos median las vías de señalización que promueven el reclutamiento de maquinaria autofágica a mitocondrias disfuncionales, que luego son engullidas por el autofagosoma de doble membrana. Tras la posterior fusión del autofagosoma con un lisosoma, las mitocondrias dañadas son degradadas en el autolisosoma resultante. Hasta la fecha, se han identificado en mamíferos dos cascadas de señalización de mitofagia diferentes pero interconectadas: dependiente de ubiquitina (Ub)- e independiente de Ub o mediada por receptores.

### Mitofagia Ubiquitina-dependiente

La vía de mitofagia mediada por Ub es impulsada por las proteínas: quinasa putativa 1 inducida por PTEN (PINK1) y Parkin<sup>63</sup>. Cuando las mitocondrias son funcionales, es decir no presentan alteraciones en su PMM, PINK1 se encuentra en la membrana mitocondrial y Parkin en el citoplasma de manera inactiva. En estas condiciones, PINK1 sufre procesamiento y degradación por varias proteasas de manera que la mitofagia no se activa. Sin embargo, en respuesta a la pérdida del PMM, se produce la estabilización de PINK1 en la MME. Entonces, PINK1 se activa por autofosforilación y esto conduce a la translocación de Parkin a la superficie mitocondrial. La fosforilación dependiente de PINK1 altera la conformación de Parkin, desencadenando su actividad E3-ubiquitin-ligasa<sup>63,64</sup>. Una vez que se encuentra completamente activada por PINK1, Parkin acumula cadenas de Ub en proteínas de la MME que son nuevamente fosforiladas por PINK1 y reclutan más Parkin. Por lo tanto, PINK1 y Parkin funcionan de manera coordinada para acumular cadenas de Ub sobre proteínas de la MME, que se requiere para reclutar receptores de autofagia a las mitocondrias<sup>63</sup>. Estos receptores contienen tanto dominios de unión de Ub como regiones de interacción con LC3 (LIR) y son, por lo tanto, capaces de unirse simultáneamente a las cadenas de Ub de las proteínas presentes en las mitocondrias y proteínas presentes en autofagosomas<sup>63</sup> (Fig. In14A).

### **Mitofagia Ubiquitina-independiente**

Por otro lado, receptores específicos localizados en la MME también puede desencadenar mitofagia, pero de manera Ub-independiente. Estos receptores reclutan la maquinaria de autofagia hacia las mitocondrias a través de sus motivos LIR<sup>63-65</sup>. Ciertas condiciones como la hipoxia, una incrementada OXPHOS, o la depolarización de la membrana mitocondrial incrementan la expresión de dichos receptores, promoviendo la fisión seguida de mitofagia<sup>66</sup> (Fig. In14B).



**Figura In 14. Mecanismos de mitofagia.**

Las mitocondrias disfuncionales inician la mitofagia dependiente de PINK1/Parkin al evitar el clivaje de PINK1, la cual se estabiliza en la MME. Luego PINK recluta a Parkin a través de su fosforilación y la de la Ub. Las proteínas de la MME son subsecuentemente ubiquitinadas por la E3 ligasa Parkin. Estas proteínas de la MME ubiquitinadas sirven como sitios de unión para p62. Luego, p62 recluta LC3 y se ensambla la membrana para la remoción selectiva de la mitocondria (A). Las células bajo ciertas condiciones como hipoxia o pérdida del potencial de membrana mitocondrial expresan los receptores como FUNDC1, Nix o Bcl-L13 en la MME y atraen a LC3 vía motivos LIR (Regiones de interacción con LC3) para la formación del mitofagosoma desencadenando la mitofagia mediada por receptores (B). La mitofagia mediada por ambas vías se concreta mediante la unión del mitofagosoma al lisosoma para continuar con su degradación. *Figura modificada de 1.Xian, H. & Liou, Y.-C. Functions of outer mitochondrial membrane proteins: mediating the crosstalk between mitochondrial dynamics and mitophagy. Cell Death Differ 28, 827–842 (2021).*

## Tratamientos antioxidantes

La producción excesiva y prolongada de ROS, la alteración en los reguladores redox o un desequilibrio en la expresión de enzimas antioxidantes pueden dañar considerablemente los constituyentes celulares dando como resultado la senescencia o la muerte celular<sup>67,68</sup>. Así, el desequilibrio en la producción de ROSm está implicado en el inicio de diversas enfermedades<sup>41</sup>.

Además, las respuestas inmunes protectoras pueden verse perjudicadas por el estrés metabólico causado por desbalances en el sistema redox<sup>57</sup>. Por lo tanto, la modulación de los niveles de ROS con antioxidantes exógenos podría ser una estrategia adecuada para prolongar la supervivencia de las células T y mejorar su función.

Ciertas variables como la localización y el tipo de ROS generadas, la abundancia relativa de antioxidantes endógenos en el sitio de producción, las constantes de velocidad de antioxidantes endógenos para las ROS generados, junto con sus concentraciones relativas, son determinantes vitales del éxito o fracaso de un antioxidante administrado para ayudar a prevenir el daño celular. A menudo, sin embargo, muchos de estos detalles se desconocen, por lo que la selección de un antioxidante apropiado para una condición específica resulta ser difícil<sup>69</sup>.

## N-Acetil cisteína (NAC)

NAC es un compuesto tiol para el que se han propuesto múltiples maneras en las que ejerce su poder antioxidante. Tiene un efecto indirecto, ya que es un precursor para la síntesis de GSH y un efecto directo actuando como eliminador de algunos oxidantes, y como sustrato de varias enzimas antioxidantes<sup>70,71</sup>. Además, NAC presenta la capacidad de romper disulfuros, es decir que cuando un estado de estrés oxidativo agota las reservas de tioles (SH), puede fragmentar las proteínas tioladas liberando así tioles<sup>72</sup>.

El NAC constituye la forma acetilada de L-cisteína la cual se absorbe más eficientemente y se metaboliza principalmente por el hígado. La absorción casi completa y la disponibilidad en circulación proporciona una gran cantidad de NAC para su captación celular, desacetilación de cisteína y síntesis de GSH<sup>73</sup>.

Existen tratamientos con NAC, tanto patentados como en ensayos clínicos, para diversas patologías entre las que se encuentran enfermedades pulmonares, intoxicación por fármacos, enfermedad cardiovascular, diabetes y cáncer<sup>69</sup>. Debido a los diversos efectos biológicos de NAC se ha propuesto como un potencial adyuvante terapéutico en el tratamiento de la diabetes tipo II<sup>73</sup>, en el tratamiento de biopelículas bacterianas resistentes<sup>74,75</sup>, así como en casos graves de COVID-19<sup>76-78</sup>. Por otra parte, existen ensayos clínicos prometedores que emplean NAC en diversos trastornos neuropsiquiátricos como por ejemplo Alzheimer y Parkinson, entre otros<sup>79</sup>.



En cuanto al uso de NAC como tratamiento antioxidante para revertir defectos en la funcionalidad de las células T, se ha reportado que es capaz de prevenir los defectos deletéreos causados por excesivos niveles de ROS en células T deficientes Gclc (la subunidad catalítica de glutamato cisteína ligasa involucrada en la biosíntesis de GSH)<sup>52</sup>. Por otra parte, se ha probado que es un antioxidante eficaz en la inmunoterapia de transferencia de células T adoptivas. Esta terapia involucra a las células T madre de memoria diferenciadas tempranamente (Tscm) capaces de persistir a largo plazo y generar potentes efectores antitumorales. Debido a su escasez *ex vivo*, las células Tscm pueden derivarse de precursores Tn. Se ha reportado, que limitando los niveles de ROS con NAC durante la activación de células Tn bloquea la diferenciación terminal, al tiempo que permite la proliferación y generación de células T de memoria de larga duración con características de células madre. De esta manera se ha propuesto como un enfoque factible y económico para obtener células T que se utilizarán en inmunoterapia de transferencia adoptivas, con el fin de aumentar la inmunidad antitumoral<sup>80</sup>.

## Ribósido de Nicotinamida

El ribósido de nicotinamida (NR) se ha convertido recientemente en uno de los medicamentos precursores del nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) más estudiados debido a sus numerosos beneficios potenciales para la salud. NAD<sup>+</sup> es una coenzima y un cofactor esencial de diversas enzimas como las desacetilasas, y de enzimas involucradas en reacciones redox celulares para producir energía, que juegan un papel importante en diversas vías metabólicas<sup>81</sup>. De esta manera, el aumento de su contenido general se ha propuesto como una valiosa estrategia para el tratamiento de una amplia variedad de condiciones fisiopatológicas<sup>82</sup>.

Los mamíferos pueden sintetizar NAD<sup>+</sup> a partir del triptófano a través de una vía *de novo*, a partir del ácido nicotínico (NA) mediante una vía alternativa que converge con la vía *de novo*, y mediante la vía de rescate intracelular de NAD<sup>+</sup>, que constituye la ruta principal por la cual las células mantienen los niveles de NAD<sup>+</sup>, reciclandolo a partir de Nicotinamida (NAM), NA, NR y Nicotinamida mononucleótido (NMN)<sup>83,84</sup>.

La disminución sistémica de NAD<sup>+</sup> se debe tanto a la disminución de la tasa de biosíntesis como a un aumento en su consumo. La inmensa demanda de NAD<sup>+</sup> se debe a su importancia en las reacciones de óxido-reducción, incluyendo la mayoría de reacciones catabólicas y anabólicas, como

glucólisis, FAO, ciclo del TCA, síntesis de ácidos grasos, colesterol, esteroides, etc. Adicionalmente, las numerosas enzimas que consumen NAD<sup>+</sup>, entre las que se encuentran las sirtuinas, contribuyen a un agotamiento general de NAD<sup>+</sup><sup>82</sup>.

En general, NR aumenta el NAD<sup>+</sup> intracelular y mitocondrial, mejora la actividad de Sirt1 y Sirt3, mejora el gasto energético y el rendimiento oxidativo del músculo esquelético y tejido adiposo pardo, y se ha demostrado que la suplementación crónica con NR aumenta el NAD<sup>+</sup> de forma tejido específica<sup>85,86</sup>.

Recientemente, se demostró en ratones que las células T con mitocondrias disfuncionales inician un programa proinflamatorio que se asocia con un mayor número de células senescentes, aumento de la disfunción metabólica y física, y envejecimiento prematuro<sup>87</sup>. En este contexto, la suplementación con NR pudo rescatar parcialmente este síndrome de multimorbilidad, en parte al reducir la inflamación y la frecuencia de células senescentes<sup>87</sup>.

Adicionalmente, se ha validado la eficiencia de NR en numerosos estudios en animales y humanos para el tratamiento de una serie de trastornos cardiovasculares, neurodegenerativos y metabólicos<sup>82</sup>, así como en un modelo de sepsis, donde su administración disminuyó la permeabilidad microvascular y disfunción miocárdica, lo que condujo a una menor mortalidad<sup>88</sup>.

## Enfermedad de Chagas

### Epidemiología

La enfermedad de Chagas es una antropozoonosis del continente americano que se ha propagado más allá de sus límites geográficos originales como consecuencia de la migración. Su agente etiológico es el protozooario *T. cruzi*, identificado en la primera década del siglo XX<sup>89</sup>. Es endémica en 21 países de América Latina, desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina y Chile. Tradicionalmente se ha limitado a zonas rurales pobres de América Central y del Sur, donde la transmisión vectorial es la principal vía de contagio. La incidencia de infección por *T. cruzi* es menor de 0,1% a 4% por año en regiones hiper-endémicas como el Chaco boliviano. La migración interna

reciente desde áreas rurales a urbanas, la transmisión congénita y la donación de sangre han permitido que la enfermedad se propague a regiones no afectadas, principalmente grandes áreas urbanas. La enfermedad de Chagas ha traspasado fronteras internacionales y actualmente es considerada un problema de salud pública a nivel global, ya que puede transmitirse en regiones no endémicas. Se estima que la prevalencia agrupada de la infección en inmigrantes latinoamericanos que viven en Europa es del 4,2%. Mientras que en EE.UU. se calcula que hay alrededor de 300 000 inmigrantes infectados con *T. cruzi*<sup>89</sup>.

Argentina es la población con mayor prevalencia de la enfermedad de Chagas en el mundo, representando el 20% del total de los infectados globales<sup>90</sup>. Se estima que alrededor de 1,6 millones de personas están infectadas en nuestro país. Además, ocurren aproximadamente 1000 contagios anuales por transmisión vectorial, alrededor de 1500 contagios por transmisión congénita, hay una prevalencia de 3000 donantes de sangre infectados y anualmente, casi 3 millones de personas corren riesgo de contraer la infección. Se estima que alrededor de 300 000 personas padecen cardiomiopatía chagásica en nuestro territorio nacional<sup>91</sup>. Según el Instituto Nacional de Estadística y Censo de la República Argentina (INDEC) entre los años 2012 y 2018 hubo 3160 muertes a causa de esta enfermedad. La mayoría de los datos se encuentran actualizados hasta el año 2010, y no se encuentra información o cifras oficiales correspondientes a los últimos diez años.

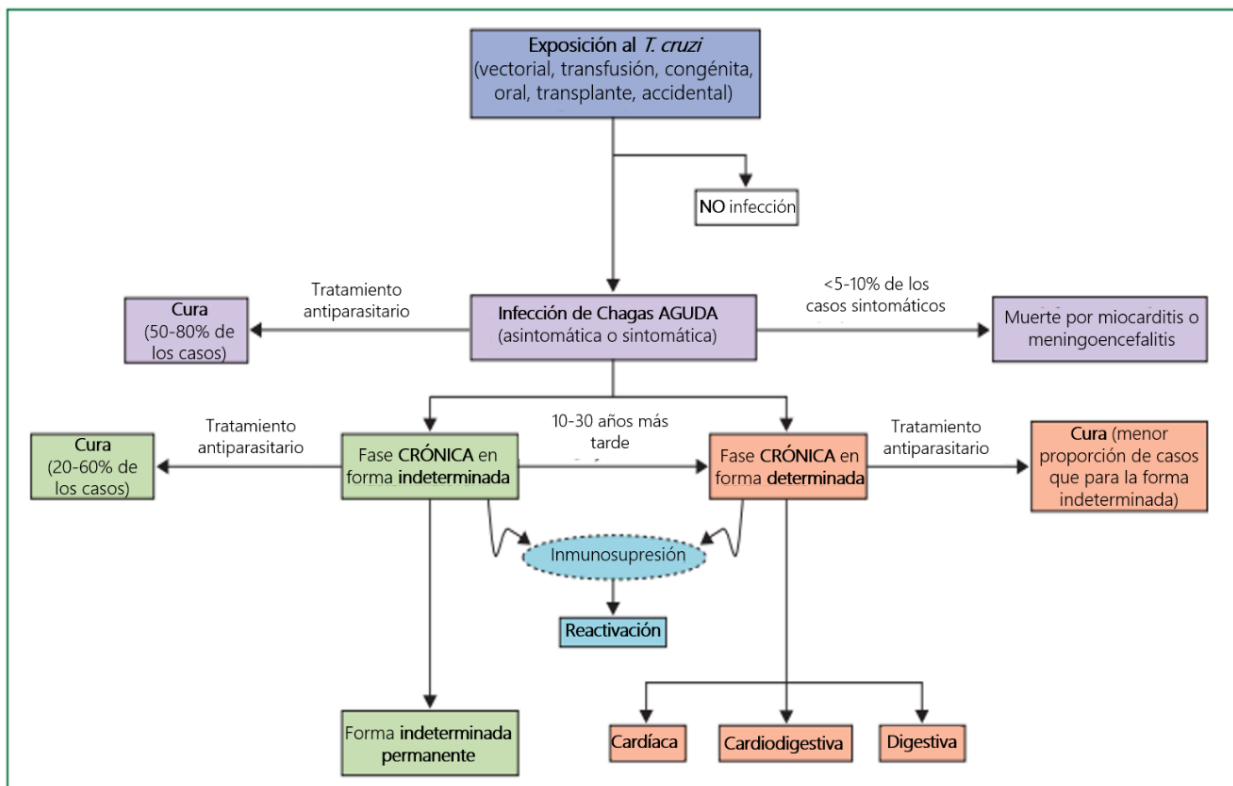
Con respecto al costo económico de la enfermedad, en los países más australes de América, la enfermedad provoca la pérdida de aproximadamente 752 000 días laborables por muerte prematura y 1,2 mil millones de dólares en productividad. La carga mundial anual por enfermedad de Chagas estimada es de \$ 627,46 millones en costos de atención médica y 806 170 años de vida ajustados por discapacidad; el 10% de esta carga afecta a países no endémicos<sup>89</sup>.

## Historia natural de la infección

El curso clínico de la enfermedad en la infección por *T. cruzi* suele comprender una fase aguda y una fase crónica<sup>89,92</sup>. La infección aguda puede ocurrir a cualquier edad y es asintomática en la mayoría de los casos. La fase aguda dura de 4 a 8 semanas y la parasitemia disminuye sustancialmente a partir de los 90 días. La enfermedad aguda grave ocurre en menos del 1-5% de los pacientes e incluye manifestaciones como miocarditis aguda, derrame pericárdico y meningoencefalitis (riesgo de mortalidad 0,2–0,5%). La mayoría de las infecciones congénitas cursan asintomáticas o tienen

síntomas leves, pero una minoría tiene síntomas graves con posibilidad de complicaciones y muerte. La transmisión oral a través de los alimentos o bebida contaminada con heces de triatomíneos parece causar una enfermedad más grave, con mayor mortalidad que la enfermedad transmitida por vectores<sup>89,93</sup>, y es una de las principales vías de infección en Brasil<sup>94</sup>.

La fase aguda suele resolverse espontáneamente después de un tiempo a partir del cual los pacientes permanecen infectados crónicamente si no son tratados. Esta llamada forma indeterminada de la enfermedad, tiene un buen pronóstico y se caracteriza por seropositividad para *T. cruzi*, ausencia de signos clínicos y síntomas de afectación cardíaca, digestiva, y radiografía de tórax y electrocardiografía normales. Pero cada vez más pacientes con enfermedad indeterminada son diagnosticados con problemas cardíacos o sutiles anomalías digestivas, a medida que los métodos de diagnóstico se vuelven más sensibles. Aproximadamente del 30 al 40% de los pacientes con infección crónica puede desarrollar afectación de órganos, 10 a 30 años después infección aguda, principalmente cardiomiopatía o megavísceras -megaesófago, megacolon, o ambos<sup>89,93</sup> (Fig. In15).



**Figura In 15. Historia natural de la infección por *Trypanosoma cruzi*.**

La infección por *T. cruzi* se caracteriza por una Fase Aguda donde el 5-10% de los casos sintomáticos fallecen por miocarditis o meningoencefalitis. Si se administra un tratamiento antiparasitario en esta fase, el 50-80%

de los pacientes alcanzan la cura. La progresión a la Fase Crónica puede resultar indeterminada, cuyo tratamiento logra la cura en un 20-60% de los casos, o puede presentar enfermedad cardíaca, cardiodigestiva o digestiva y cuyo tratamiento puede alcanzar la cura en una muy baja proporción. Ambas formas de infección crónica pueden incurrir en una inmunosupresión y su consecuente reactivación. Además, la infección crónica indeterminada puede permanecer así, o puede evolucionar a cualquier forma de enfermedad. *Figura modificada de Rassi, A. & Marin-Neto, J. A. Chagas disease. The Lancet 375, 1388–1402 (2010).*

## Respuesta inmune en la infección por *Trypanosoma cruzi*

La fase aguda de la infección por *T. cruzi* se caracteriza por una fuerte inhibición de la respuesta inmune del hospedador debida a ciertos factores de virulencia del parásito, que son cruciales para crear una infección persistente y establecer la enfermedad crónica<sup>95</sup>. Tanto en humanos como en modelos experimentales, esta fase está marcada por un estado de inmunosupresión<sup>5,6</sup>, y resulta de la acción tanto directa como indirecta del parásito sobre los linfocitos<sup>98</sup>. Involucra la inducción de anergia<sup>99</sup> y delección clonal en el compartimento de células T<sup>98,100</sup>, que en última instancia restringe el desarrollo de linfocitos antígeno-específicos. De todos modos, los mecanismos subyacentes a la incapacidad para eliminar totalmente las células infectadas por *T. cruzi* no han sido completamente dilucidados hasta la fecha.

Durante la fase aguda intervienen tanto la inmunidad innata como adaptativa. Inicialmente, los Macrófagos median la fagocitosis de tripomastigotes metacíclicos altamente virulentos. Aunque la mayoría son destruidos en vacuolas parasitóforas, algunos amastigotes escapan a este mecanismo e inician la replicación intracelular, causando daño celular y lisis, y de esta forma, promoviendo la diseminación del parásito a través del torrente sanguíneo. Esto conduce a la producción de citoquinas, proteínas catiónicas, complemento y transferrinas, con la inducción de interferones, IL-10 y factor de necrosis tumoral (por sus siglas en inglés, TNF)<sup>101</sup>. Los tripomastigotes liberados en el torrente sanguíneo tras la lisis celular, expresan moléculas de superficie que interrumpen los componentes iniciales claves de la vía del complemento, mientras que otros estimulan los receptores inmunorreguladores, retrasando la progresión de una respuesta inmune protectora<sup>95</sup>.

Las respuestas inmunitarias adaptativas en general, constan de una fase de inducción que consiste en el reconocimiento de antígenos y activación de linfocitos, seguida de una fase efectora conducente a la eliminación del patógeno. Posteriormente, la respuesta inmune se contrae, restaurando la homeostasis. Algunas células T específicas de antígenos sobreviven y se convierten en células de larga vida, responsables de la memoria inmunológica. La duración de cada fase puede

variar en las respuestas inmunes desencadenadas por diferentes condiciones<sup>102</sup>. En el caso de esta infección, después de una entrada inmunológicamente silenciosa en la fase temprana, el protozooario *T. cruzi* alcanza e invade los órganos blanco, y se multiplica activamente durante una sostenida respuesta inmunológica que involucra a los linfocitos T CD4, CD8 y linfocitos B. Dicha respuesta conduce a la inducción de citotoxicidad, secreción de citoquinas y una activación policlonal de células B generando hipergammaglobulinemia, y anticuerpos anti-*T. cruzi* que son ineficientes para el control de la infección, lo cual se cree que constituye un mecanismo de evasión inmune que desvía las respuestas específicas. El retraso en la generación de anticuerpos neutralizantes se debe en parte a la co-expresión de varios epítopes relacionados, pero no idénticos derivados de las proteínas de la superficie del tripomastigote<sup>95</sup>.

Luego de la progresión en la infección, se establece una respuesta T CD8 centrada en los epítopes inmunodominantes de *T. cruzi* que controla la parasitemia e infección de tejidos, pero no logra eliminar completamente el parásito. Este resultado no es perjudicial para el parásito, ya que reduce la mortalidad del hospedador.<sup>95</sup> En esta fase, el control altamente eficiente del parásito es el resultado de una intensa respuesta inflamatoria con producción activa de anticuerpos y activación de la respuesta inmune innata (células NK y Mc) por citoquinas pro-inflamatorias Th1 tales como TNF e IFN  $\gamma$ <sup>89</sup> (Fig. In16).

Se ha demostrado la dependencia de respuestas mediadas por células T CD8 y CD4 para el control de la infección aguda por *T. cruzi*. De hecho, ratones modificados genéticamente que no expresan el MHC tanto de tipo I como de tipo II (que presentan antígenos a CD8 o CD4, respectivamente), o ratones en los que se eliminan las células T, son altamente susceptibles a la infección comparados a los ratones salvajes (WT). Por otra parte, la respuesta de las células T CD8 puede desarrollarse en ratones infectados con *T. cruzi* en ausencia de colaboración T CD4. Sin embargo, sin dicha cooperación no logran alcanzar la frecuencia de células T CD8 necesaria para el control de la infección. El aumento de la carga parasitaria en la infección aguda es probablemente un parámetro crítico que rige la expansión de células T CD8 específicas, dependiente de células T CD4<sup>101,103</sup>.

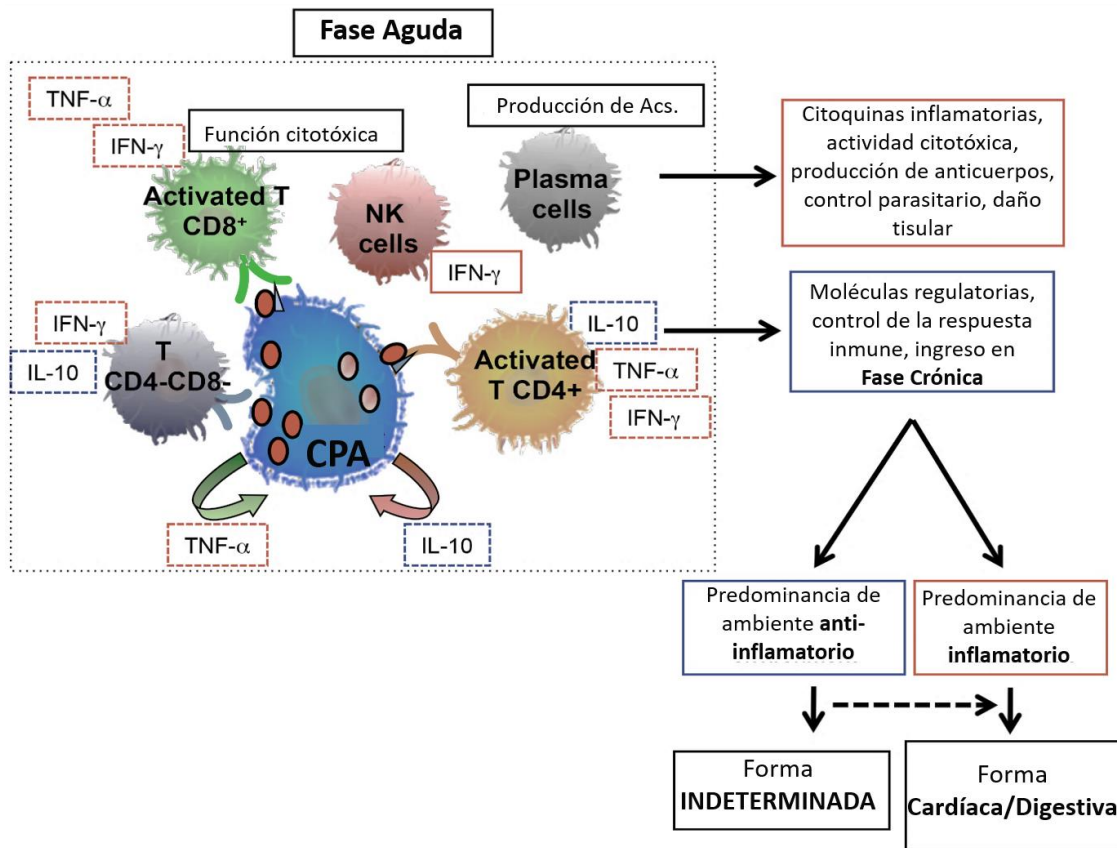
Se sabe que la decisión de las células T de producir citoquinas tipo Th1 o Th2 está predominantemente definida por las citoquinas en el microambiente y, en cierta medida, por la fuerza de la interacción entre el TCR y el antígeno. El efecto protector de las células Th1 se relaciona con la activación mediada por IFN $\gamma$ , de acción tripanocida llevada a cabo por Mc, además de la

colaboración en la inducción de células T CD8 y en el cambio de isotipo en células B<sup>103</sup>. Se han detectado en ratones, células T CD4 y CD8 que producen IL-17A en la infección temprana por *T. cruzi* y como se ha demostrado, la IL-17 restringe el desarrollo de la respuesta inmune tipo Th1<sup>103</sup>. Por otra parte, existen reportes que indican que las células Th17 le confieren una gran protección frente a la muerte causada por *T. cruzi*, siendo más beneficiosa en este caso, que la respuesta Th1<sup>104</sup>.

Las respuestas linfoproliferativas T resultan de la activación insuficiente de CPA y alteraciones en la vía de señalización IL-2/IL-2R. Además, la apoptosis de los linfocitos T, particularmente pronunciada durante la fase aguda de la infección, probablemente contribuya a retrasar la respuesta. Las células T, en la infección crónica, están más relacionadas con el proceso fisiológico de muerte celular programada inducida por activación. Algunos epítopes de estas moléculas son los principales antígenos de células T CD4 y tienen una baja afinidad por los TCR. Por tanto, inducen células T anérgicas en lugar de respuestas óptimas. Tal presentación alterada de péptidos puede tener un impacto sustancial en sesgar la respuesta global a niveles subóptimos<sup>98</sup>.

La apoptosis es crucial para la homeostasis normal del tejido y para la modulación de la respuesta inmune. Durante infecciones parasitarias, la muerte programada puede dispararse por antígenos, factores secretados o liberados por patógenos y por activación celular intensa. Evidencias recientes demuestran que los protozoarios limitan los mecanismos defensivos para sobrevivir, y toman ventaja de la muerte celular para diseminarse<sup>98</sup>.

Las células T CD4 son esenciales para el desarrollo de respuestas primarias y, en particular, de las células T CD8 de memoria en entornos variados, incluidos las infecciones y el cáncer<sup>102</sup>. Sin embargo, el rol de las células T CD4 que colaboran en el desarrollo de la respuesta inmune durante la infección por *T. cruzi* ha sido poco investigado<sup>102</sup>.



**Figura In 16. Respuesta inmune frente a la infección por *Trypanosoma cruzi*.**

Durante la Fase Aguda de la infección por *T. cruzi*, ocurre la activación de Mc y células NK, así como la producción de anticuerpos por parte de células plasmáticas. Estos eventos conducen al control en los niveles de la parasitemia, observado hacia el final del período agudo y a lo largo de la Fase Crónica de la infección. Las células NK y Mc activan otras células tales como linfocitos T CD4 y CD8. Cada célula tiene asociado un perfil de citoquinas (recuadro punteado próximo a cada tipo celular). La producción de IL-10 y otras moléculas anti-inflamatorias influenciarían el control de la respuesta, disminuyendo el daño tisular y permitiendo la progresión a la Fase Crónica. Hay evidencias de que la predominancia de un ambiente inflamatorio durante la Fase Crónica estaría relacionada con el desarrollo de enfermedad cardíaca y digestiva, mientras que un entorno anti-inflamatorio comprometería al desarrollo de una forma indeterminada de la enfermedad. *Figura modificada de Andrade, D. V., Gollob, K. J. & Dutra, W. O. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. PLoS Negl Trop Dis 8, e3010 (2014).*



## ANTECEDENTES E HIPÓTESIS

Los eventos biológicos que conducen a la cronicidad de la infección por *T. cruzi* son numerosos. En particular, un fenómeno ampliamente estudiado es la inmunosupresión de linfocitos T CD4 durante la fase aguda, considerando a la misma como una disminución en la capacidad proliferativa y menor producción de IL-2. Sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes a estos efectos son pobremente conocidos.

Resulta fundamental definir los mecanismos que afectan la viabilidad y funcionalidad de los linfocitos T CD4, de modo tal que se contribuya al desarrollo de futuras estrategias terapéuticas que puedan potenciar la respuesta inmune en el contexto de esta infección.

Reportes previos de nuestro grupo demostraron que uno de los mecanismos que causan funcionalidad reducida de las células T CD4 durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi* está relacionada con el aumento de la expresión de las moléculas inhibitorias CTLA-4 y PD-1 y una menor producción de IL-2 que favorecen la expresión de la E3-Ubiquitina-Ligasa GRAIL (*Gene related to anergy in Lymphocytes*), una enzima que degrada mediadores de señalización<sup>105</sup>.

Teniendo en cuenta que ciertas vías metabólicas tales como la glucólisis, la respiración mitocondrial y la oxidación de ácidos grasos, pueden determinar el desarrollo de las funciones efectoras de las células del sistema inmune, éstas pueden volverse blancos predilectos de numerosos patógenos en sus estrategias de inmunoevasión<sup>13</sup>. Sin embargo, aspectos inherentes al metabolismo no han sido estudiados en el contexto la infección por *T. cruzi*, generando el gran interrogante de qué contribución tienen sus posibles alteraciones en la disfunción de las células T.

Con respecto a las implicancias del metabolismo en la funcionalidad celular, hay reportes en modelos de infecciones principalmente crónicas, donde se demuestra que la disfunción mitocondrial conduce a las células T CD8 a un fenotipo exhausto, y que este fenómeno involucra la señalización a través de PD-1<sup>106-108</sup>. La expresión de PD-1 también se ha vinculado fuertemente a la producción de especies oxidantes en linfocitos T aloreactivos en modelos de enfermedad de injerto contra hospedador<sup>109</sup>. En modelos de tumores se evidenció el vínculo entre defectos en la dinámica mitocondrial y agotamiento de linfocitos T CD8<sup>110</sup>, así como alteraciones mitocondriales en linfocitos T que se asocian a patologías autoinmunes y a envejecimiento<sup>67,111,112</sup>.

Los reportes de alteraciones mitocondriales y metabólicas en células T CD4 son escasos, y particularmente en enfermedades por protozoarios intracelulares o más específicamente, en la

infección causada por *T. cruzi*, no existe asociación de dichos fenómenos con los defectos en la respuesta adaptativa que conducen al establecimiento exitoso de una fase crónica.

Basándonos en la evidencia mencionada, y en la certeza de que la regulación metabólica y mitocondrial son esenciales en el desempeño de estas células, nos planteamos como hipótesis de trabajo:

*“La infección por T. cruzi causa alteraciones metabólicas y mitocondriales en los linfocitos T CD4, que deterioran la respuesta de estas células durante la fase aguda de la infección, favoreciendo el establecimiento de una fase crónica”.*

## Objetivos

### Objetivo general

Evaluar la participación de alteraciones metabólicas y mitocondriales en los linfocitos T CD4 y su impacto en la función de estas células durante la infección por *T. cruzi*.

### Objetivos específicos

1. Evaluar vías metabólicas, el estado y dinámica mitocondrial de las células T CD4 de animales infectados durante la fase aguda y crónica de la infección. Caracterizar el fenotipo de células T CD4 que presenten alteraciones metabólicas.
2. Estudiar si las alteraciones metabólicas y mitocondriales conducen a un deterioro en la funcionalidad de las células T CD4 durante la infección.
3. Valorar mecanismos antioxidantes en las células T CD4 de animales infectados.
4. Determinar los posibles mecanismos que conducen a las alteraciones metabólicas y mitocondriales en las células T CD4 durante la infección.

## RESULTADOS I

Perfil metabólico y estado mitocondrial de células T  
CD4 durante la infección por *T. cruzi*

## RESULTADOS I.

1. Las células T CD4 provenientes de ratones infectados en la fase aguda presentan un metabolismo exacerbado.

Las células eucariotas, en general, utilizan una red integrada de glucólisis, del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y la fosforilación oxidativa (OXPHOS) para satisfacer la mayoría de sus demandas energéticas y para proporcionar intermediarios necesarios para el crecimiento y la proliferación celular. Estas vías comienzan con la retención intracelular de glucosa libre en forma de glucosa-6-fosfato, que posteriormente se metaboliza a piruvato. El piruvato se reduce a lactato o es transportado a las mitocondrias, donde forma acetil coenzima A (CoA). El acetil CoA luego entra en el ciclo de TCA. Los intermediarios de alta energía del ciclo TCA impulsan el movimiento de electrones en la cadena de transporte de electrones (ETC), que a su vez expulsa  $H^+$  desde la matriz mitocondrial para generar un gradiente de  $H^+$  a través de la membrana mitocondrial interna. El oxígeno actúa como aceptor final de electrones y los  $H^+$  regresan a la matriz mitocondrial a través del complejo FO/F1, donde su energía potencial se utiliza para generar ATP<sup>113</sup>.

### **1.1 Captación de glucosa y expresión de transportador de glucosa GLUT1**

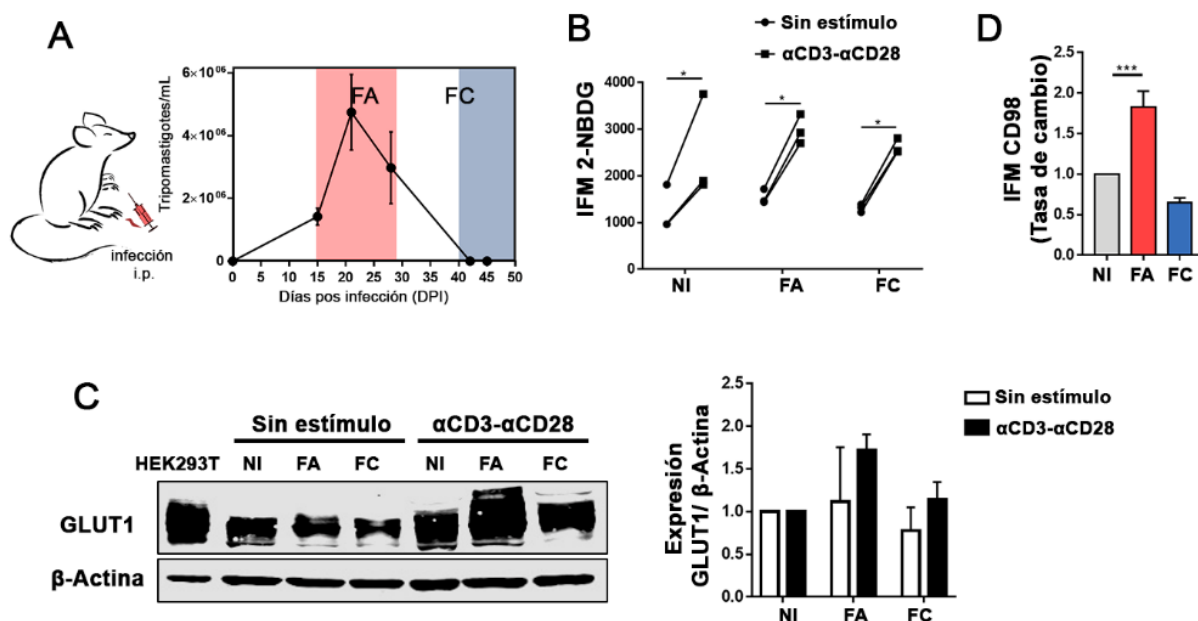
Se ha demostrado ampliamente que la funcionalidad de las células T CD4 puede verse afectada durante el transcurso de la infección por *T. cruzi*<sup>97,98,105</sup>. Durante la activación, las células T CD4 requieren una reprogramación metabólica cuyo balance se inclina hacia el incremento de la tasa de glucólisis con respecto a la fosforilación oxidativa<sup>23,24</sup>. Es por ello que nos propusimos evaluar los perfiles metabólicos y la bioenergética de las células T CD4 provenientes de bazo de animales no infectados (NI), infectados en fase aguda (FA, pico de parasitemia a los 20-22 días posterior a la infección o d.p.i.) y fase crónica (FC, a los 42 d.p.i. aproximadamente, donde la parasitemia es indetectable) (Fig. 1A).

Teniendo en cuenta lo mencionado, en una primera etapa de esta tesis decidimos evaluar la captación de glucosa mediante el empleo de una molécula fluorescente, análoga a la glucosa. Dicha molécula, 2-NBDG ((2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il) amino)-2-desoxiglucosa), compete con la D-glucosa por el ingreso a la célula a través de los transportadores GLUT1. De este modo, al privar de glucosa a la célula, las moléculas de 2-NBDG ingresan y se acumulan en el interior de la célula, siendo la intensidad de fluorescencia proporcional a la cantidad de sonda captada. Se purificaron

células T CD4 de bazo de los tres grupos experimentales (NI, FA y FC) y se cultivaron durante 24 h en condiciones no estimulantes o con anti-CD3 anti-CD28 como estímulo policlonal. Luego, las células se hambreadon durante 30 minutos y se procedió a la incubación con 2-NBDG. Al comparar las intensidades de fluorescencia entre las condiciones sin estímulo y aquellas con estímulo policlonal, pudimos corroborar que las células T CD4 de ratones infectados eran capaces de incrementar la captación del análogo de glucosa luego de inducir su activación, de forma similar a las células de animales NI (Fig. 1B).

Adicionalmente, evaluamos la expresión de GLUT1, siendo éste el transportador de glucosa que predomina en linfocitos. Se cultivaron células T CD4 de animales NI e infectados durante 24 h en ausencia y presencia de anti-CD3 anti-CD28. Luego, la expresión total de GLUT1 se evaluó en el lisado celular por ensayos de Western blot. Si bien no se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de este transportador en las células T CD4 provenientes de los distintos grupos de animales, se evidencia una tendencia a aumentar en presencia de estímulo policlonal durante la FA de la infección (Fig. 1C).

Asimismo, nos preguntamos si el transportador de aminoácidos neutros CD98 se encontraba diferencialmente expresado en los distintos grupos experimentales. Para ello, se realizó una citometría de flujo donde determinamos la expresión de CD98. Encontramos que, en concomitancia con el incremento en la captación de glucosa, durante la FA de la infección hay un aumento en la expresión de CD98 (Fig. 1D).



**Figura 1. Las células T CD4 de animales infectados evidencian una incrementada captación de glucosa y durante la FA tienen mayor expresión de CD98.**

Células T CD4 de bazo de ratones BALB/c NI e infectados en FA y FC se purificaron como se describe en la sección de materiales y métodos (A). La captación de glucosa se determinó por citometría de flujo, mediante la incorporación del análogo de glucosa 2-NBDG en células T CD4 provenientes de los tres grupos experimentales que fueron cultivadas durante 24 h en ausencia o presencia de estímulo policlonal  $\alpha$ CD3 and  $\alpha$ CD28 (B). La expresión de GLUT1 se determinó de un lisado total de células T CD4 purificadas de bazo de ratones NI e infectados de FA y FC, por ensayos de Western blot. Se empleó la línea celular HEK293T como control positivo de la expresión de GLUT1. Como control de carga se utilizó la expresión de  $\beta$ -Actina (C). Por citometría de flujo se determinó la IFM de la molécula CD98 en la población de linfocitos T CD4. Se calculó la tasa de cambio en la IFM de CD98 de células de animales infectados con respecto a los NI (D). Los datos son representativos de tres experimentos independientes (n = 3/4 ratones por grupo). \* p <0.05, \*\* p <0.01, \*\*\* p <0.001, \*\*\*\* p <0.0001 por ANOVA de dos vías. Se realizó el análisis de Tukey para comparaciones múltiples. Las barras de error representan la media  $\pm$  DS.

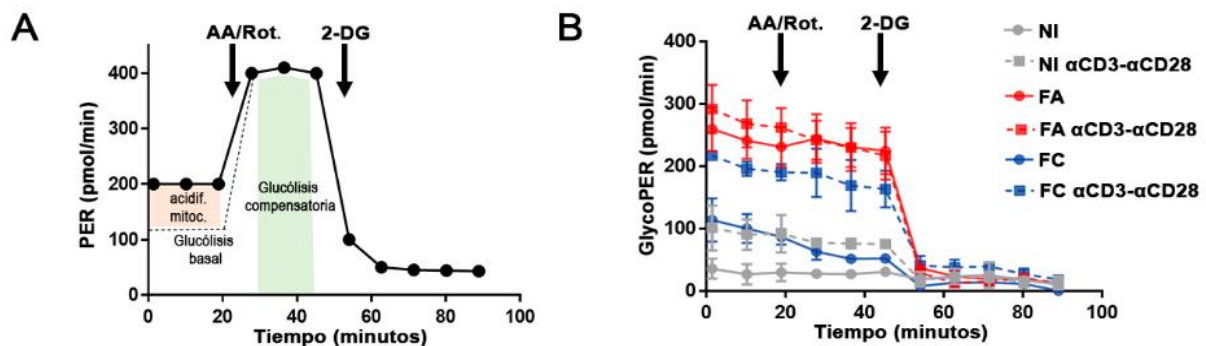
## 1.2 Evaluación de la tasa de glucólisis de células T CD4

Posteriormente, con el objetivo de explorar en profundidad si las células T CD4 incurren en una reprogramación metabólica durante la infección por *T. cruzi*, analizamos el flujo metabólico extracelular mediante un ensayo de tasa de glucólisis (Fig. 2A). Como se mencionó anteriormente, la conversión de glucosa en piruvato, y posteriormente lactato, resulta en una producción neta y extrusión de protones en el medio extracelular que da como resultado la acidificación del medio. El fundamento del ensayo de flujo extracelular se basa en evaluar la acidificación del medio extracelular (ECAR) a medida que se interfiere con la glucólisis a través del agregado de distintos compuestos evaluando los efectos resultantes. Para ello, utilizamos glucosa para propagar la glucólisis en células hambreadas y 2-desoxiglucosa (2-DG), que se convierte en 2-desoxiglucosa-6-fosfato, un inhibidor competitivo de la fosfo-glucosomerasa, por la hexoquinasa, para bloquear la glucólisis. Antimicina A (AA, un inhibidor específico del complejo III de la ETC), Rotenona (Rot, un inhibidor específico del complejo I de la ETC), y el agente desacoplante cianuro de carbonilo-4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP), se utilizaron para intervenir en eventos específicos relacionados con el transporte de electrones, gradiente de protones y síntesis de ATP.

La prueba de estrés de glucólisis comienza con una medición de línea de base de la ECAR de células previamente hambreadas. Dado que estas células se encuentran en su mínimo basal y, por lo tanto, pueden considerarse prácticamente no glucolíticas, la ECAR medida en este punto se denomina acidificación no glucolítica. Esta acidificación probablemente corresponda al CO<sub>2</sub> respiratorio generado en el ciclo de TCA convertido a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y H<sup>+</sup>. A esto le sigue la inyección de glucosa para activar la glucólisis, que se presenta como un aumento de ECAR debido a la formación de lactato. Este aumento representa la tasa normal de glucólisis. Las células luego se desafían con una inyección

de AA/Rot, que inhiben complejos de la ETC. Las células responden a esta dramática disminución en la producción de ATP activando la glucólisis a su nivel máximo, y eso da como resultado un aumento secundario en el nivel de ECAR que se denomina reserva glucolítica o glucólisis compensatoria. La prueba finaliza mediante la inhibición total de la glucólisis utilizando el análogo de glucosa 2-DG, que devuelve el ECAR a su nivel no glucolítico (Fig. 2A).

Se realizó el ensayo utilizando células T CD4 provenientes de ratones NI y ratones infectados de FA y de FC en ausencia de estímulo o en presencia de anti-CD3 anti-CD28 acoplados a perlas. El agregado de estímulo posibilitó la comparación de células T CD4 de ratones NI activadas (NI  $\alpha$ CD3  $\alpha$ CD28) con aquellas activadas por la infección (FA y FC). Asimismo, nos permite evidenciar dentro de los grupos de infectados (FA  $\alpha$ CD3  $\alpha$ CD28 y FC  $\alpha$ CD3  $\alpha$ CD28), cambios en la glucólisis frente a este estímulo policlonal. Como resultado, encontramos que las células T CD4 provenientes de animales de FA, mostraban un metabolismo glucolítico exacerbado en comparación con células de ratones NI o infectados en FC (Fig. 2B). Tanto la tasa de glucólisis basal como la glucólisis compensatoria medida al inhibir completamente la OXPHOS con AA/Rot se encontraron significativamente aumentadas durante la FA con respecto a los grupos de ratones NI e infectados en FC (Fig. 2C). Sin embargo, la tasa de glucólisis posterior a la estimulación policlonal no se incrementó en las células provenientes de dicho grupo experimental en comparación con los linfocitos T CD4 de los grupos de ratones NI y FC que mostraron un aumento (Fig. 2C). Este último resultado podría sugerir que la frecuencia de células T CD4 predominantes durante la FA sean células activadas por la infección, y que su metabolismo glucolítico se encuentra en niveles máximos, en términos de actividades enzimáticas de la vía involucrada.





**Figura 2. Durante la FA de la infección, las células T CD4 presentan un metabolismo glucolítico exacerbado.**

La tasa de eflujo de protones (PER, de sus siglas en inglés) tanto basal, como luego del agregado de AA/Rot y 2-DG (A), se determinó *ex vivo* en células T CD4 de ratones BALB/c NI e infectados de FA y FC, en ausencia y presencia de estímulo policlonal. El descuento de la acidificación mitocondrial de los valores de PER, resulta en la tasa glucolítica de eflujo de protones (glycoPER) (B). Los niveles de glucólisis basal y compensatoria fueron calculados en los tres grupos experimentales de animales (C). Se procesaron al menos cuatro replicados de cada condición, se analizó con el software Wave de Agilent Seahorse. Los datos son representativos de tres experimentos independientes (n = 3/4 ratones por grupo). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001 por ANOVA de una y dos vías. Se realizó el análisis de Tukey para comparaciones múltiples. Las barras de error representan la media ± DS.

### 1.3 Evaluación de la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial en células T CD4

Complementariamente, se determinó la respiración mitocondrial mediante un ensayo de estrés mitocondrial (Fig. 3A). Este ensayo es ampliamente usado para medir la función mitocondrial, ya que permite obtener información de parámetros claves como la respiración basal, la respiración ligada a la síntesis de ATP y la capacidad respiratoria de reserva (del inglés, SRC). La medida de SRC se usa a menudo para evaluar la capacidad de las células para enfrentar un desafío energético a medida que las células pasan por la activación, diferenciación y/o proliferación, y se ha implicado en la determinación del destino celular<sup>14</sup>.

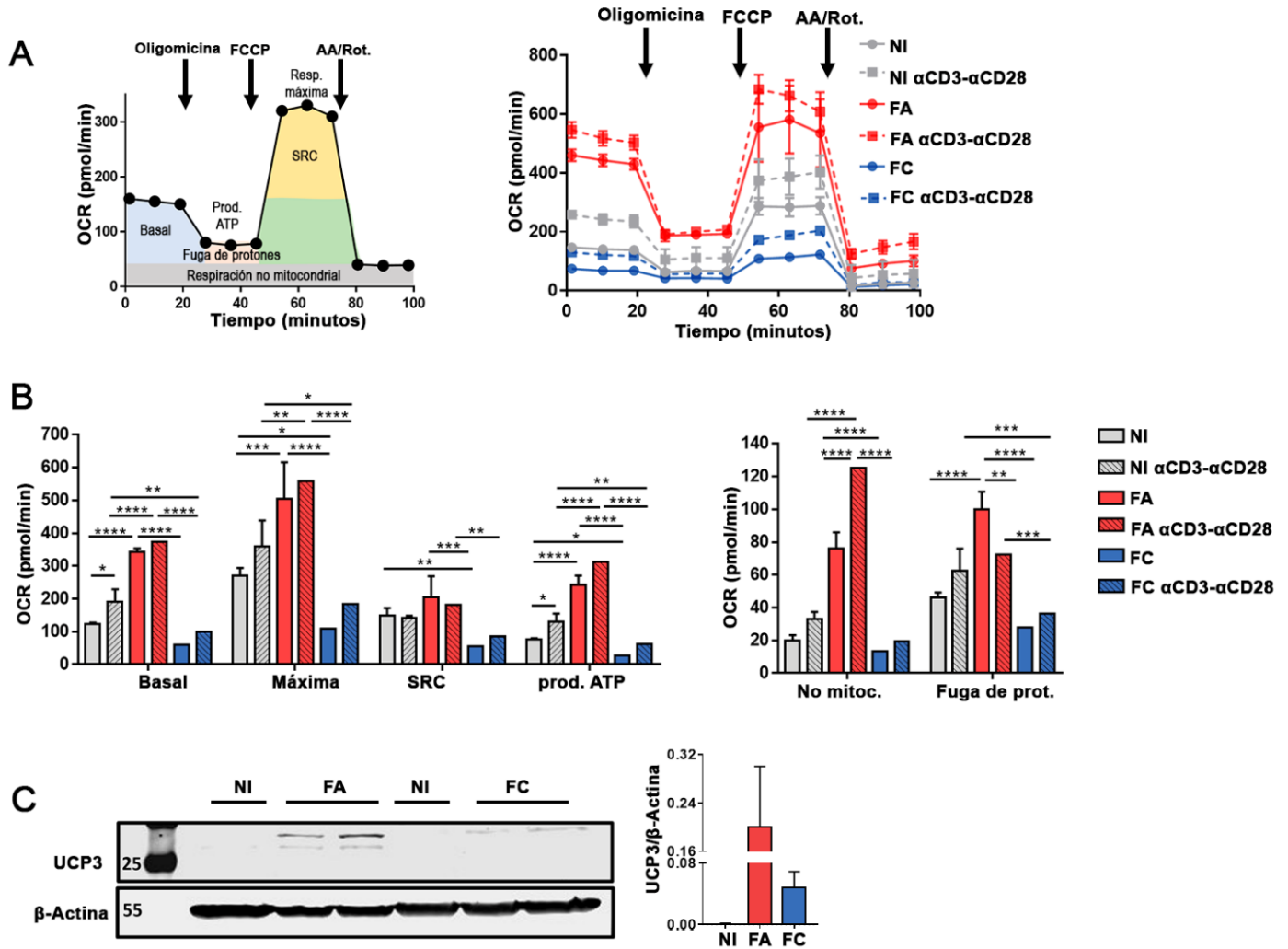
La prueba de estrés mitocondrial (Figura 3A) comienza con la medición basal de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) en células que no fueron previamente hambreadas. Ésta es seguida por la inyección de oligomicina, que inhibe el retorno de protones a través del complejo F0/F1 y, por lo tanto, hiperpolariza rápidamente la membrana mitocondrial. La hiperpolarización evita un mayor bombeo de protones a través de los complejos respiratorios y la frecuencia respiratoria disminuye. La respiración restante se llama fuga de protones, que representa el flujo de protones a través de lípidos u otros canales. Este estado hiperpolarizado se invierte rápidamente mediante la adición del



agente desacoplante FCCP, que actúa como un ionóforo de protones. En respuesta, las células intentan recuperar el potencial de membrana en un intento inútil de aumentar la tasa de transporte de electrones a su máximo, y esto a su vez aumenta el OCR. Finalmente, con la adición de dos inhibidores de la ETC, AA/Rot, la respiración mitocondrial se detiene por completo y la OCR disminuye a su nivel más bajo. En este nivel, el consumo de oxígeno no se debe a la actividad mitocondrial (respiración no mitocondrial). La diferencia en el OCR generado por estos inhibidores se denominan respiración mitocondrial máxima, que es la suma de la respiración basal y la capacidad de reserva<sup>113,114</sup>.

Cuando se determinaron los perfiles del consumo de oxígeno (O<sub>2</sub>) en las células T CD4 provenientes de ratones NI e infectados en FA y FC, encontramos un incremento en los niveles de respiración basal, máxima y vinculada a la síntesis de ATP, además de evidenciarse un aumento en la SRC en las células de FA comparado con las células T CD4 de animales pertenecientes a los grupos NI y de FC (Fig. 3B). Sin embargo, dichos parámetros no se modificaron significativamente posterior a una estimulación policlonal (Fig. 3B), de forma similar a lo que ocurre con el perfil glucolítico para el grupo experimental de FA.

Por otra parte, las células T CD4 de animales infectados en FA revelaron un incremento significativo en la respiración no mitocondrial y en la fuga de protones (Fig. 3B). En relación a esto, se ha reportado que la fuga de protones es mediada por proteínas desacoplantes (UCPs del inglés), que son canales que permiten el paso de protones desde el espacio intermembrana hacia la matriz mitocondrial<sup>115</sup>. Se ha demostrado que la expresión de las isoformas 2 y 3 de las proteínas desacoplantes (UCP2 y UCP3) es inducida *in situ* por especies reactivas del oxígeno mitocondriales (ROS<sub>m</sub>) (Fig. In10), y que su actividad es controlada mediante la glutationilación<sup>46,50</sup> (Fig. In11). Sin embargo, la actividad de las UCP puede verse inhibida por altas concentraciones de ROS. Es por esta razón que los autores sostienen que ROS es responsable del incremento en el consumo de oxígeno mediados por UCP2 y UCP3<sup>50</sup>. En concordancia, registramos un incremento en la expresión de UCP3 en células T CD4 durante la FA de la infección, en contraste con las células de ratones NI e infectados en FC (Fig. 3C).



**Figura 3. Durante la FA de la infección, las células T CD4 presentan un metabolismo altamente oxidativo.**

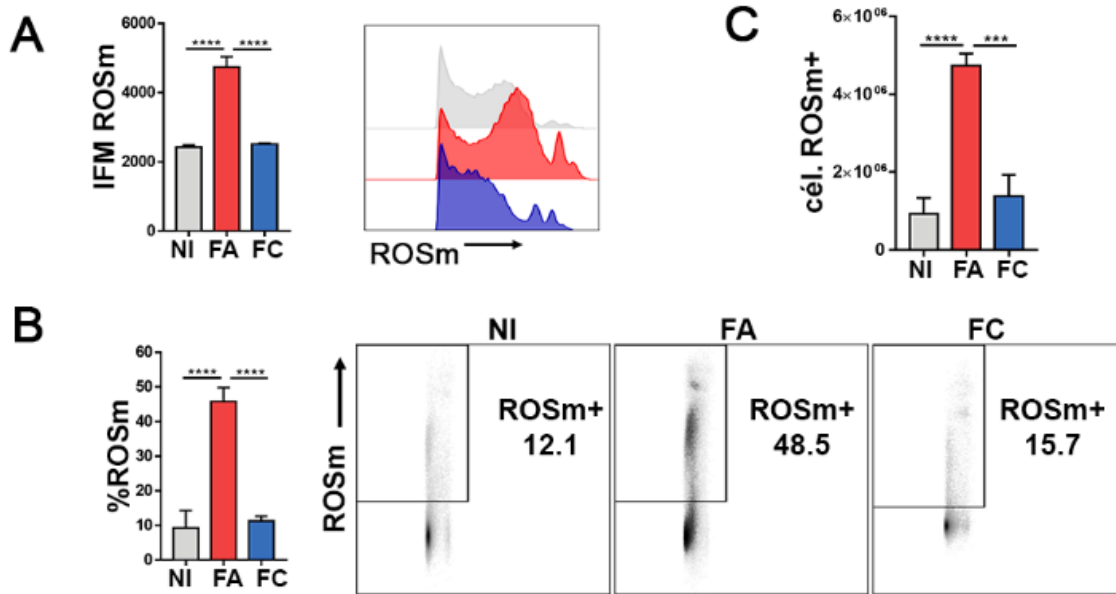
El ensayo de estrés mitocondrial se obtuvo durante el análisis de flujo extracelular. El consumo de oxígeno (OCR, de sus siglas en inglés) se midió *ex vivo*, tanto basalmente como luego del agregado de Oligomicina, FCCP y AA/Rot, en células T CD4 purificadas de bazo de ratones BALB/c NI, e infectados en FA y FC tanto en presencia como ausencia de estímulo policlonal (A). Los valores de respiración máxima, SRC, respiración no mitocondrial (No mitoc.), consumo de O<sub>2</sub> vinculado a la producción de ATP (Prod. ATP) y el consumo de O<sub>2</sub> producto de la fuga de protones (Fuga de prot.), fueron calculados en todos los grupos experimentales (B). La expresión de UCP3 fue evaluada mediante ensayos de Western blot en lisado total de células T CD4 purificadas de bazo de ratones BALB/c NI, e infectados en FA y FC. Para la cuantificación, la expresión de UCP3 se relativizó a la expresión del control de carga β-Actina. Se muestra una membrana representativa y su respectiva cuantificación (C). Se procesaron al menos cuatro replicados de cada condición, se analizó con el software Wave de Agilent Seahorse. Los datos son representativos de tres experimentos independientes (n = 3/4 ratones por grupo). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001 por ANOVA de una vía. Se realizó el análisis de Tukey para comparaciones múltiples. Las barras de error representan la media ± DS.

2. Durante la FA de la infección por *T. cruzi* se evidencia una acumulación de mitocondrias disfuncionales en células T CD4.

### **2.1 Determinación de especies reactivas del oxígeno mitocondriales (ROSm)**

Como se mencionó anteriormente, se estima que un incremento en la expresión de UCP sería un mecanismo compensatorio para reducir la producción de especies reactivas del oxígeno<sup>116</sup>. Los resultados obtenidos en la sección anterior nos permitieron hipotetizar que podría ser la producción de ROSm una de las fuentes de consumo de oxígeno no mitocondrial, que llevaría a un incremento en la expresión de UCP3 y consecuentemente a la fuga de protones evidenciada en los ensayos de estrés mitocondrial. Es por ello que decidimos evaluar los niveles de ROSm en las células T CD4 durante las diferentes etapas de la infección. Para ello, aislamos esplenocitos o células T CD4 purificadas de bazos de animales NI, o infectados por *T. cruzi* durante FA y FC. Dichas células fueron marcadas con la sonda MitoSOX, que es susceptible de oxidarse, y cuya forma oxidada emite fluorescencia en un rango definido de longitudes de onda. La sonda Mitosox es específica para detectar superóxido mitocondrial, ya que posee un catión lipofílico como lo es el trifenilfosfonio, que le da cierto tropismo por esta organela. Ello permitió detectar por citometría de flujo, aquellas células productoras de superóxido mitocondrial, lo que dio lugar a la cuantificación tanto de intensidad de fluorescencia media (IFM) de ROSm, así como la determinación de la frecuencia de células productoras de ROSm.

Observamos que durante la FA de la infección hay un incremento en los niveles de ROSm en células T CD4 (Fig. 4A), así como también es mayor la frecuencia, tanto relativa (Fig. 4B) como absoluta (Fig. 4C), de células T CD4 de bazo que producen ROSm. Sin embargo, los niveles de ROSm y la frecuencia de células productoras de ROSm de la FC mostraron magnitudes similares a las de los animales NI (Fig. 4A, 4B y 4C).



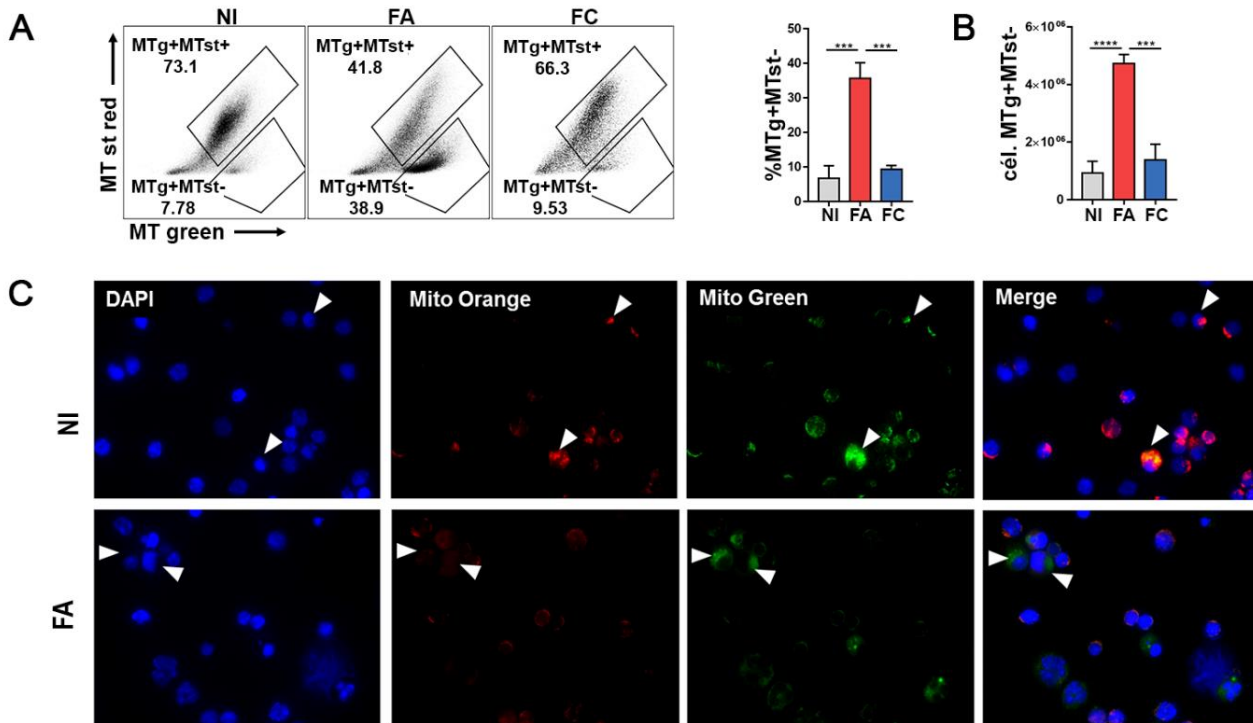
**Figura 4. Durante la FA de la infección se evidenció un incremento en la producción de ROSm.**

Se determinó por citometría de flujo, la expresión de ROSm en células T CD4 de bazo de animales NI, o infectados en FA y FC. El gráfico de barras representa la IFM de ROSm y se encuentra su histograma representativo para cada grupo de animales (A). Adicionalmente se cuantificó el porcentaje (B) y la frecuencia absoluta (C) de células T CD4 productoras de ROSm provenientes de bazo de los 3 grupos experimentales que producen ROSm. Se muestra un gráfico de puntos representativo para cada grupo de animales que indica el porcentaje de células T CD4 productoras de ROSm (B). Los datos son representativos de cuatro experimentos independientes ( $n = 3/4$  ratones por grupo). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  por ANOVA de una vía. Se realizó el análisis de Tukey para comparaciones múltiples. Las barras de error representan la media  $\pm$  DS.

## 2.2 Evaluación de parámetros mitocondriales.

Como se mencionó anteriormente, un incremento en el potencial de membrana mitocondrial (PMM) resulta en una acelerada producción de superóxido mitocondrial por parte de la ETC<sup>39,116,117</sup>. La producción de ROSm es altamente dependiente de la fuerza protón-motriz, y una disminución en la diferencia de potencial de membrana mitocondrial podría reducir dicha hiperpolarización que genera más especies reactivas al ser el  $O_2$ , un posible aceptor de electrones<sup>115</sup> (Fig. In7). En consecuencia, y teniendo en cuenta que el PMM es un importante regulador de la producción de ROSm, evaluamos parámetros mitocondriales de células T CD4 provenientes de bazo de animales NI e infectados durante la FA y FC de la infección. Para llevar esto a cabo, combinamos sondas dependientes del potencial de membrana (MT status red o MT orange) y una sonda independiente del potencial de membrana mitocondrial (MT green). La fluorescencia correspondiente a esta última sonda puede correlacionarse a la masa mitocondrial. A partir del análisis de citometría de flujo,

definimos la población de linfocitos T CD4 con mitocondrias normales que mostraron marcación para ambas sondas, es decir, MT green+ MT status red+ (MTg<sup>+</sup>MTst<sup>+</sup>) y la población de linfocitos T CD4 con mitocondrias depolarizadas o dañadas marcadas solo con la sonda independiente del potencial, es decir MT green+ MT status red- (MTg<sup>+</sup>MTst<sup>-</sup>) (Fig. 5A). Durante la FA de la infección, se observó incrementada la frecuencia relativa (Fig. 5A) y absoluta (Fig. 5B) de células T CD4 con mitocondria depolarizada o dañada respecto a los niveles de esta población celular observada en animales NI. Asimismo, durante la FC la frecuencia de linfocitos T CD4 con mitocondrias depolarizadas fue similar a lo encontrado en bazo de animales NI (Fig. 5A y 5B). Adicionalmente, la prevalencia de cada población definida previamente se corroboró por microscopía de epifluorescencia en células T CD4 de ratones NI como infectados en FA, encontrando resultados concordantes con los obtenidos por citometría de flujo (Fig. 5C).



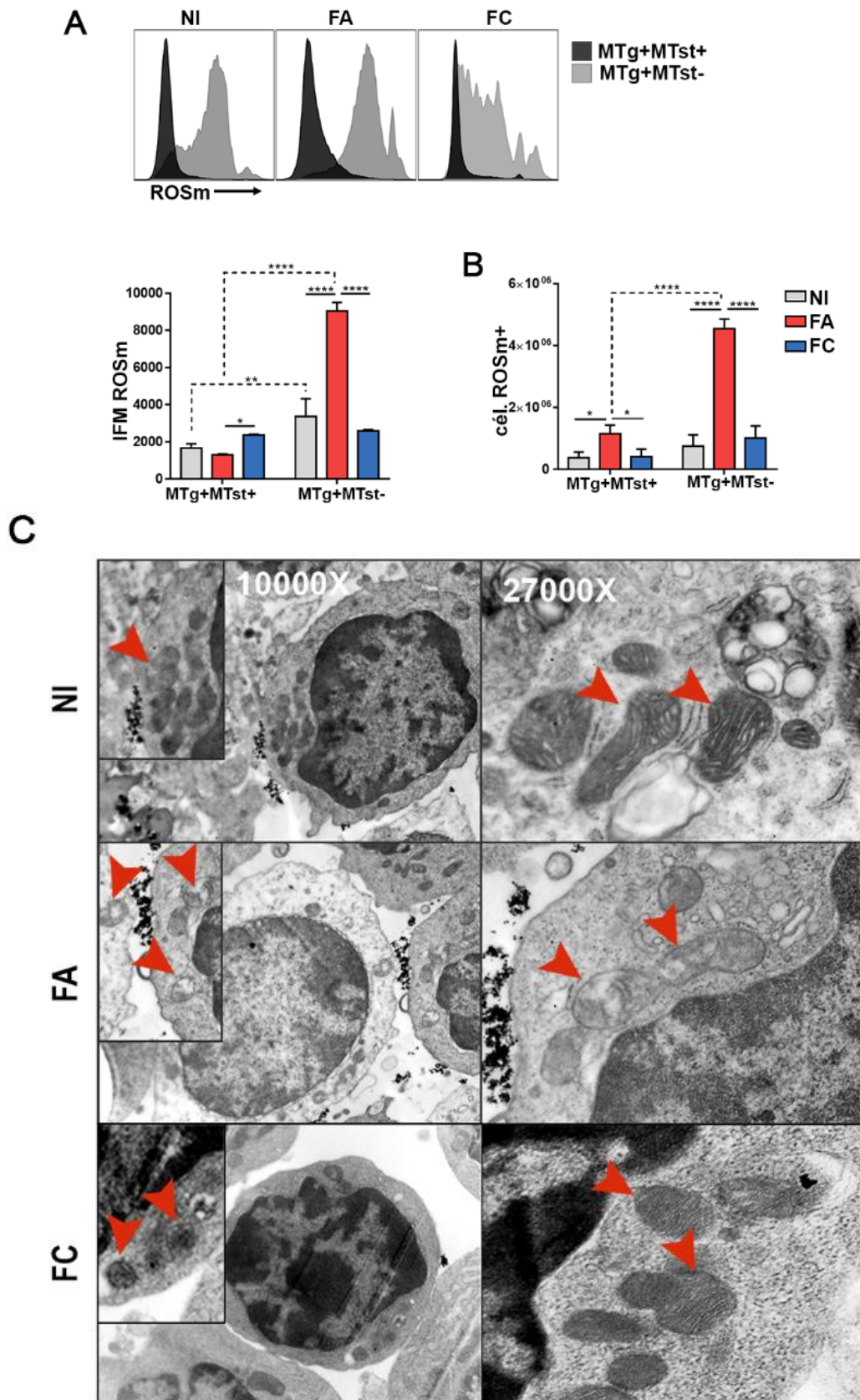
**Figura 5. Durante la FA de la infección se encuentra incrementada la frecuencia de linfocitos T CD4 con depolarización mitocondrial.**

Células T CD4 de bazo de ratones BALB/c NI e infectados en FA y FC se purificaron y se marcaron con una sonda dependiente (MT st red) en conjunto con una sonda independiente del potencial de membrana mitocondrial (MT green). Se analizó por citometría de flujo y se definieron dos poblaciones celulares dentro de las células T CD4: la población doble positiva para dichas sondas (MTg<sup>+</sup>MTst<sup>+</sup>) que corresponden a células con mitocondrias normales o polarizadas, y la población simple positiva (MTg<sup>+</sup>MTst<sup>-</sup>) que denota una población celular con mitocondrias depolarizadas o dañadas. Se muestran gráficos de puntos representativos para cada grupo de animales en donde se denotan las dos poblaciones mencionadas (A). Los gráficos de barras muestran la frecuencia relativa (A) y absoluta (B) de la población con mitocondria depolarizada dentro de las

células T CD4 para cada grupo de animales (A). Se realizó un “cyto spin” de células T CD4 purificadas de bazo de animales NI e infectados en FA. Las células se marcaron con las sondas MT green (independiente de potencial) y Mito Orange (dependiente del potencial) y los núcleos se tiñeron con DAPI. Luego se analizaron por microscopía de epifluorescencia. Se muestra una imagen representativa para cada grupo de animales (C). Los datos son representativos de tres experimentos independientes (n = 3/4 ratones por grupo). \* p <0.05, \*\* p <0.01, \*\*\* p <0.001, \*\*\*\* p <0.0001 por ANOVA de una vía. Se realizó el análisis de Tukey para comparaciones múltiples. Las barras de error representan la media ± DS.

Como se ha mencionado anteriormente, durante la activación de las células T se induce la producción de ROSm. Sin embargo, se ha demostrado que niveles sostenidos de ROSm son perjudiciales para la función mitocondrial<sup>106</sup> (Fig. In14). Por lo tanto, verificamos la producción de ROSm tanto en la población de células con mitocondrias polarizadas (MTg<sup>+</sup>MTst<sup>+</sup>) como con mitocondrias dañadas (MTg<sup>+</sup>MTst<sup>-</sup>).

Observamos que los linfocitos T CD4 con mitocondria depolarizada provenientes de animales NI o infectados en FA y FC, exhibieron una expresión incrementada de ROSm, en comparación con linfocitos T CD4 con PMM normal. Sin embargo, esta expresión es mayor en linfocitos T CD4 con depolarización mitocondrial proveniente de ratones infectados en la FA (Fig. 6A). Además, encontramos una mayor frecuencia de linfocitos T CD4 con mitocondria depolarizada productoras de ROSm durante la FA de la infección con respecto a ratones NI e infectados en FC (Fig. 6B). A continuación, examinamos cualitativamente la estructura mitocondrial por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). Pudimos observar en las células T CD4 de ratones NI e infectados en FC, mitocondrias con numerosas crestas pleomórficas estrechas (que aparecen en la imagen de MET como pequeñas áreas transparentes a los electrones) en un espacio contiguo de matriz electrodensa. A diferencia de células T CD4 de ratones infectados en FA, las cuales presentan mitocondrias con trastorno morfológico caracterizado por una pérdida local de crestas y regiones asimétricas de baja electrodensidad compatible con hinchazón mitocondrial (Fig. 6C)<sup>118,119</sup>.



**Figura 6. Las células productoras de ROSm evidencian depolarización mitocondrial y hay una mayor frecuencia de dicha población durante la FA de la infección por *T. cruzi*.**

Células T CD4 de bazo de ratones BALB/c NI e infectados en FA y FC se purificaron y se marcaron con las sondas dependiente (MT status red) e independiente del potencial de membrana mitocondrial (MT green) en conjunto con MitoSOX. Se determinó por citometría de flujo la expresión de ROSm dentro de las poblaciones definidas previamente como MTg<sup>+</sup>MTst<sup>+</sup> (células con mitocondrias normales) y MTg<sup>+</sup>MTst<sup>-</sup> (células con mitocondrias depolarizadas). Se muestra un histograma representativo para cada grupo de animales y en el gráfico de barras se exhibe la IMF para ROSm dentro de las poblaciones mencionadas (A). Frecuencia de células productoras de ROSm con mitocondrias normales o dañadas (B). Se purificaron células T CD4 de animales NI e infectados en FA y FC, y se analizó cualitativamente por MET la estructura mitocondrial. Se muestran imágenes representativas para cada grupo de animales (C). Los datos cuantificados son representativos de tres experimentos independientes (n = 3/4 ratones por grupo). \* p <0.05, \*\* p <0.01, \*\*\* p <0.001, \*\*\*\* p <0.0001 por ANOVA de dos vías. Se realizó el análisis de Tukey para comparaciones múltiples. Las barras de error representan la media ± DS.

### **2.3 Cinética de ROSm y parámetros mitocondriales a tiempos tempranos de la infección.**

Se ha demostrado que la producción de superóxido mitocondrial involucra un incremento en el PMM por la ETC<sup>39,117,120</sup> (Fig. In7).

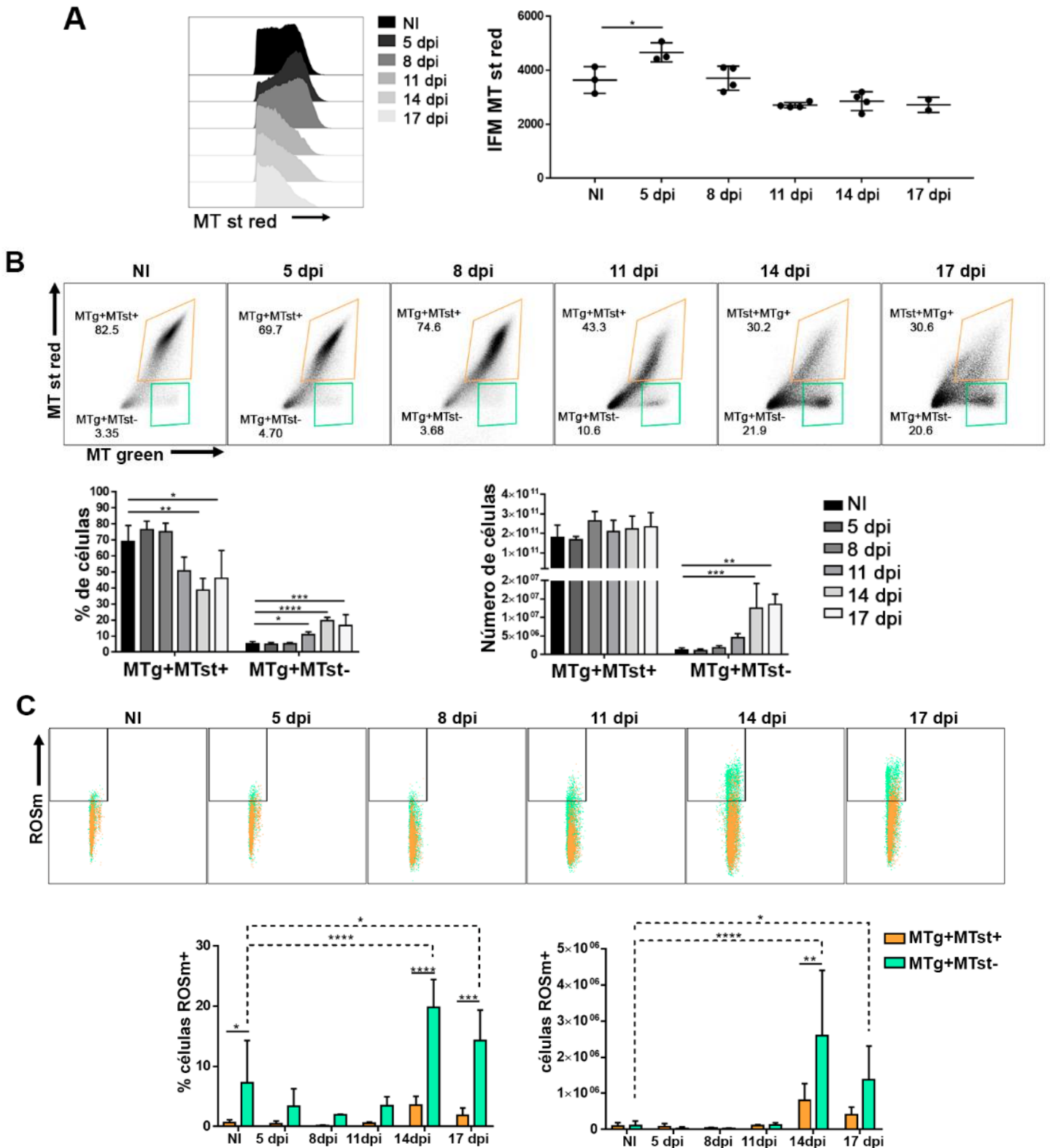
Nuestros resultados evidenciaron elevados niveles de superóxido mitocondrial en células T CD4 durante la FA de la infección coincidente con una disminución en el potencial de membrana mitocondrial (Fig. 6A). Por ello, realizamos experimentos a tiempos tempranos posteriores a la infección para evaluar los niveles de ROSm y el PMM.

Por citometría de flujo, se determinó la IFM de la sonda dependiente de potencial (MT status red), cuya acumulación dentro de la mitocondria depende de la diferencia de potencial que haya en la membrana de dicha organela. De este modo, se puede correlacionar la cantidad de colorante catiónico (sonda dependiente del potencial) que ingresa a las mitocondrias, con la diferencia de potencial que la misma presenta. Una mayor acumulación del colorante y por ello una incrementada IFM indica un aumento en la diferencia del potencial entre el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial (hiperpolarización de la membrana mitocondrial)<sup>121</sup>. Mediante estos ensayos se pudo evidenciar una hiperpolarización de la membrana mitocondrial a tiempos muy tempranos posteriores a la infección (5 d.p.i.) (Fig. 7A) que precede a la producción de ROSm y a la depolarización mitocondrial (Fig. 7B). Más aún, observamos la acumulación de ROSm progresiva en células con mitocondrias depolarizadas que se evidencia hacia la FA de la infección (Fig. 7C).

De este modo, podemos concluir que la activación de células T CD4 durante la infección por *T. cruzi* conduciría a una hiperpolarización a tiempos tempranos, y consecuentemente a un incremento en la producción de ROSm. Además, la acumulación de ROSm induciría la fuga de protones mediada



por UCPs conduciendo a una disminución en la diferencia del PMM y a la disminución en la producción de superóxido, en un círculo de retroalimentación como se ha reportado previamente<sup>35</sup>.



**Figura 7. La depolarización mitocondrial evidenciada durante la FA en células T CD4, es precedida por una hiperpolarización a tiempos iniciales de la infección.**

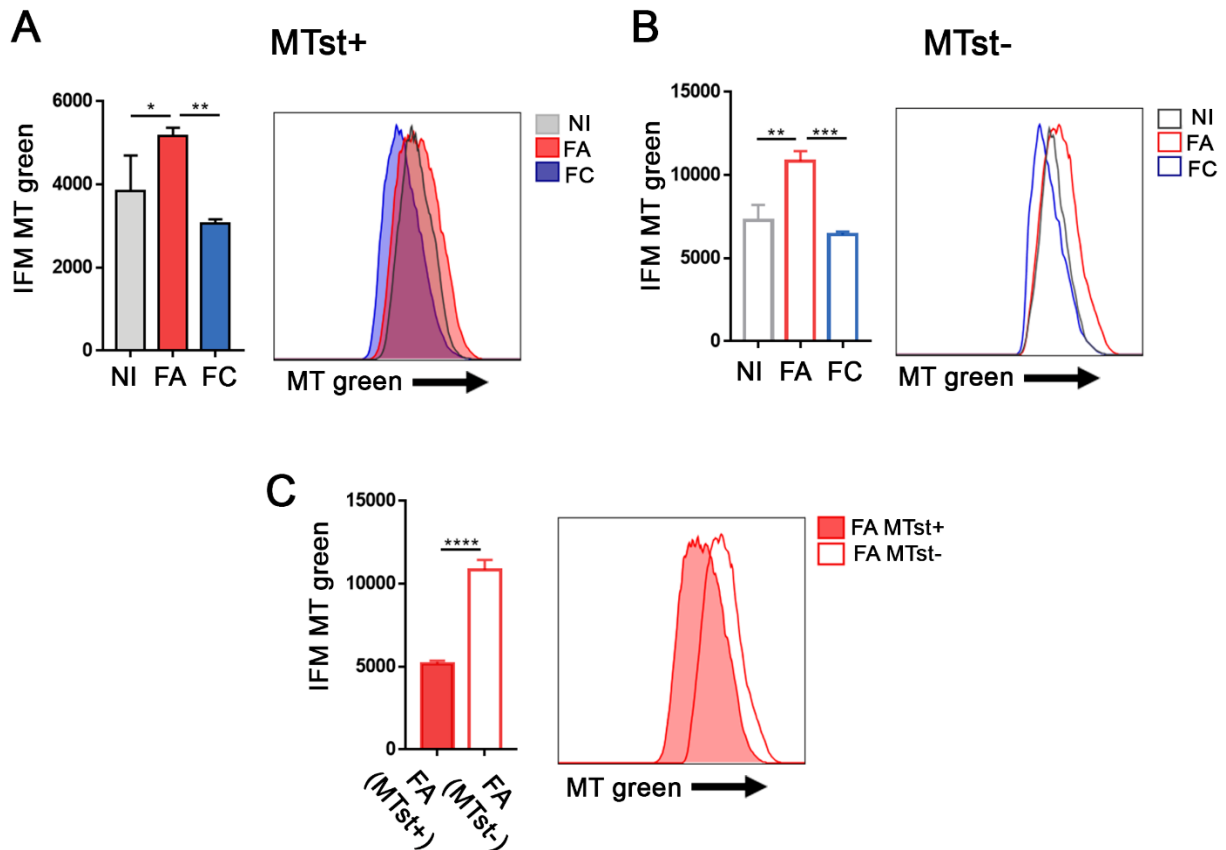
Células T CD4 de bazo de ratones BALB/c NI e infectados a distintos tiempos pos infección se purificaron y se marcaron con las sondas dependientes (MT status red) e independiente del potencial de membrana mitocondrial (MT green) en conjunto con MitoSOX y se analizaron por citometría de flujo. Se estimó el potencial de membrana mitocondrial a través de la medición de la IFM de la sonda Mito status red. Se muestran histogramas representativos para cada grupo de animales y la IFM correspondiente (A). Se analizaron las poblaciones celulares con mitocondrias normales (MTg<sup>+</sup>MTst<sup>+</sup>) y depolarizadas (MTg<sup>+</sup>MTst<sup>-</sup>) en células T CD4 a distintos tiempos pos infección empleando como controles, ratones NI. Se muestra un gráfico de puntos representativo para cada grupo de animales. Los gráficos de barras indican la frecuencia relativa y absoluta de las poblaciones celulares con mitocondria normal y depolarizada (B). Se determinó la frecuencia de células productoras de ROSm en cada población definida por los parámetros mitocondriales: MTg<sup>+</sup>MTst<sup>+</sup> (células con mitocondrias normales en color naranja) y MTg<sup>+</sup>MTst<sup>-</sup> (células con mitocondrias depolarizadas en color verde). Se muestra un gráfico de puntos representativo para cada grupo de animales. Los gráficos de barras exhiben la frecuencia relativa y absoluta de células productoras de ROSm dentro de cada población definida a través de los parámetros mitocondriales (C). \*p <0.05, \*\* p <0.01, \*\*\* p <0.001, \*\*\*\* p <0.0001 por ANOVA de una y dos vías (n = 3/4 ratones por grupo). Se realizó el análisis de Tukey para comparaciones múltiples. Las barras de error representan la media ± DS.

**2.4 Determinación de masa mitocondrial en poblaciones de células con mitocondria normal y dañada.**

Una estrategia ampliamente usada para determinar la masa mitocondrial promedio en una población celular, es la cuantificación de la IFM del colorante mitocondrial independiente del potencial (MT green) ya que, en condiciones estandarizadas y controladas de tiempo y temperatura, su concentración dentro de la mitocondria varía linealmente con la variación de su masa. Es un método de semicuantificación que permite inferir sobre la cantidad de mitocondrias en relación a la IFM que se detecte<sup>122</sup>.

A continuación, estimamos la masa mitocondrial a través de la cuantificación de IFM de MT green en células T CD4 con mitocondrias normales (MTg<sup>+</sup>MTst<sup>+</sup>) o depolarizadas (MTg<sup>+</sup>MTst<sup>-</sup>) tanto de ratones NI como infectados en FA y FC. Los linfocitos T CD4 con mitocondria normal de animales de FC no presentan diferencia en la masa mitocondrial con respecto al grupo de NI, a diferencia de las células T CD4 de animales infectados en FA que evidencian un incremento significativo (Fig. 8A). Cuando evaluamos las células T CD4 con mitocondrias depolarizadas, verificamos un efecto similar al anterior, siendo mayor la masa mitocondrial en células de ratones infectados en FA (Fig. 8B). Sin embargo, cuando comparamos las IFM de MT green de células T CD4 de FA con mitocondria normal en contraste con aquellas con depolarización mitocondrial, estas últimas presentan una mayor masa mitocondrial (Fig. 8C). Estos resultados, nos permiten inferir que probablemente haya un incremento en la demanda metabólica en las células T CD4 de la FA y por ello las células con

mitocondrias normales presentan una mayor masa mitocondrial. Por otra parte, estos datos también sugerirían que en las células T CD4 durante la FA de la infección, las mitocondrias con pérdida de potencial de membrana no son eliminadas y se acumulan en el citoplasma de estas células.



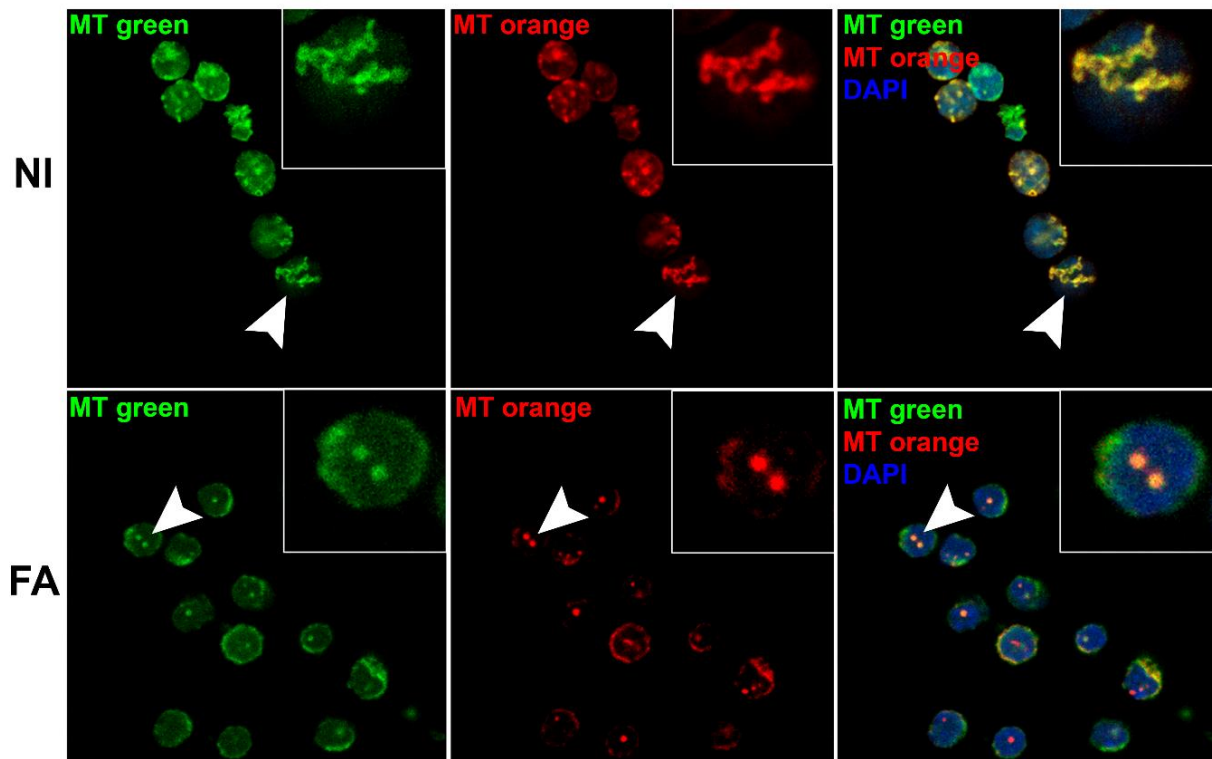
**Figura 8. Las células T CD4 acumulan mitocondrias depolarizadas durante la FA de la infección.**

Se evaluó la masa mitocondrial por citometría de flujo en células T CD4 de los tres grupos experimentales de ratones: NI, infectados en FA y FC mediante el empleo de la sonda MT green (independiente del potencial). Se cuantificó la IFM de MT green tanto en la población de células T CD4 con mitocondria normal (MTst<sup>+</sup>) (A) como en aquellas células con mitocondria depolarizada (MTst<sup>-</sup>) (B) Se compararon las IFM de MT green entre células T CD4 con mitocondria normal (FA MTst<sup>+</sup>) y células con depolarización mitocondrial (FA MTst<sup>-</sup>) dentro del grupo de animales de FA de la infección (C). Se muestra para cada determinación, la cuantificación correspondiente y los histogramas representativos para cada grupo de animales. \*p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001 por ANOVA de una vía (n = 3/4 ratones por grupo). Se realizó el análisis de Tukey para comparaciones múltiples. Las barras de error representan la media ± DS.

3. La acumulación de mitocondrias disfuncionales podría deberse a alteraciones en la dinámica mitocondrial y a un defecto en el flujo mitofágico.

### 3.1 Evaluación de la expresión de moléculas involucradas en la fusión mitocondrial

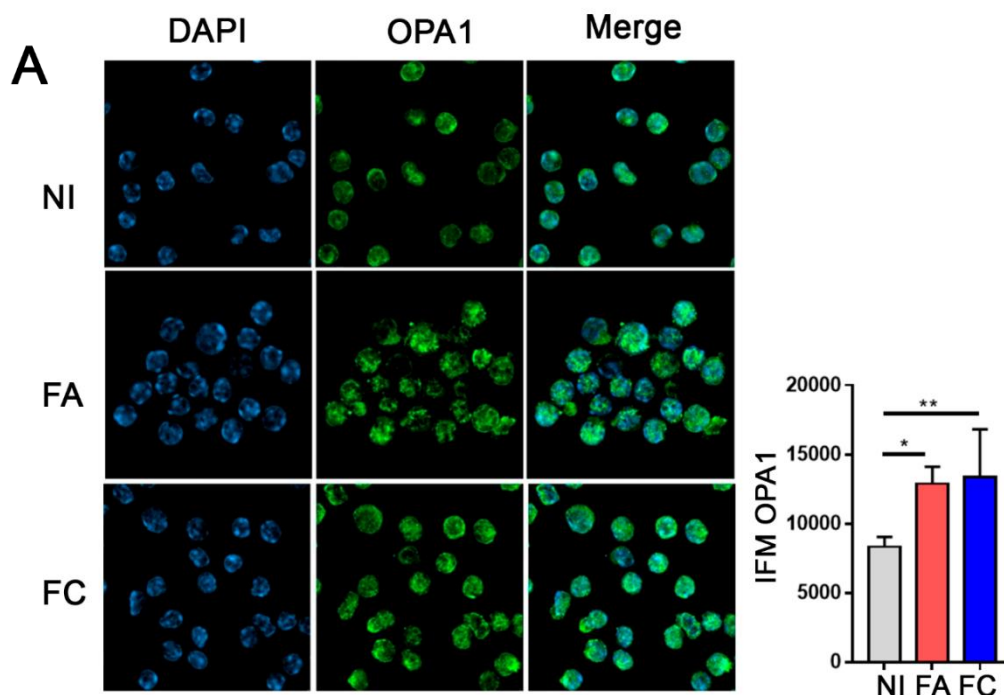
La continua división y fusión de las mitocondrias, eventos conocidos como dinámica mitocondrial, es parte integral de su control de calidad y adaptación a cambios metabólicos. La morfología y la dinámica mitocondrial varían mucho entre tipos de células para satisfacer las demandas celulares. Realizamos una microscopía confocal de células T CD4 de animales NI e infectados en FA para visualizar la morfología mitocondrial utilizando las sondas previamente mencionadas. Observamos evidentes diferencias entre las mitocondrias en células de ratones NI que presentan mitocondrias alargadas o fusionadas, con respecto a las mitocondrias en los linfocitos T CD4 de FA las cuales aparentan una disposición donde es posible individualizarlas (Fig. 9).

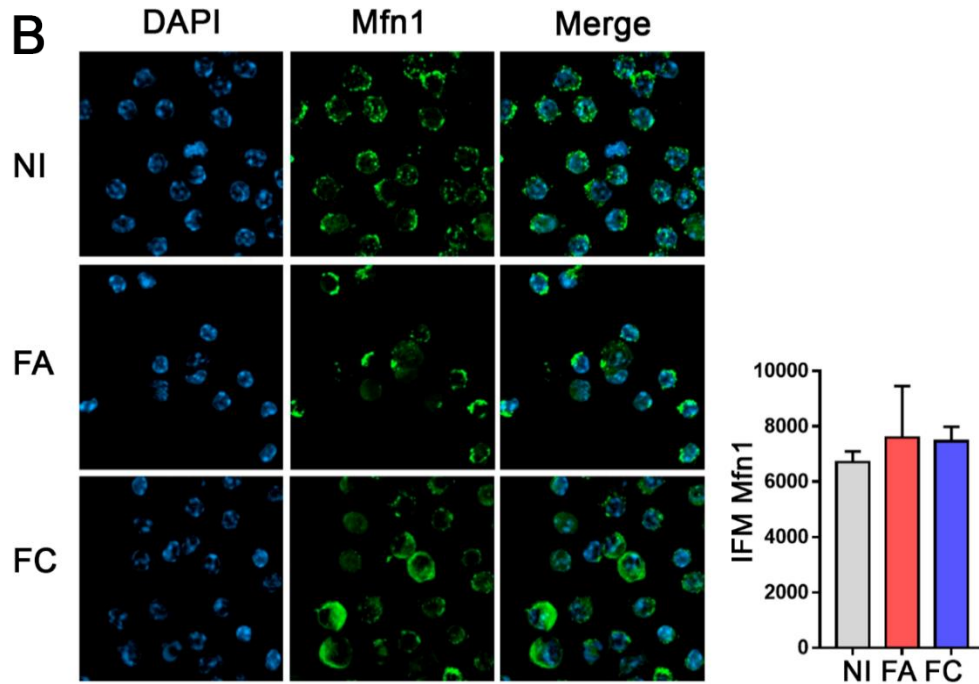


**Figura 9. Durante la FA de la infección las células T CD4 presentan diferencias en la morfología mitocondrial.**

Se realizó una microscopía confocal empleando las sondas mitocondriales independiente (MT green) y dependiente (MT orange) del potencial de membrana. Se marcaron los núcleos con DAPI. Se muestra una imagen representativa de un corte en z. Las regiones señaladas corresponden a mitocondrias marcadas con ambas sondas mitocondriales. Se tomaron 3 fotografías de cada individuo de los grupos de animales NI e infectados en FA. (n = 3 ratones por grupo).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo anterior respecto a la morfología mitocondrial y las alteraciones mitocondriales que describimos previamente, determinamos la expresión de las moléculas involucradas en la fusión mitocondrial Mfn1 y OPA1 (Fig. In13) en linfocitos T CD4 de ratones NI, infectados en FA y FC. De esta manera, se realizó una inmunofluorescencia marcando los linfocitos T CD4 con anticuerpos específicos para estas moléculas. Por microscopía confocal se evidenció un incremento significativo en la expresión de OPA1 en ambos grupos de ratones infectados con respecto a los NI (Fig. 10A) sin presentarse cambios en la expresión de Mfn1 (Fig. 10B). A pesar de estar incrementada la expresión de OPA1, es necesaria más evidencia sobre la forma de OPA1 que se encuentra aumentada (S-OPA1 o L-OPA1), además de la evaluación de la fisión mitocondrial, de modo que se pueda llegar a una conclusión acertada sobre estos eventos de dinámica mitocondrial.





**Figura 10. Células T CD4 de ratones infectados evidencian una incrementada expresión de OPA1.**

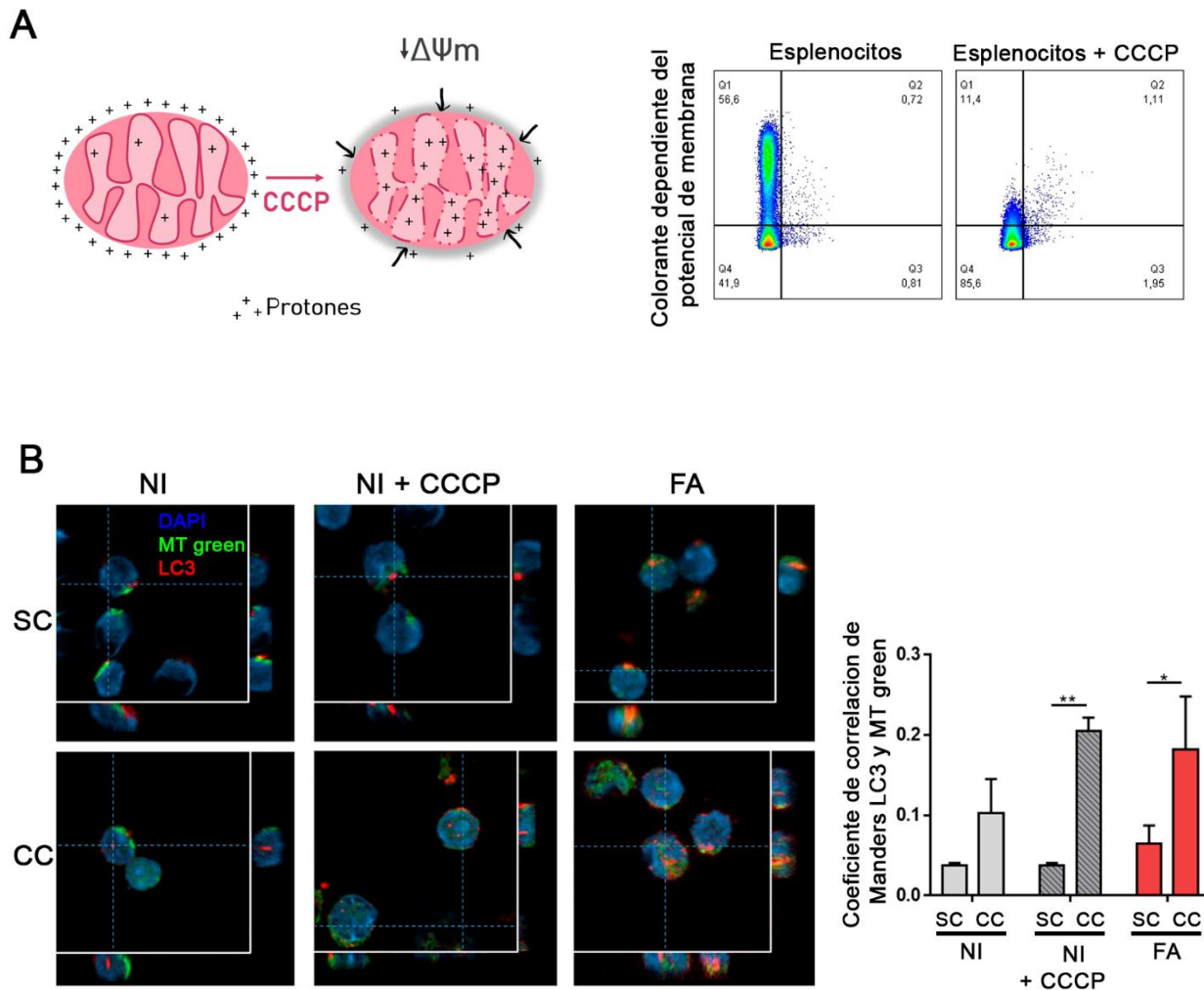
Se determinó la expresión de OPA1 (A) y Mfn1 (B) por microscopía confocal en células T CD4 purificadas de ratones NI e infectados en FA y FC. Se muestran imágenes representativas para cada grupo experimental de proyecciones en Z de la máxima intensidad de fluorescencia. Los gráficos de barra corresponden a la cuantificación de IFM de OPA1 y Mfn1 de cada grupo de animales. \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  por ANOVA de una vía ( $n = 3/4$  ratones por grupo). Se realizó el análisis de Tukey para comparaciones múltiples. Las barras de error representan la media  $\pm$  DS.

### 3.1 Evaluación de mitofagia por microscopía confocal.

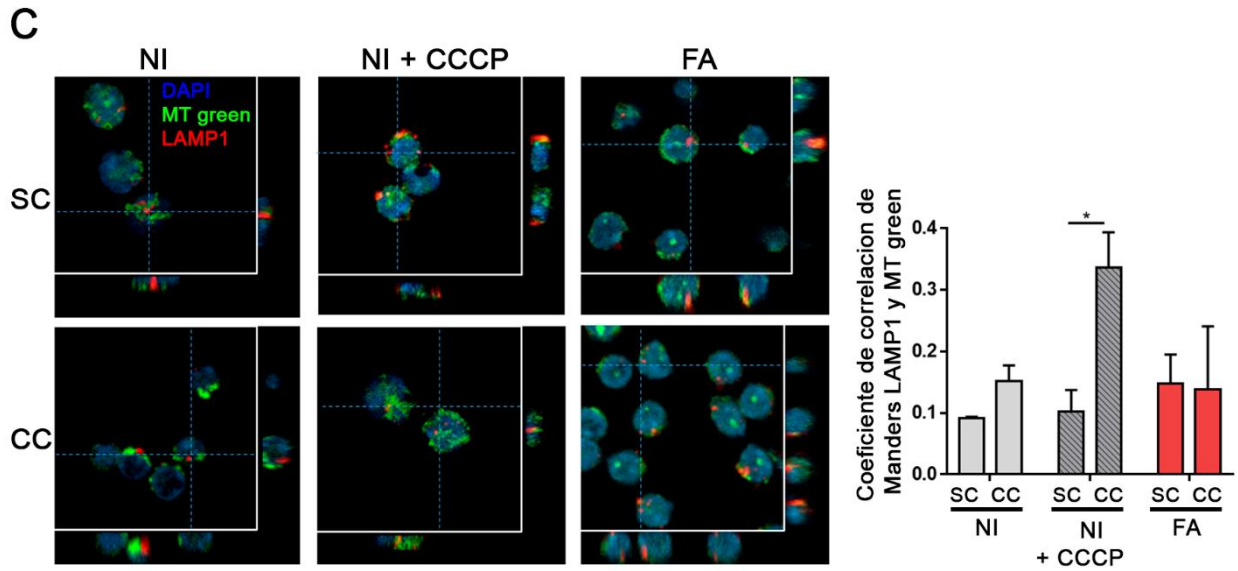
Aunque la dinámica mitocondrial media la respuesta celular al daño mitocondrial, los defectos persistentes desencadenan la eliminación de toda la organela a través de la mitofagia. Un deterioro en la mitofagia perturba la función mitocondrial y causa acumulación progresiva de mitocondrias defectuosas, generando daño celular. Existen procesos de mitofagia basal, que se refiere a la eliminación mitocondrial continua que asegura el reciclaje de organelas deterioradas o dañadas, y mitofagia inducida por estrés es gatillada por señales de estrés intra o extracelular que afectan la fisiología mitocondrial y puede inducir una eliminación aguda de mitocondrias<sup>64,66</sup>. Teniendo en cuenta la acumulación de mitocondrias dañadas que ocurre en las células T CD4 de ratones en FA de infección (Fig. 8C) nos preguntamos si podría deberse a algún defecto en su eliminación mediante el proceso de mitofagia. Para ello, realizamos microscopía confocal para determinar la colocalización de las mitocondrias marcadas con MT Green, con la molécula LC3 (marcador de autofagosoma) y con la molécula LAMP1 (marcador de lisosoma). Empleamos como control positivo

de mitofagia, células T CD4 de ratones NI tratadas con el agente desacoplante CCCP (Carbonil cianida 3-clorofenilhidrazona) que induce la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Fig. 11A).

Se cultivaron células T CD4 de los grupos experimentales NI y FA tanto en ausencia como en presencia de cloroquina que bloquea el flujo autofágico. Evidenciamos que las mitocondrias de células T CD4 de FA muestran una incrementada colocalización con la molécula LC3, indicando la formación de mitofagosomas (Fig. 11B), pero cuando evaluamos el flujo de mitofagia a nivel lisosomal, nos encontramos con una menor colocalización entre la sonda mitocondrial y la molécula LAMP1, a partir de lo que se podría interpretar como una reducción en la aproximación del autofagosoma al lisosoma para formar el mitofagolisosoma (Fig. 11C).







**Figura 11. Flujo mitofágico reducido a nivel lisosomal en células T CD4 de la FA de la infección.**

Se evaluó el flujo mitofágico por microscopía confocal mediante la determinación de colocalización de mitocondrias con autofagosoma (LC3) y con lisosomas (LAMP1). Se muestra un esquema representativo del efecto que generan los agentes desacoplantes como el CCCP y un gráfico de puntos que demuestra la reducción del potencial de membrana con el agregado de CCCP (A). Las fotografías corresponden a un corte representativo, con vistas ortogonales en el eje X e Y de las secciones indicadas con líneas de puntos azules. Se cuantificó el coeficiente de colocalización de Manders para MT green y LC3 (B) y para MT green y LAMP1 (C) en células T CD4 de ratones NI, NI tratadas con CCCP y de ratones infectados en FA tanto en ausencia como presencia de cloroquina. \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  por ANOVA de dos vías ( $n = 3$  ratones por grupo). Se realizó el análisis de Tukey para comparaciones múltiples. Las barras de error representan la media  $\pm$  DS.



# Conclusiones capítulo I

En este primer capítulo de resultados comparamos el perfil metabólico y el estado mitocondrial de las células T CD4 durante la FA de la infección respecto a las células de animales NI o infectados en la FC. Estos resultados nos permitieron determinar que las células T CD4 de la FA de la infección:

- Presentan un metabolismo exacerbado con incremento tanto de la glucólisis como del consumo de O<sub>2</sub>, que no se modifican con la estimulación policlonal.
- Muestran un incremento significativo en la respiración no mitocondrial y en la fuga de protones que se acompañó con un aumento en la expresión de UCP3.
- A tiempos tempranos de la infección, se produce una hiperpolarización de la membrana mitocondrial con una acumulación progresiva de ROSm y una subsecuente pérdida del potencial de membrana mitocondrial y daño estructural en esta organela hacia la FA de la infección.
- Exhibieron acumulación de mitocondrias dañadas, posiblemente a causa de un defecto en el flujo mitofágico debido a una menor formación de mitofagolisosomas.

Estos resultados nos permiten concluir que la activación de las células T CD4 durante la FA de la infección conduce a un incremento del metabolismo, generando un aumento de la producción de ROSm, a través de la hiperpolarización de la membrana mitocondrial. El incremento en los niveles de ROSm es necesario para una óptima activación y reprogramación metabólica de estas células. Sin embargo, a pesar del incremento de la fuga de protones y la expresión de las proteínas UCP los niveles de ROSm siguen en aumento a medida que la infección progresa y esto se correlaciona con la pérdida del potencial de membrana mitocondrial. Fallas en los mecanismos de mitofagia podrían explicar en efecto, el aumento de la acumulación de estas mitocondrias dañadas en estas células.

## RESULTADOS II

### Caracterización del fenotipo de linfocitos T CD4 con daño mitocondrial

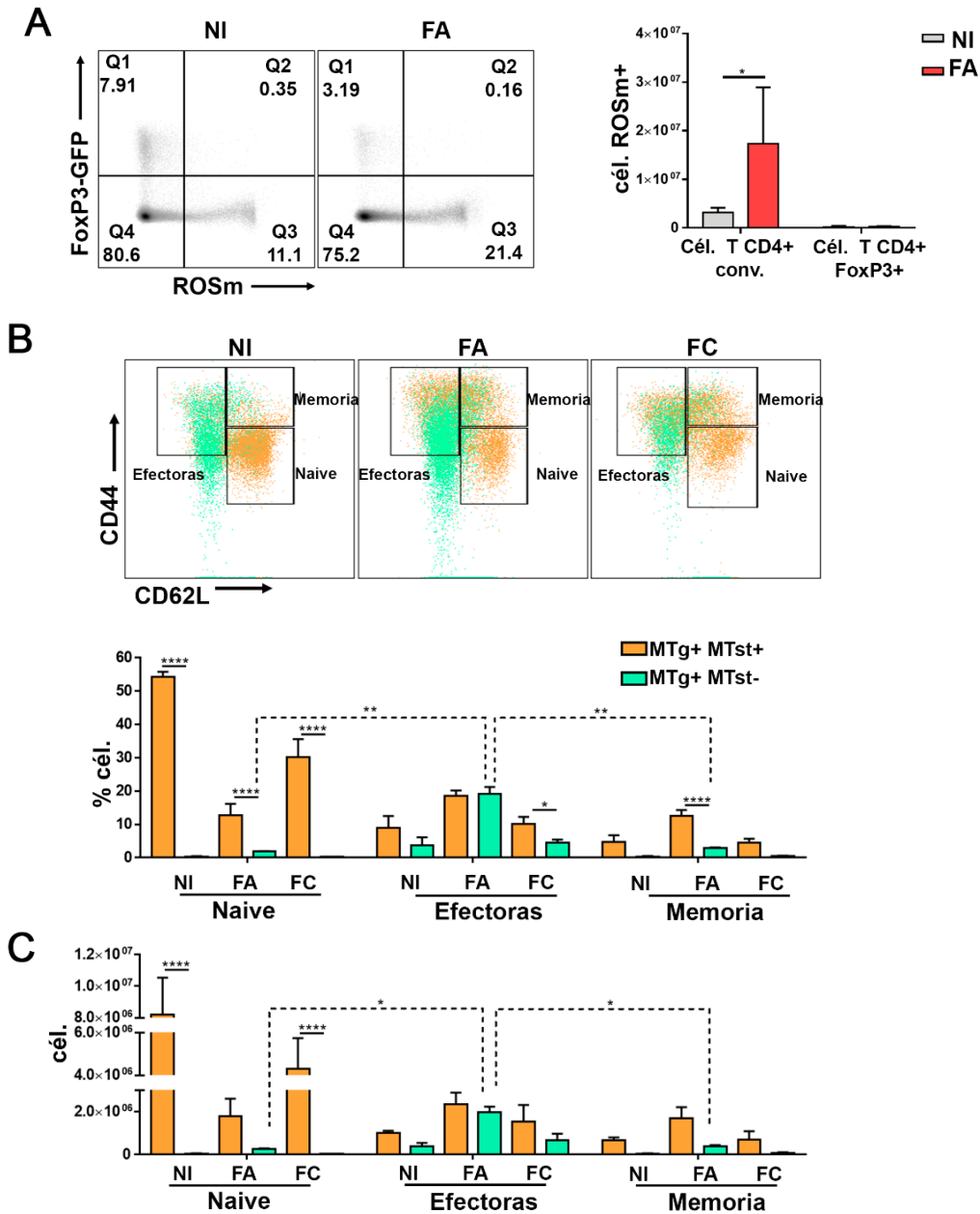
## RESULTADOS II

1.El daño mitocondrial observado durante la FA de la infección se evidencia en células T CD4 activadas.

### **1.1 Caracterización del fenotipo de las células productoras de ROSm que presentan daño mitocondrial.**

Posterior a los resultados presentados en el capítulo I, decidimos profundizar la caracterización del fenotipo de estas células T CD4 con mitocondria dañada que se acumulan durante la FA de la infección. Siendo que en la sección anterior realizamos los análisis en la población total de células T CD4, como primera medida verificamos si aquellas células productoras de ROSm eran convencionales o regulatorias. Para ello, realizamos el esquema de infección en ratones FoxP3-GFP (proteína fluorescente verde o GFP bajo el promotor del factor de transcripción forkhead box P3 o FoxP3), y determinamos la producción de ROSm en células T CD4 tanto en animales NI como infectados en FA. La producción de ROSm evidenciada en la FA de la infección sucede en células T CD4 convencionales, y no en las células T CD4 FoxP3<sup>-</sup> GFP<sup>+</sup> (Fig. 12A).

A continuación, evaluamos el estado de diferenciación de los linfocitos T CD4. Está ampliamente descrito que dentro de la población de linfocitos T CD4 murinos se pueden distinguir diferentes estados de diferenciación mediante la expresión de CD62L (L-selectina) y de CD44. Se considera naive a la población CD62L<sup>+</sup> con baja expresión de CD44, efectoras (ya sea recientemente activadas o de memoria efectora) a células CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> y de memoria central a células CD62L<sup>+</sup> con alta expresión de CD44<sup>123</sup>. Basándonos en estos marcadores, empleamos dicha estrategia para definir la frecuencia de las poblaciones naive o virgen (CD44<sup>-</sup> CD62L<sup>+</sup>), efectora (CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup>) y de memoria (CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>) dentro de la población de células con mitocondrias normales (MTg<sup>+</sup>MTst<sup>+</sup>) o depolarizadas (MTg<sup>+</sup>MTst<sup>-</sup>) en los grupos experimentales. Observamos que, durante la FA de la infección, las células productoras de ROSm son linfocitos T CD4 convencionales, y una alta frecuencia tanto relativa (Fig. 12B) como absoluta (Fig. 12C) de linfocitos T CD4 efectores (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) presentaban daño mitocondrial.

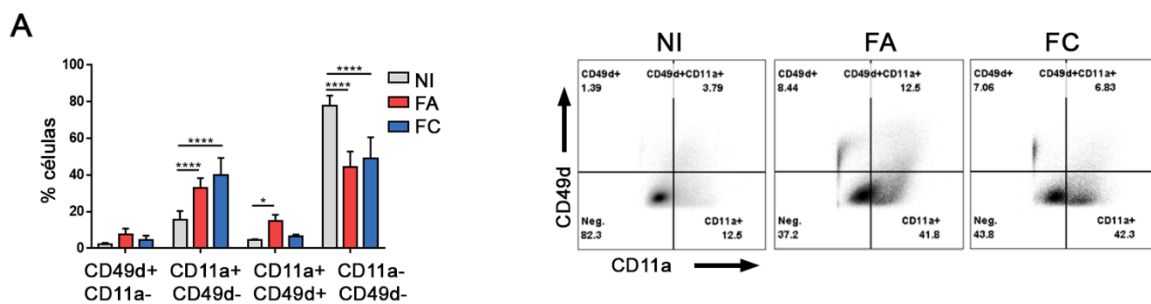


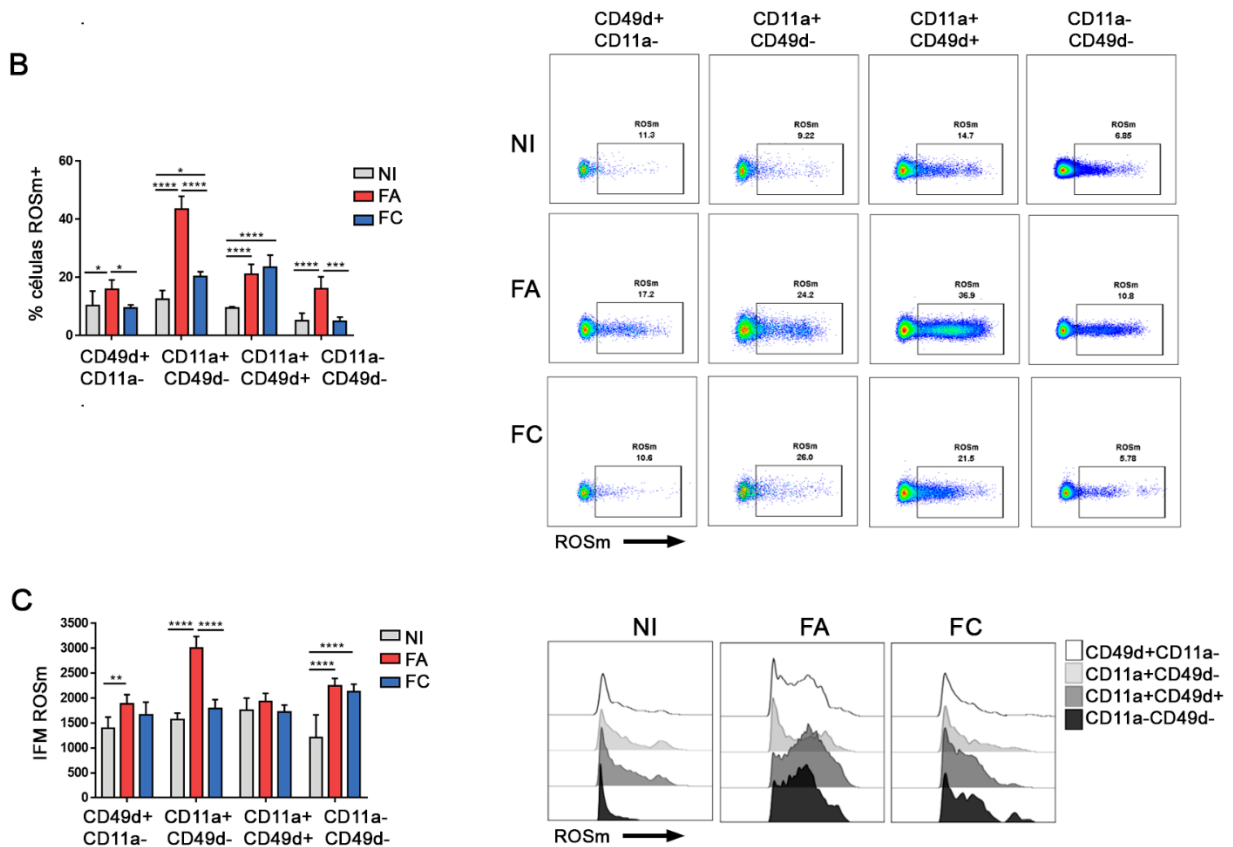
**Figura 12. Las células T CD4 convencionales constituyen la población productora de ROSm, y durante la FA de la infección las células efectoras presentan mayor frecuencia de depolarización mitocondrial.**

La producción de ROSm en células T CD4 de ratones FoxP3-GFP NI o infectados en FA de la infección se evaluó por citometría de flujo utilizando la sonda MitoSOX. Se muestra un gráfico de puntos representativo para cada grupo de animales. El gráfico de barras exhibe la frecuencia absoluta de células productoras de ROSm dentro de las células T CD4 convencionales o CD4 FoxP3<sup>+</sup> para cada grupo de animales (A). Se analizaron por citometría de flujo las poblaciones de células naive (CD44<sup>-</sup> CD62L<sup>+</sup>), efectoras (CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup>) y de memoria (CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>) en conjunto con las sondas mitocondriales en células T CD4 de animales Balb/c de los distintos grupos. La frecuencia de dichas poblaciones celulares fue cuantificada dentro de las poblaciones T CD4 con mitocondria normal (representadas en naranja) y con mitocondria depolarizada (representadas en verde) en los tres grupos experimentales. Se muestra un gráfico de puntos representativo para cada grupo de animales en los cuales se exhibe en naranja las células naive, efectoras y de memoria con mitocondria normal, y en

verde, las células naive, efectoras y de memoria con depolarización mitocondrial. Los gráficos de barras denotan la frecuencia relativa (B) y absoluta (C) de células naive, efectoras y de memoria con mitocondria normal o depolarizada para los tres grupos de animales. Los datos cuantificados son representativos de tres experimentos independientes (n = 3/4 ratones por grupo). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001 por ANOVA de dos vías. Se realizó el análisis de Tukey para comparaciones múltiples. Las barras de error representan la media ± DS.

Adicionalmente, evaluamos la expresión de las integrinas de superficie CD11a (cadena  $\alpha$  de la integrina CD18 o LFA-1) y CD49d (cadena  $\alpha$  de la integrina VLA-4), denominados marcadores sustitutos de especificidad, ya que su expresión incrementa posterior a la activación de la célula T. La expresión de estos marcadores han sido utilizados para identificar con éxito, linfocitos T CD4 específicos de antígeno contra patógenos virales<sup>124</sup> y contra protozoarios<sup>125,126</sup> en ratones y también han sido utilizados como marcadores para determinar células T humanas específicas de antígenos luego de la vacunación<sup>127</sup>. En este caso, determinamos la frecuencia de células que expresan CD49d, CD11a, ambas integrinas, o ninguna de ellas. Es decir que, a partir de dichos marcadores definimos 4 poblaciones: CD49d<sup>+</sup>CD11a<sup>-</sup>, CD49d<sup>+</sup>CD11a<sup>+</sup>, CD11a<sup>+</sup>CD49d<sup>-</sup> y CD11a<sup>-</sup>CD49d<sup>-</sup>. Determinamos la frecuencia de dichas poblaciones en células T CD4 de ratones NI e infectados en FA y FC, encontrando dentro de la fase aguda un incremento significativo en la población CD11a<sup>+</sup> CD49d<sup>-</sup> y en la población CD11a<sup>+</sup>CD49d<sup>+</sup>(Fig. 13A). Adicionalmente, determinamos la frecuencia de células dentro de cada población que produce ROSm, encontrando que la mayor frecuencia relativa de células ROSm<sup>+</sup> pertenece a la población de linfocitos T CD4 que expresan CD11a (Fig. 13B). Además, evaluamos la IFM de células productoras de ROSm para dichas poblaciones hallando un incremento significativo en la cantidad de ROSm por parte de esta población (Fig. 13C).





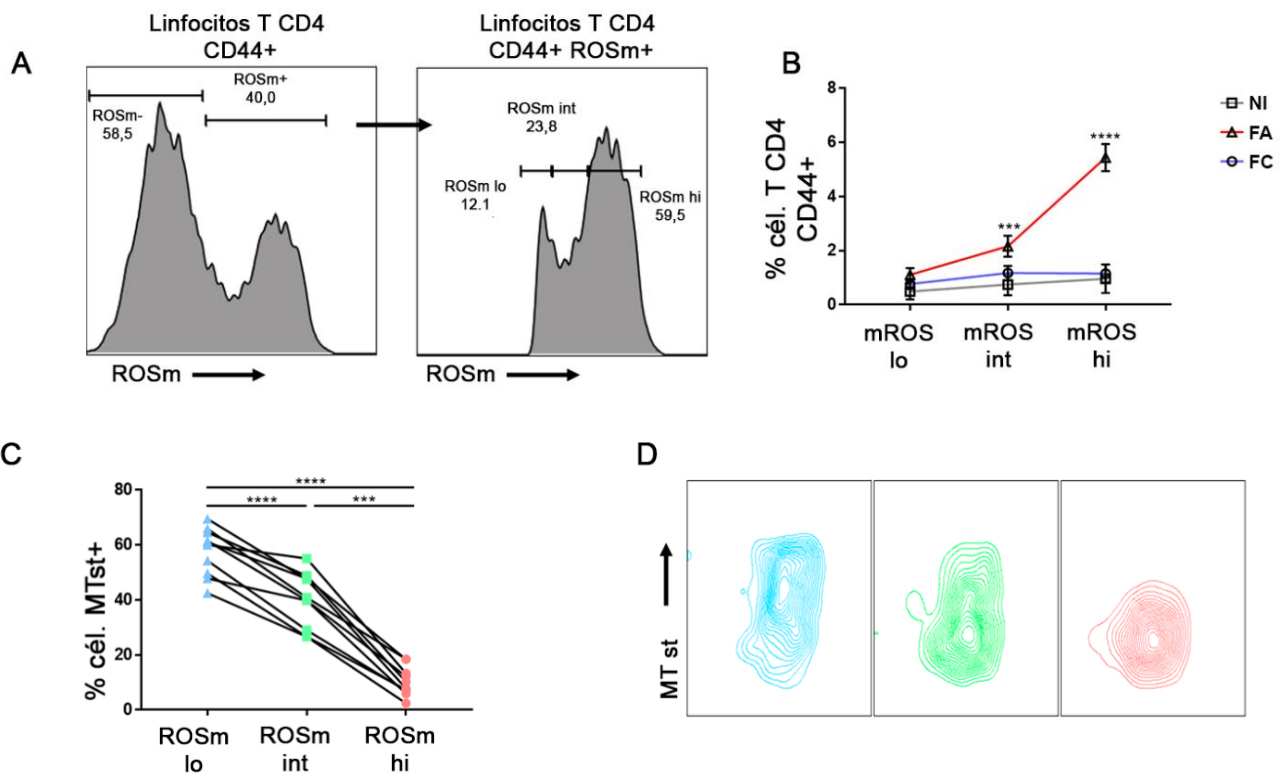
**Figura 13. Durante la FA hay una alta frecuencia de células T CD4 CD11a<sup>+</sup>CD49d<sup>-</sup> que producen ROSm.**

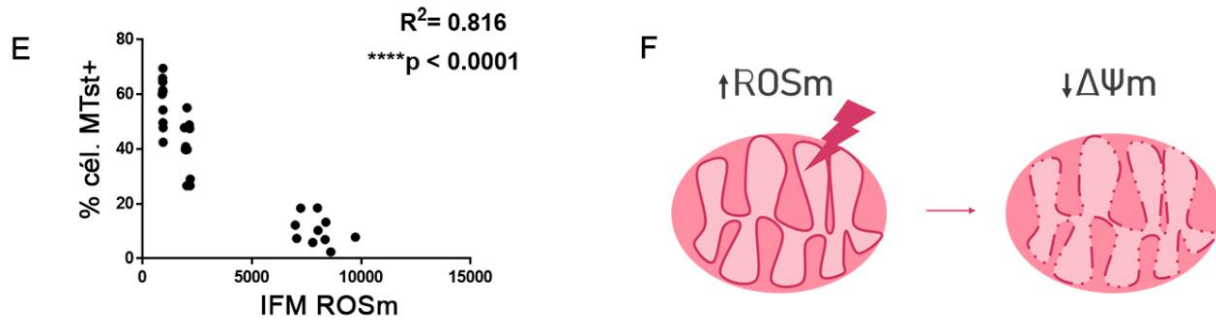
La determinación de la expresión de los marcadores de activación CD49d y CD11a se realizó en células T CD4 de bajo de los distintos grupos de animales por citometría de flujo. Se definieron 4 poblaciones de células T CD4: CD49d<sup>+</sup>CD11a<sup>-</sup>, CD11a<sup>+</sup>CD49d<sup>+</sup>, CD11a<sup>+</sup>CD49d<sup>-</sup> y CD11a<sup>-</sup>CD49d<sup>-</sup>. El gráfico de barras muestra la frecuencia relativa de cada población tanto en animales NI como infectados en FA y FC (A). Se evaluó en estas poblaciones celulares mediante el empleo de la sonda MitoSOX la frecuencia relativa de células productoras de ROSm para todos los grupos de ratones (B). Se muestra la expresión de ROSm evaluada mediante la IFM dentro de las poblaciones celulares analizadas para cada grupo experimental (C). Se muestran gráficos de puntos e histogramas representativos para cada determinación. Los datos cuantificados son representativos de tres experimentos independientes (n = 3/4 ratones por grupo). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001 por ANOVA de dos vías. Se realizó el análisis de Tukey para comparaciones múltiples. Las barras de error representan la media ± DS.

## 1.2 Caracterización del fenotipo de las células productoras de ROSm

Profundizando el estudio de la población de células productoras de ROSm, observamos que se evidencian células con distinta magnitud de producción de superóxido mitocondrial. Por lo tanto, y basándonos en las intensidades de fluorescencia de la sonda MitoSOX, dentro de la población de linfocitos T CD4 efectoras de ratones infectados, diferenciamos 3 poblaciones de células productoras de ROSm según tengan baja (ROSm<sup>lo</sup>), intermedia (ROSm<sup>int</sup>) o alta intensidad de

fluorescencia (ROSm<sup>hi</sup>) (Fig. 14A). Cuando analizamos estas poblaciones en las células T CD4 efectoras en los distintos grupos de animales, encontramos que, durante la FA de la infección, la frecuencia de células T CD4 efectoras productoras de cantidades intermedias y altas de ROSm era significativamente mayor (Fig. 14B). Complementariamente, realizamos un análisis del PMM empleando la sonda dependiente de potencial (MT status red) en las 3 poblaciones definidas previamente (Fig. 14A), a partir del cual determinamos que mientras más ROSm se acumula en las células T CD4 efectoras, la frecuencia de células con PMM conservado es menor (Fig. 14C). Por el contrario, las células con baja producción de ROSm (ROSm<sup>lo</sup>), tienen mayor frecuencia de células con mitocondrias polarizadas (MTst<sup>+</sup>), a diferencia de aquellas con producción de ROSm intermedia (ROSm<sup>int</sup>) cuya frecuencia de células MTst<sup>+</sup> comienza a disminuir hasta desaparecer en las células con alta producción de ROSm (ROSm<sup>hi</sup>) (Fig. 14C y D). De este modo se puede hacer una correlación más acertada entre la cantidad de ROSm y la frecuencia de células con mitocondrias polarizadas (MTst<sup>+</sup>), siendo ésta una relación lineal negativa altamente significativa (Fig. 14E). De esta manera podemos decir que, el grado de depolarización mitocondrial de las células está fuertemente vinculado a las concentraciones de ROSm que esta posea (Fig. 14F).





**Figura 14. El potencial de membrana mitocondrial disminuye a medida que incrementa la producción de ROSm en c elulas T CD4 activadas durante la infección por *T. cruzi*.**

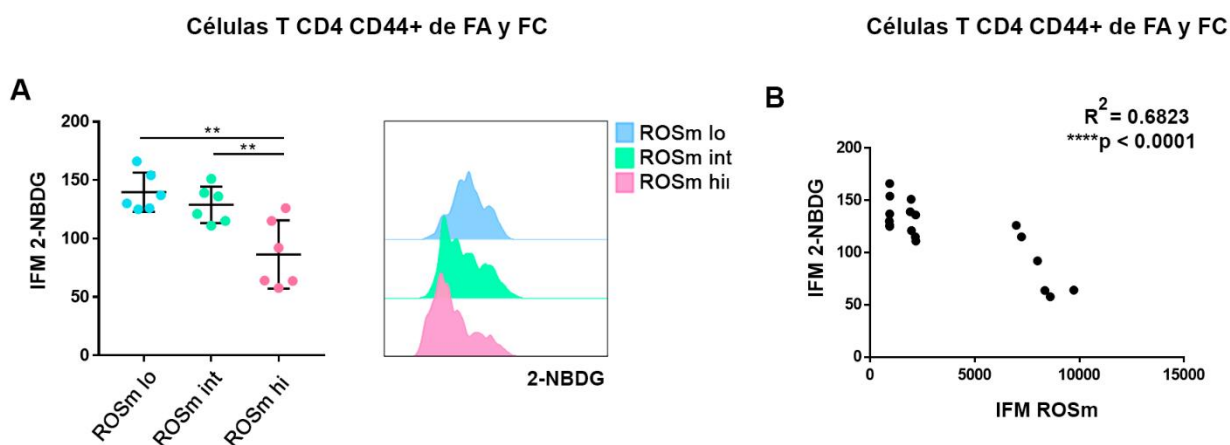
La producción de ROSm en c elulas T CD4 CD44<sup>+</sup> de ratones infectados se evaluó por citometría de flujo a través de la marcación con la sonda MitoSOX. Dentro de la población ROSm<sup>+</sup> se diferenciaron 3 sub-poblaciones de acuerdo a las diferencias en intensidad de fluorescencia: c elulas con baja producción de ROSm o ROSm<sup>lo</sup>, con producción intermedia o ROSm<sup>int</sup> y con alta producción ROSm<sup>hi</sup> (A). Se cuantificó la frecuencia de cada una de estas 3 poblaciones en c elulas T CD4 de bazo de animales NI, infectados en FA y FC (B). Mediante el empleo de la sonda mitocondrial dependiente del potencial (MT status red), se determinó la frecuencia de c elulas con mitocondrias normales en las poblaciones ROSm<sup>lo</sup>, ROSm<sup>int</sup> y ROSm<sup>hi</sup>, en ratones NI e infectados en FA y FC (C). Se muestra un gráfico representativo para el potencial de membrana mitocondrial dentro de cada subpoblación productora de ROSm (D). Se calculó el índice de correlación de Pearson, entre la cantidad de ROSm producida (IMF) y la frecuencia de c elulas con mitocondrias polarizadas (Población MTst<sup>+</sup>) (E). Esquema que representa los fenómenos observados en esta figura. A medida que se acumula ROSm las c elulas pierden la integridad del potencial de membrana mitocondrial (F). Los datos cuantificados son representativos de tres experimentos independientes (n = 3/4 ratones por grupo). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001 por ANOVA de una vía. Se realizó el análisis de Tukey para comparaciones múltiples. Previo al análisis de correlación de Pearson, se realizó un test de normalidad.

### 1.3 Captación de glucosa en c elulas T CD4 activadas que producen ROSm

Para complementar la caracterización metabólica de las c elulas T CD4 activadas en la infección por *T. cruzi*, realizamos un análisis de captación de glucosa dentro de las c elulas T CD4 CD44<sup>+</sup> productoras de ROSm de ratones NI e infectados en FA y FC, mediante citometría de flujo a través de la utilización del análogo de glucosa 2-NBDG como fue explicado previamente. Analizamos la captación de glucosa como IFM dentro de las tres poblaciones definidas en la figura anterior aquellas con baja (ROSm<sup>lo</sup>), intermedia (ROSm<sup>int</sup>), o alta producción de ROSm (ROSm<sup>hi</sup>) (Fig. 14A). Encontramos que los linfocitos T CD4 efectoras de ratones infectados muestran una disminución en la captación del análogo de D-glucosa a medida que la producción de ROSm se incrementa (Fig. 15A). Adicionalmente, observamos una correlación significativa entre el incremento en la producción de ROSm y la disminución en la captación de glucosa (Fig. 15B). Estos resultados podrían indicar que, probablemente, en un estadio inicial las c elulas T CD4 de animales infectados en FA



incrementen la tasa de glucólisis y que aquellas células que acumulan mayores cantidades de ROSm luego reducen su captación de glucosa y posiblemente su metabolismo.



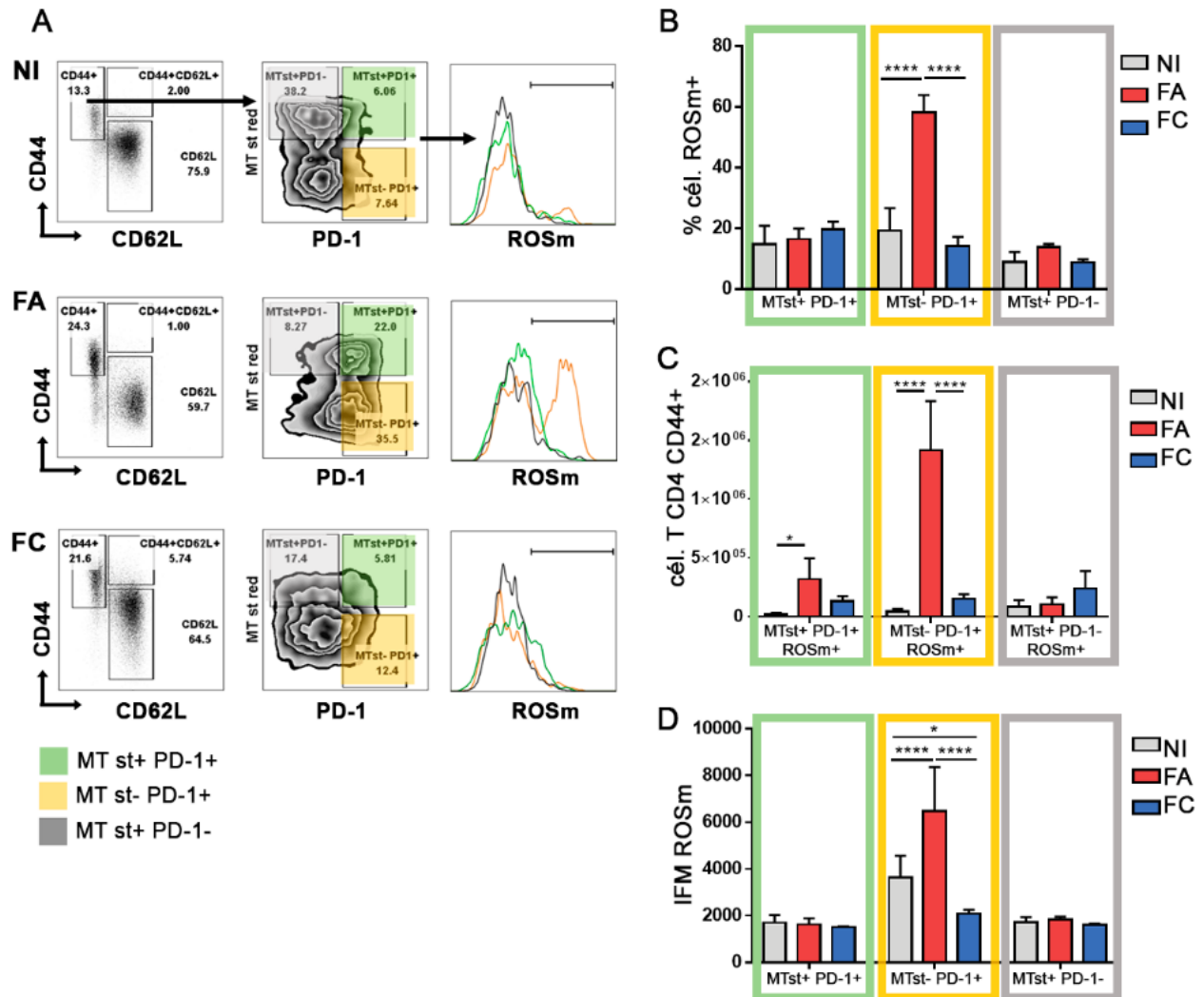
**Figura 15. La producción de ROSm se correlaciona negativamente con la captación de glucosa en las células T CD4 activadas.**

Se realizó un ensayo de captación del análogo de glucosa 2-NBDG en esplenocitos de ratones infectados en FA y FC. Posteriormente se determinó por citometría de flujo, la IFM de 2-NBDG en tres poblaciones de células T CD4 CD44<sup>+</sup> diferenciadas según la expresión de ROSm: lo, int y hi (A). Análisis de correlación de Pearson entre la IFM de ROSm y la IFM de 2-NBDG (B). Se empleó un n=3 por cada grupo experimental. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001 por ANOVA de una vía. Se realizó el análisis de Tukey para comparaciones múltiples. Las barras de error representn la media ± DS. Previo al análisis de correlación de Pearson, se realizó un test de normalidad.

#### 1.4 Expresión del receptor inhibitorio PD-1 en células productoras de ROSm

Considerando que los eventos que observamos durante la FA ocurren en linfocitos T CD4 efectoras, y que la expresión de receptores inhibitorios se induce como freno a la incipiente activación, determinamos la expresión del receptor inhibitorio 1 de muerte programada (de sus siglas en inglés, PD-1)<sup>107,110</sup>. Adicionalmente, se ha reportado que existe un vínculo entre la señalización a través de PD-1 y la generación de ROSm con consecuente daño mitocondrial. De hecho, se demostró que la señal PD-1 conduce a la acumulación de mitocondrias depolarizadas en las células T CD8 durante la infección por LCMV<sup>107</sup> y en cáncer<sup>128</sup>. Frente a esta evidencia, investigamos si había algún tipo de relación entre la acumulación de mitocondrias dañadas y la expresión del receptor inhibitorio PD-1 y la producción de ROSm en células T CD4 efectoras. Analizamos dentro de la población de linfocitos T CD4 efectoras (CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup>), la frecuencia de células con mitocondrias polarizadas (MTst<sup>+</sup>, representada en gris), la frecuencia de células con mitocondrias polarizadas que expresan PD-1 (MTst<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup>, representada en verde) y de células con mitocondria depolarizada que expresan PD-1 (MTst<sup>-</sup> PD-1<sup>+</sup>, representada en amarillo). Dentro de cada una de estas 3 poblaciones, se determinó

la frecuencia de células productoras de ROSm, y observamos que durante la FA de la infección hay una frecuencia significativamente mayor de células T CD4 con fenotipo activado, que presentan daño mitocondrial, producen ROSm y expresan PD-1 (Fig. 16 B y C). Además, se determinó la IFM de ROSm dentro de las poblaciones MTst<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>, MTst<sup>-</sup>PD-1<sup>+</sup> y MTst<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup> en células provenientes de ratones NI e infectados en FA y FC, encontrando una mayor expresión de ROSm en linfocitos T CD4 efectores MTst<sup>-</sup>PD-1<sup>+</sup> (Fig. 16 D).



**Figura 16. Durante la FA se encuentra incrementada la frecuencia de células T CD4 con depolarización mitocondrial que expresan PD-1 y producen ROSm.**

Se determinó por citometría de flujo, la frecuencia de células T CD4 que expresan PD-1 y producen ROSm tanto en la población con mitocondria normal (MTst<sup>+</sup>) como en aquellas cuyas mitocondrias se encuentran depolarizadas (MTst<sup>-</sup>), dentro de la población de células T CD4 efectoras (CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup>) para los tres grupos de animales estudiados. De esta manera se definieron la población de células con mitocondrias normales (MTst<sup>+</sup> PD-1<sup>-</sup> recuadro gris), con mitocondrias normales que expresan PD-1 (MTst<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> recuadro verde) y con mitocondrias depolarizadas que expresan PD-1 (MTst<sup>-</sup> PD-1<sup>+</sup> recuadro amarillo) (A). Para cada una de estas

3 poblaciones se cuantificó la frecuencia relativa (B) y absoluta (C) de células que expresan ROSm. Además, se determinó la IFM de ROSm para dichas poblaciones en células de ratones NI, FA y FC (D). Los gráficos de puntos representan la estrategia empleando los marcadores CD44 y CD62L, a partir de las cuales se obtienen los gráficos de cebra donde se definen las 3 poblaciones según la polarización mitocondrial y expresión de PD-1. Los histogramas representan la frecuencia de células productoras de ROSm y la IFM de ROSm dentro de las poblaciones determinadas previamente. Se muestra un gráfico de puntos, cebra e histograma representativo de cada grupo de animales. Los datos cuantificados son representativos de tres experimentos independientes. Las cuantificaciones de la frecuencia relativa y absoluta se realizaron tanto en ratones NI como infectados en FA y FC.  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  por ANOVA de dos vías ( $n = 3/4$  ratones por grupo). Se realizó el análisis de Tukey para comparaciones múltiples. Las barras de error representan la media  $\pm$  DS.

## Conclusiones capítulo II

En este segundo capítulo de resultados, caracterizamos el fenotipo de linfocitos T CD4 que producen ROSm y que presentan daño mitocondrial durante la FA de la infección. Estos resultados nos permitieron determinar que:

- Son linfocitos T CD4 convencionales, ya que las células T regulatorias FoxP3<sup>+</sup> no mostraron niveles significativos de producción de superóxido mitocondrial o ROSm.
- Presentan un fenotipo efector. Adicionalmente expresan marcadores asociados con especificidad como las moléculas CD11a y CD49d.
- Son más frecuentes durante la FA de la infección y la depolarización mitocondrial se correlaciona con la cantidad de ROSm producida, y con una menor captación de glucosa.
- Muestran una alta frecuencia de células que expresan PD-1 y producen ROSm. Además, estas células presentan una alta expresión de ROSm.

Estos resultados nos permiten concluir que, aunque normalmente las células T activadas expresan CD44, PD-1 y además producen ROSm, durante la FA de la infección una mayor proporción de células con este fenotipo mostró una pérdida del PMM. Por lo tanto, estos resultados podrían sugerir que las alteraciones mitocondriales observadas en las células T CD4 durante la FA de la infección podrían ser desencadenadas por la activación.

## RESULTADOS III

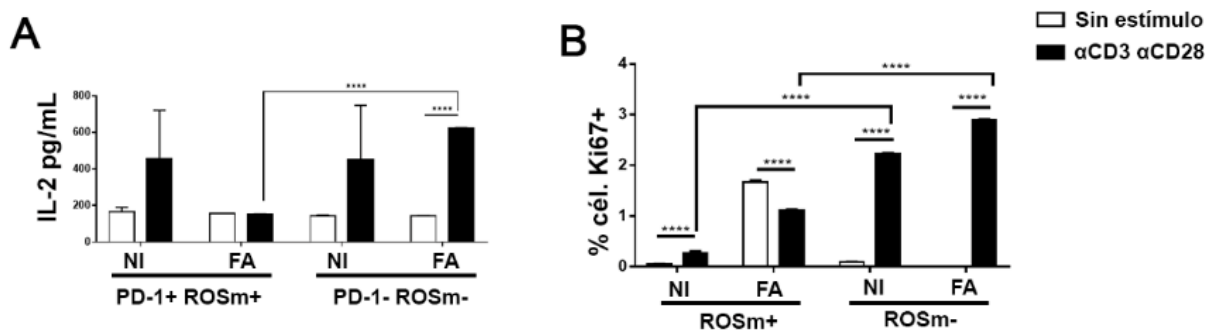
Impacto de las especies reactivas del oxígeno  
mitocondriales en la funcionalidad de células T CD4

## Resultados III

1. La funcionalidad de la célula T CD4 que expresa PD-1 y produce ROSm, se ve disminuida durante la FA de la infección

### **1.1 Producción de IL-2 y proliferación de linfocitos T CD4 PD-1<sup>+</sup> productores de ROSm.**

En el capítulo anterior observamos que, durante la FA de la infección, las alteraciones mitocondriales afectan principalmente a la población de células T CD4 efectoras. Seguidamente, quisimos evaluar si la funcionalidad de estas células estaba comprometida. Teniendo en cuenta que, durante la FA de la infección, una alta proporción de células T CD4 activadas que expresan PD-1 y producen ROSm tienen una disminución en el PMM (Fig. 16), y siendo que la depolarización mitocondrial está fuertemente vinculada a la expresión de PD-1<sup>107,128</sup>, empleamos como marcadores estratégicos la expresión de PD1 y la producción de ROSm para separar estas células y evaluar su funcionalidad. A partir de la población T CD4 purificada de bazo de animales NI y FA, se sortearon y estimularon en cultivo, células PD-1<sup>+</sup> ROSm<sup>+</sup> y PD-1<sup>-</sup> mROS<sup>-</sup> para el ensayo de detección de IL-2 en sobrenadante, y células ROSm<sup>+</sup> y ROSm<sup>-</sup> para evaluar la proliferación mediante la determinación del factor Ki67. Observamos que las células T CD4 PD-1<sup>+</sup>ROSm<sup>+</sup> de ratones infectados en FA fueron incapaces de incrementar la producción de IL-2 cuando se estimularon policlonalmente, comparado con la población PD-1<sup>-</sup>mROS<sup>-</sup> que luego del estímulo mostró un aumento de la producción de esta citoquina (Fig. 17A). De la misma manera, cuando evaluamos la proliferación observamos que la población ROSm<sup>+</sup> no responde a la estimulación mientras que sí lo hace la ROSm<sup>-</sup> (Fig. 17B). Estos resultados se observaron tanto en células T CD4 de animales NI como de infectados en FA; sin embargo, considerando que la frecuencia de células PD-1<sup>+</sup>ROSm<sup>+</sup> es significativamente mayor en los animales infectados en FA, este fenómeno tendría relevancia durante la infección. Nuestros hallazgos están en concordancia con reportes previos que han mostrado que tanto un déficit como un exceso de ROSm pueden condicionar la funcionalidad de la célula T CD4<sup>40</sup>.



**Figura 17. Las células T CD4 productoras de ROSm que expresan PD-1 presentan menor capacidad de liberar IL-2 y de proliferar.**

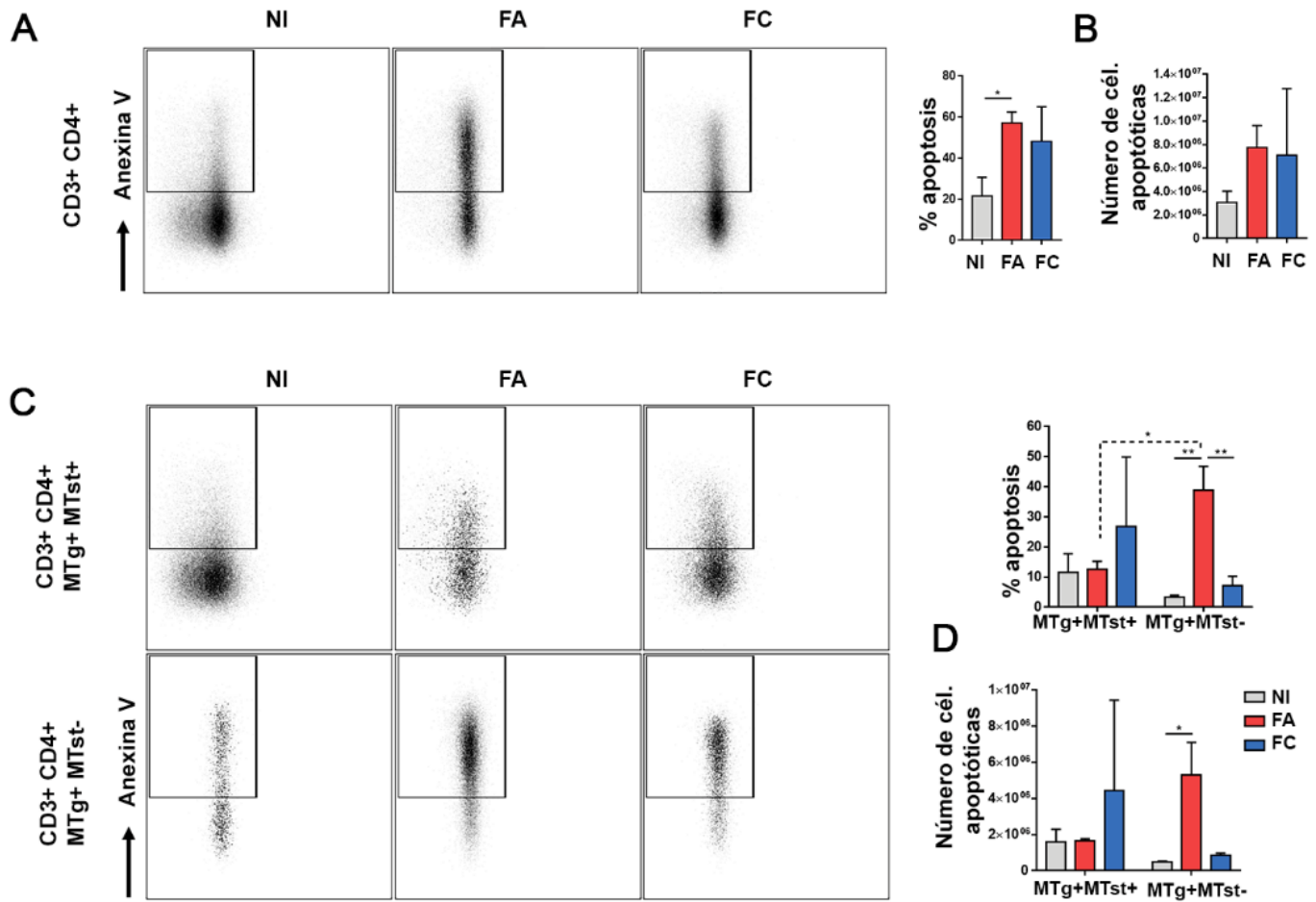
Se purificaron por selección positiva las células T CD4 de animales NI y en FA de la infección. Luego se realizó una clasificación o *sorting* empleando como parámetros de separación la producción de ROSm y la expresión de PD-1. Se obtuvieron tanto la población de células T CD4 PD-1<sup>+</sup> productoras de ROSm (PD-1<sup>+</sup>ROSm<sup>+</sup>), así como la población de células T CD4 PD-1<sup>-</sup> no productoras de ROSm (PD-1<sup>-</sup>ROSm<sup>-</sup>) de ratones NI e infectados en FA. Las poblaciones PD-1<sup>+</sup>ROSm<sup>+</sup> y PD-1<sup>-</sup>ROSm<sup>-</sup> obtenidas de animales NI e infectados agudos fueron cultivadas durante 72 h en RPMI completo en ausencia o presencia de estímulo policlonal con anti-CD3 y anti-CD28. Posteriormente, se procedió a la determinación de la citoquina IL-2 en el sobrenadante de cultivo mediante la técnica de ELISA Sandwich (A). Se obtuvieron las poblaciones de células T CD4 productoras de ROSm (ROSm<sup>+</sup>), así como la no productora de ROSm (ROSm<sup>-</sup>) de ratones NI e infectados en FA. Estas poblaciones fueron cultivadas durante 72 h en RPMI completo en ausencia o presencia de estímulo policlonal con anti-CD3 y anti-CD28. En las células de dicho cultivo se evaluó la expresión del factor de transcripción Ki67 mediante citometría de flujo, como marcador de proliferación celular (B). Los datos cuantificados son representativos de dos experimentos independientes (n = 3/4 ratones por grupo). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001 por ANOVA de dos vías. Se realizó el análisis de Tukey para comparaciones múltiples. Las barras de error representan la media ± DS.

2. Una alta tasa de apoptosis prevalece en la población de células T CD4 con daño mitocondrial.

### 2.1 Evaluación de la apoptosis en linfocitos T CD4 con mitocondrias dañadas.

Considerando los posibles efectos a nivel molecular que implica la acumulación de ROS, como el daño a proteínas y ADN<sup>129</sup>, es que decidimos evaluar la apoptosis tanto en la población T CD4 total como en poblaciones caracterizadas por los parámetros mitocondriales que hemos establecido previamente. Mediante una estrategia de “gates” previa, se descartaron las células muertas que corresponden a la población positiva para el colorante de viabilidad Aqua Live/Dead o para 7AAD. Observamos un incremento en la frecuencia de apoptosis en células T CD4 durante la FA de la infección (Fig. 18A y B), en concordancia con reportes previos<sup>98</sup>. Adicionalmente, nuestros resultados revelaron que hay una frecuencia, tanto relativa (Fig. 18C) como absoluta (Fig. 18D), significativamente mayor de células apoptóticas dentro de la población con mitocondrias

depolarizadas en la FA de la infección, mientras que no hay diferencias significativas en la frecuencia de células apoptóticas dentro de la población de células con mitocondria normal, en comparación con los animales NI o infectados en FC (Fig. 18C y D). Además, encontramos una correlación positiva entre el incremento en la depolarización mitocondrial y la apoptosis solo durante la FA de la infección (Fig. 18E y F).



**Figura 18. La frecuencia de células apoptóticas es significativamente mayor en células T CD4 de ratones en FA de la infección, que presentan depolarización mitocondrial.**

Se determinó la frecuencia de apoptosis mediante citometría de flujo, utilizando Anexina V en células T CD4 de bazo de ratones NI, e infectados en FA y FC. En “gates” previos se descartaron las células muertas o positivas para el colorante de viabilidad Aqua Live/Dead o para 7AAD. Se muestra un gráfico de puntos representativo para cada grupo de animales (A). Los gráficos de barras exhiben la frecuencia relativa (A) y absoluta (B) de células T CD4 que presentan apoptosis en los distintos grupos de animales. Se evaluó la frecuencia relativa y absoluta de apoptosis dentro de las células T CD4 con mitocondria normal (MTg<sup>+</sup>MTst<sup>+</sup>) o mitocondria dañada (MTg<sup>+</sup> MTst<sup>-</sup>) en los 3 grupos experimentales (NI, FA y FC). Se muestran gráficos de puntos representativos para cada grupo de animales que denotan la apoptosis dentro de las células con mitocondria normal y depolarizada (C). La frecuencia relativa (C) y absoluta (D) de apoptosis dentro de las poblaciones se cuantificó. Se analizó la correlación mediante el cálculo del coeficiente de Pearson entre la frecuencia de células con mitocondrias depolarizadas y el porcentaje de apoptosis en la FA (E) y FC (F). Los

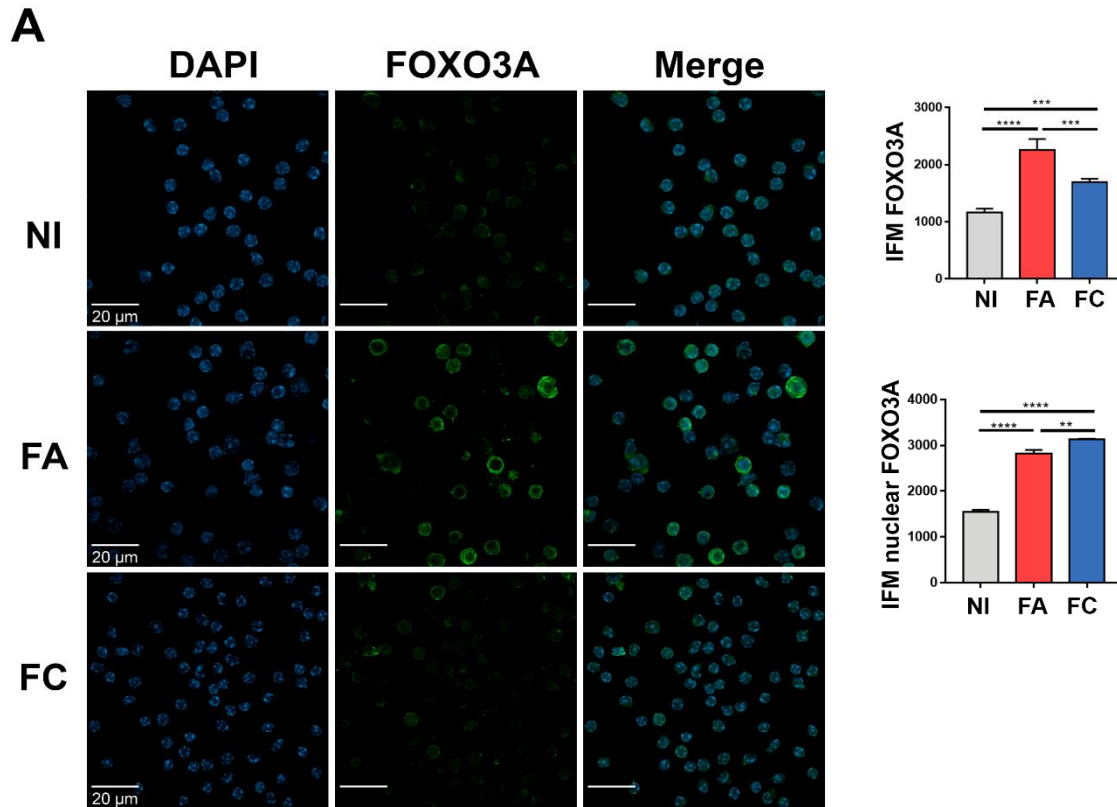


datos cuantificados son representativos de tres experimentos independientes (n = 3/4 ratones por grupo). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001 por ANOVA de una y dos vías. Se realizó el análisis de Tukey para comparaciones múltiples. Las barras de error representan la media ± DS.

3. La expresión de sistemas antioxidantes se encuentra incrementada en las células T CD4 durante la infección.

### **3.1 Evaluación de la expresión del factor de transcripción FOXO3A y la enzima SOD2 en linfocitos T CD4.**

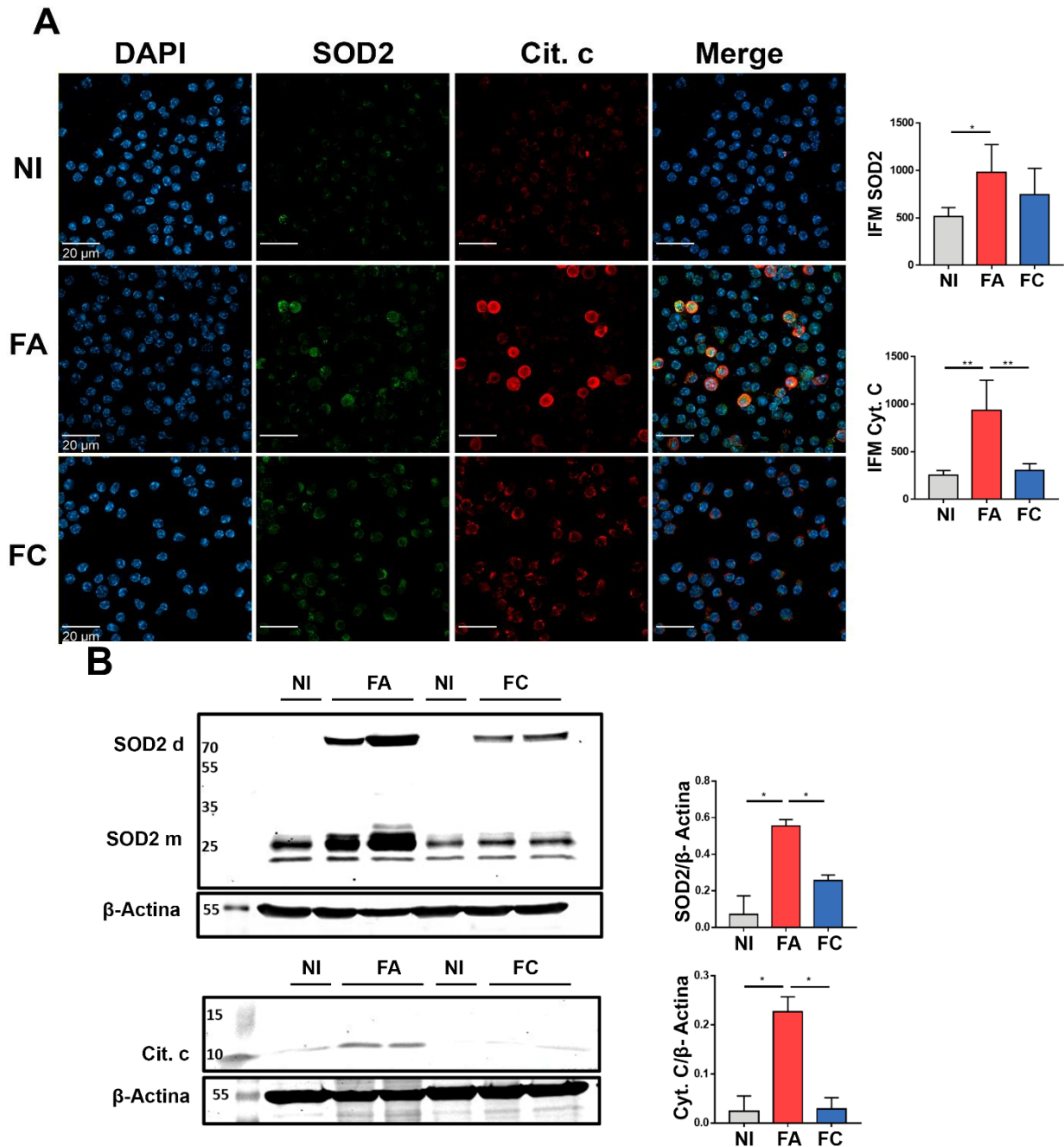
Como se mencionó previamente, la generación de ROSm es esencial para una correcta señalización que promueva la activación celular y reprogramación metabólica<sup>37,42</sup>. Sin embargo, la producción de ROSm debe ser estrictamente controlada, ya que la acumulación excesiva de estas especies oxidantes puede ser deletérea promoviendo estrés oxidativo<sup>40</sup>. Es por ello que evaluamos las enzimas antioxidantes en las células T CD4, que podrían neutralizar el ROSm. Se ha reportado que el factor de transcripción Forkhead 3A (FOXO3A) regula la detoxificación de ROSm a través del incremento en la expresión de la Mn-superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2)<sup>130</sup> (Fig. In10), de modo que investigamos la expresión de ambas moléculas en células T CD4 de animales NI o infectados tanto en FA como FC mediante microscopía confocal. Encontramos que la expresión de FOXO3A se encuentra significativamente aumentada en células T CD4 de animales infectados en FA y FC, particularmente la fracción de FOXO3A nuclear que se trata de la forma activa de dicho factor de transcripción (Fig. 19).



**Figura 19. Incrementada expresión nuclear de FOXO3A en las células T CD4 de ratones infectados.**

Se determinó la expresión de FOXO3A por microscopía confocal en células T CD4 provenientes de bazo de ratones NI e infectados en FA y FC. Se muestra a modo representativo de cada condición, una proyección en Z de la máxima intensidad, evidenciando en azul la tinción nuclear con DAPI y en verde la expresión de FOXO3A. Se realizó la cuantificación total y nuclear de la expresión de FOXO3A. Se tomaron 3 fotografías de cada individuo, con 30-40 células/campo en cada una de ellas, aproximadamente.  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  por ANOVA de una vía ( $n = 3$  ratones por grupo experimental). Se realizó el análisis de Tukey para comparaciones múltiples. Las barras de error representan la media  $\pm$  DS.

En concordancia con el resultado anterior, la expresión de SOD2 evaluada por microscopía confocal, evidenció también un incremento en células T CD4 de animales infectados en FA y FC (Fig. 20A). Adicionalmente, la expresión de SOD2 determinada por ensayos de Western blot, muestran un aumento tanto en la forma dimerizada (SOD2d) como en el monómero (SOD2m) en ambas fases de la infección (Fig. 20B). Estos resultados indican que el eje FOXO3A/SOD2 podría estar activado como mecanismo de control de la acumulación de superóxido mitocondrial. Además, observamos mediante microscopía confocal y ensayos de Western blot, un aumento en la expresión de citocromo c solo en las células T CD4 de animales infectados en FA (Fig. 20A y B). Se ha propuesto que la liberación de citocromo c es un paso clave en la generación de ROSm durante procesos apoptóticos inducido tanto por la vía extrínseca como intrínseca <sup>131</sup>.



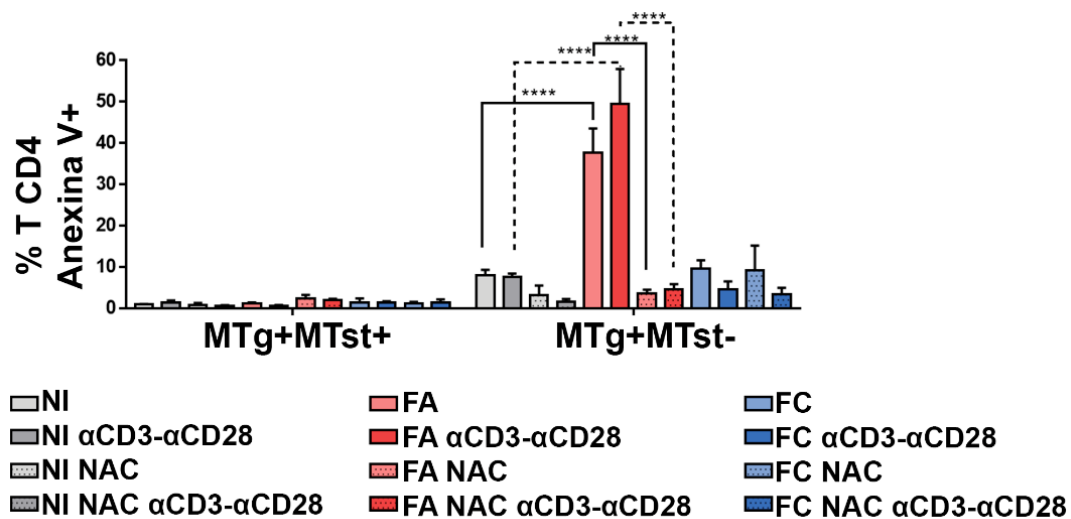
**Figura 20. Incremento en la expresión de SOD2 y citocromo c durante la FA de la infección.**

Se determinó la expresión de la enzima antioxidante mitocondrial SOD2 por microscopía confocal en linfocitos T CD4 de ratones NI, infectados en FA y FC. En conjunto, se midió la expresión de citocromo c. Se muestran como imágenes representativas, proyecciones en Z de la máxima intensidad. Se cuantificó la IFM de cada molécula, mostrándose en azul la tinción nuclear con DAPI, en verde la expresión de SOD2, y en rojo la expresión de citocromo c (A). Se emplearon ensayos de Western blot para evaluar la expresión de SOD2 y citocromo c. SOD2d, dímero; SOD2m, monómero. Se utilizó β-Actina como control de carga para la normalización de los datos. Se muestran ensayos de Western blot representativos para cada proteína evaluada, de 2 individuos por cada grupo experimental (B). Los datos cuantificados son representativos de dos experimentos independientes ( $n = 3/4$  ratones por grupo).  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  por ANOVA de una vía ( $n = 3$  ratones por grupo experimental). Se realizó el análisis de Tukey para comparaciones múltiples. Las barras de error representan la media  $\pm$  DS.

4. La contribución exógena del antioxidante N-acetil cisteína (NAC) previene la apoptosis en células T CD4 de ratones infectados en FA.

#### 4.1 Tratamiento *in vitro* con NAC

Se ha demostrado que el tratamiento con compuestos antioxidantes reestablece la función de células T con alteraciones mitocondriales, tanto en infecciones como en cáncer<sup>106,115</sup>. Por lo tanto, decidimos evaluar si la adición de un antioxidante tiene efecto sobre las células T CD4 de la FA de la infección. Para ello, el antioxidante de elección fue NAC, el cual tiene efecto antioxidante directo e indirecto como precursor del GSH, entre otros<sup>71,72</sup>. Considerando que el destino de las células de animales infectados en FA es la apoptosis, evaluamos si el antioxidante NAC era capaz de prevenir este tipo de muerte. Para ello, cultivamos células T CD4 purificadas de los 3 grupos experimentales durante 48 h en condiciones no estimulantes o con estímulo policlonal, en ausencia o presencia del antioxidante NAC. Luego, evaluamos la apoptosis por citometría de flujo con la estrategia de Anexina V en las poblaciones de células T CD4 con mitocondria normal (MTg<sup>+</sup>MTst<sup>+</sup>) o depolarizada (MTg<sup>+</sup>MTst<sup>-</sup>). En concordancia con lo observado anteriormente, la mayor frecuencia de apoptosis se observa en las células T CD4 con mitocondria depolarizada durante la FA de la infección. Encontramos que el agregado de NAC al cultivo tanto en presencia como ausencia de estimulación previene la apoptosis de las células T CD4 con mitocondria depolarizada de animales infectados en FA (Fig. 21).



**Figura 21. El agregado de NAC a linfocitos T CD4 provenientes de ratones infectados en FA, previene su apoptosis.**

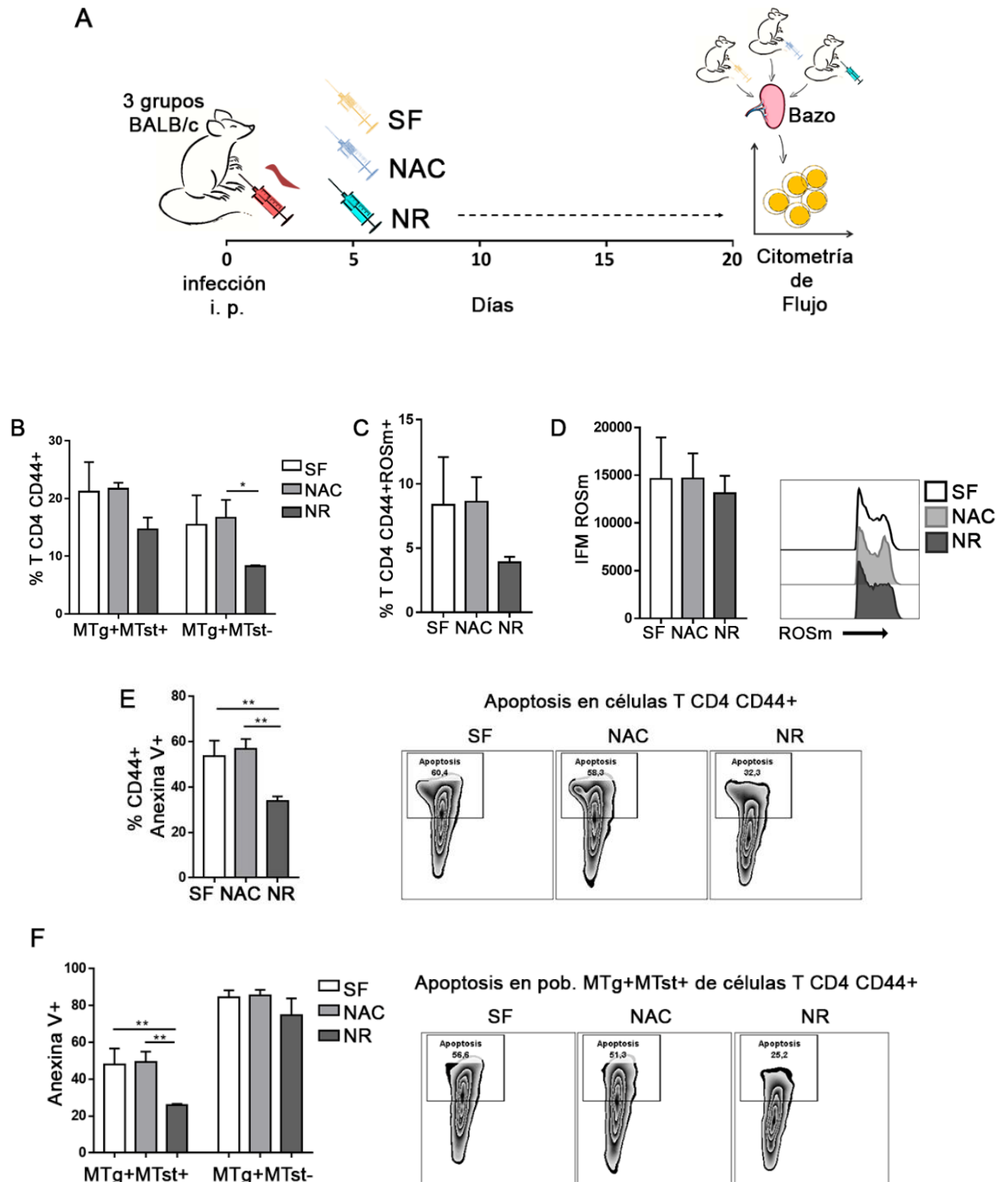
Linfocitos T CD4 provenientes de ratones NI e infectados en FA y FC se cultivaron durante 48 en condiciones estimulantes con anti-CD3 anti-CD28 o sin estímulo, en presencia o ausencia de NAC (10 mM). Posterior al

tiempo de cultivo, las células se marcaron con anexina V y sondas mitocondriales dependiente e independiente del potencial de membrana mitocondrial. Se determinó por citometría de flujo la frecuencia de apoptosis tanto en células T CD4 con mitocondrias normales (MTg<sup>+</sup> MTst<sup>+</sup>) como con mitocondrias depolarizadas (MTg<sup>+</sup> MTst<sup>-</sup>).  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  por ANOVA de dos vías (n = 3 ratones por grupo experimental). Se realizó el análisis de Tukey para comparaciones múltiples. Las barras de error son la media  $\pm$  DS.

#### **4.2 Tratamiento *in vivo* con NAC y Ribósido de Nicotinamida**

Considerando los resultados de la sección anterior, donde se evidenció la prevención de apoptosis en las células T CD4 con mitocondria depolarizada de la FA frente al agregado *in vitro* de NAC, nos propusimos evaluar el efecto de dicho antioxidante *in vivo*. Adicionalmente, teniendo en cuenta que nuestros resultados indican que las células T CD4 durante la FA de la infección presentarían un defecto en el flujo mitofágico (Fig. 11), utilizamos como tratamiento el precursor de la coenzima NAD<sup>+</sup>, Ribósido de Nicotinamida (NR) ya que ha sido reportado que puede estimular la mitofagia<sup>86,132</sup>. Para ello, se infectaron 3 grupos de animales que corresponden al grupo tratado con NAC, el grupo tratado con NR y el grupo control al cual se le administró el vehículo (Solución Fisiológica, SF). Posterior a los 5 d.p.i., se inyectaron los tratamientos intraperitonealmente durante 16 días hasta alcanzar la FA de la infección en nuestro modelo (Fig. 22A). Se evaluaron los parámetros mitocondriales y la producción de ROSm en las células T CD4 obtenidas de los distintos grupos de animales. Si bien estos resultados son preliminares, podemos observar una tendencia a disminuir la frecuencia de células T CD4 con daño mitocondrial en los ratones tratados con NR (Fig. 22B). Adicionalmente, hallamos una tendencia a presentar menor frecuencia de células T CD4 activadas que producen ROSm en el grupo tratado con NR (Fig. 22C), mientras que en el grupo tratado con NAC no se observaron diferencias con respecto al grupo control (SF). Sin embargo, las células ROSm<sup>+</sup> no presentan diferencias en la expresión de ROSm (Fig. 22D). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en la parasitemia.

Considerando los efectos de dichos tratamientos *in vivo* sobre la apoptosis, encontramos una reducción en la frecuencia de linfocitos T CD4 CD44<sup>+</sup> apoptóticos en ratones infectados tratados con NR (Fig. 22E). Por sorpresa, no hallamos diferencia en la frecuencia de apoptosis en células con mitocondria depolarizada, pero se evidencia una disminución de células apoptóticas en la población de células con mitocondrias normales de ratones tratados con NR (Fig. 22F)



**Figura 22. El tratamiento con NR disminuye la frecuencia de células con mitocondria depolarizada y la apoptosis durante la FA de la infección.**

Se realizó el tratamiento *in vivo* mediante inyección intraperitoneal (i.p.) de NAC (150 mg/kg), NR (1000 mg/kg) y vehículo (SF) como control, en animales infectados a partir de los 5 d.p.i., durante 16 días hasta

alcanzar la FA (A). Se determinó por citometría de flujo, la frecuencia de células con mitocondrias normales ( $MTg^+MTst^+$ ) y mitocondrias depolarizadas ( $MTg^+MTst^-$ ) en los tres grupos de animales infectados (B), así como la frecuencia de células T CD4 CD44<sup>+</sup> productoras de ROSm (C) y la IFM de ROSm en dicha población (D). Se muestra un histograma representativo de la IFM de ROSm (D). Se determinó la frecuencia de apoptosis por citometría de flujo mediante la marcación con anexina V. Se cuantificó la proporción de células anexina V<sup>+</sup> dentro de la población T CD4 CD44<sup>+</sup> (E). Además, se evaluó la frecuencia de apoptosis dentro de las poblaciones  $MTg^+MTst^+$  y  $MTg^+MTst^-$  (F). Se muestran gráficos de zebra representativos para cada grupo de animales.  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  por ANOVA de una y dos vías ( $n = 3$  ratones por grupo experimental). Se realizó el análisis de Tukey para comparaciones múltiples. Las barras de error representan la media  $\pm$  DS.

## Conclusiones capítulo III

En este capítulo de resultados se evaluó el impacto de las especies reactivas del oxígeno mitocondriales en la funcionalidad de las células T CD4 durante la infección, así como también, algunos mecanismos antioxidantes presentes en estas células. Nuestros resultados mostraron que durante la FA:

- Las células T CD4 que expresan PD-1 y producen ROSm liberan menos IL-2 y tienen disminuida tasa de proliferación luego de la estimulación policlonal, en comparación con aquellas células que no expresan PD-1 y no producen ROSm.
- Las células T CD4 con depolarización mitocondrial muestran mayor frecuencia de apoptosis.
- Se observó un incremento en la expresión de la vía FOXO3A/SOD2, sistema antioxidante mitocondrial. Sin embargo, la adición de un precursor de GSH *in vitro*, previene la apoptosis de células T CD4 con depolarización mitocondrial.
- El tratamiento de animales infectados con el antioxidante *in vivo* no mostró cambios significativos. Sin embargo, los animales infectados tratados con NR, un inductor de mitofagia, mostraron una tendencia de disminución en la frecuencia de células T CD4 activadas con mitocondrias depolarizadas productoras de ROSm, aunque no se ve modificada la cantidad de ROSm producida por dichas células.

Por tanto, nuestros resultados indican que, aunque se induce la expresión de mecanismos antioxidantes mitocondriales durante la FA de la infección, los mismos pueden no ser suficientes debido a la excesiva acumulación de ROSm que presentan estas células. Esto a su vez conduce a una disminución en la funcionalidad de la mismas y a una mayor susceptibilidad a la apoptosis, la cual puede ser prevenida con el aporte exógeno de NAC, cuyos mecanismos de acción podrían mejorar la disponibilidad de antioxidantes citoplasmáticos. Es posible que estos defectos puedan ser prevenidos *in vivo* con el tratamiento con antioxidantes o inductores de mitofagia, como observamos en nuestros resultados. Sin embargo, ensayos exhaustivos relacionados a la dosis y al momento adecuado para la administración serían necesarios para evitar las alteraciones mitocondriales observadas durante la FA de la infección, permitiendo a su vez, una activación óptima de las células T.



## RESULTADOS IV

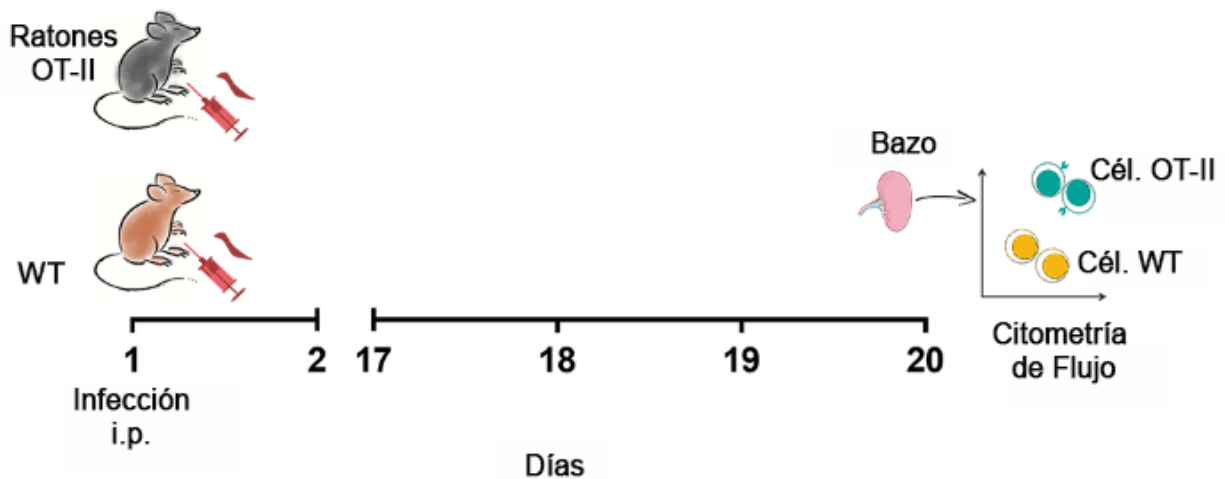
Eventos desencadenantes del daño mitocondrial en las células T CD4 en la infección por *T. cruzi*

## Resultados IV

1. Eventos desencadenantes del daño mitocondrial en las células T CD4 durante la infección por *T. cruzi*.

### 1.1 Evaluación de la producción de ROSm y parámetros mitocondriales en ratones OT-II infectados.

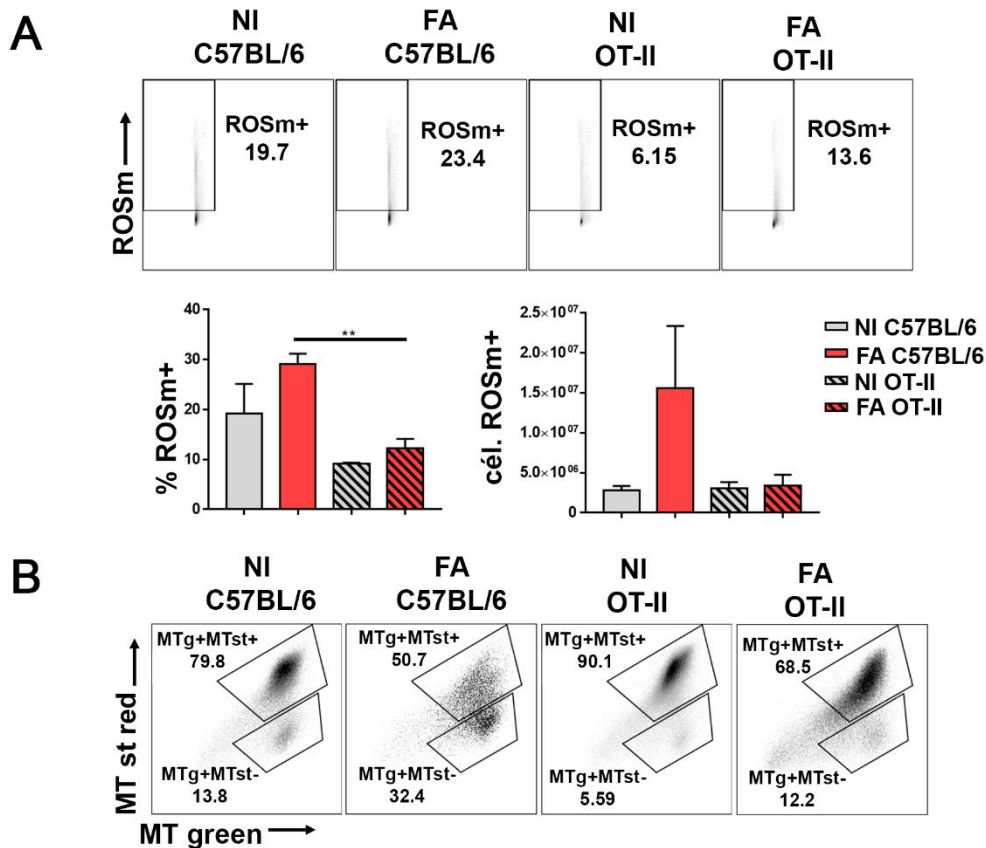
Teniendo en cuenta que las alteraciones ocurren preferentemente en células con fenotipo efector y que el ROSm se produce como consecuencia de la activación a través del TCR<sup>17,32,37</sup>, nos propusimos evaluar si la producción de ROSm y el daño mitocondrial observado durante la FA de la infección en células T CD4 eran dependientes de la señalización a través del TCR. Para responder a ese interrogante, infectamos ratones transgénicos cuyos linfocitos T CD4 poseen receptores de célula T (TCR) específicos para Ovalbúmina (OVA) (ratones OT-II), que se encuentran en un fondo genético de ratón C57BL/6. Siendo que estos ratones poseen casi la totalidad (85-90%) de linfocitos específicos para OVA, la infección por *T. cruzi* no activaría a las células T CD4 de estos ratones. Como grupo control empleamos ratones WT C57BL/6. Con este diseño experimental se buscó comparar el efecto causado por la infección en ambas cepas de ratones. Es decir que, se comparó la producción de ROSm y los parámetros mitocondriales en células T CD4 de ratones WT y OT-II infectados en FA (Fig. 23).

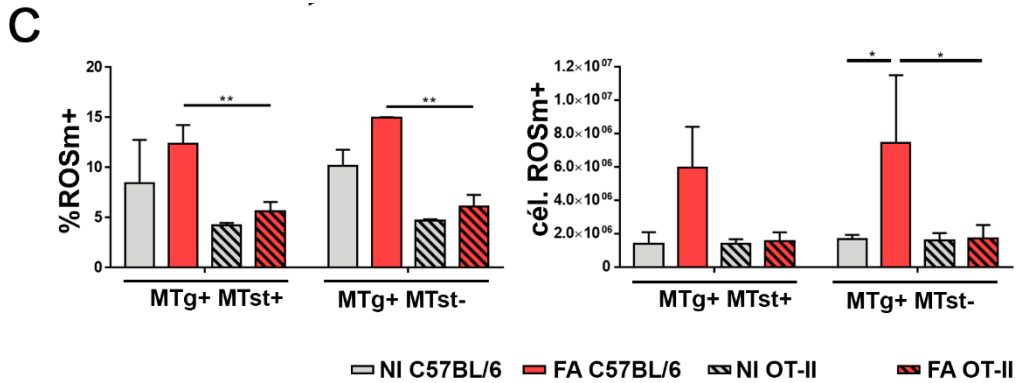


**Figura 23. Esquema experimental de infección en ratones OT-II y C57BL/6.**

Se realizó un esquema de infección i.p. en ratones OT-II y ratones WT C57BL/6. Además, se emplearon como controles ratones NI de cada de ratón. En la FA de la infección, pico de la parasitemia 20 d.p.i., se sacrificaron y se obtuvieron células de bazo de los 4 grupos de animales. Se evaluaron los parámetros de interés por citometría de flujo.

Determinamos la producción de especies reactivas y parámetros mitocondriales en los linfocitos T CD4 de bazo de todos los grupos experimentales. Comparando los animales de FA de cada cepa con su respectivo grupo control (NI), y en concordancia con lo expuesto en capítulos previos, hallamos un incremento en la frecuencia de células T CD4 productoras de ROSm en los animales infectados. Por el contrario, la frecuencia de células T CD4 efectoras productoras de ROSm no se incrementó en los ratones OT-II de FA comparado con sus respectivos controles (Fig. 24A). Correlativamente, las células T CD4 OT-II de ratones infectados evidencian una menor proporción de células con mitocondria dañada (Fig. 24B) y a su vez, una menor frecuencia de células con mitocondria depolarizada productoras de ROSm, en contraste con células T CD4 de FA provenientes de animales WT (Fig. 24C). De este modo, estos resultados indican que la señalización a través del TCR por interacción específica de la célula T CD4 con antígenos de *T. cruzi* es necesaria para derivar en la producción de ROSm y las alteraciones mitocondriales.





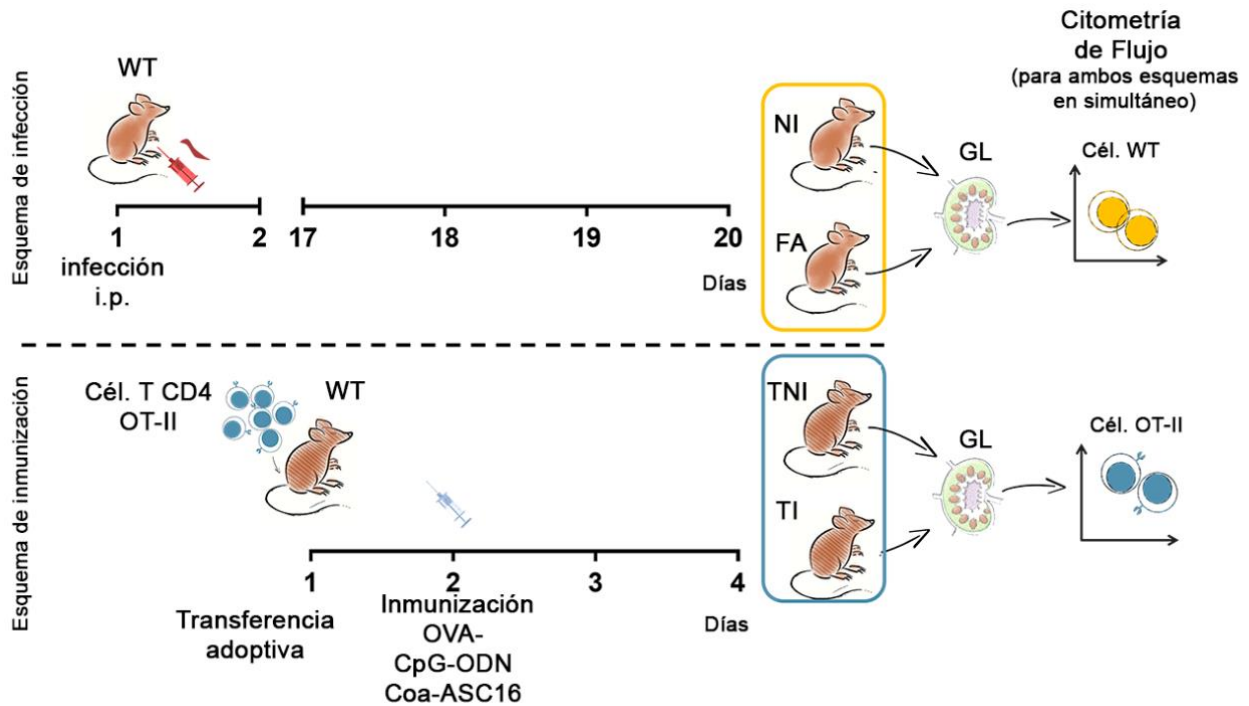
**Figura 24. La señalización a través del TCR es requerida para la producción de ROSm y la generación de daño mitocondrial durante la FA de la infección.**

Se evaluó la frecuencia de células T CD4 productoras de ROSm en ratones WT C57BL/6 y ratones OT-II infectados en FA mediante citometría de flujo utilizando la sonda MitoSOX. Como controles se emplearon animales NI de ambas cepas. Se muestran gráficos de puntos representativos para cada condición, cuya cuantificación en el gráfico de barras muestra la frecuencia relativa y absoluta de células T CD4 productoras de ROSm en animales WT y OT-II (A). Los gráficos de puntos representan las poblaciones definidas por citometría de flujo empleando las sondas MTg y MT status red, donde se muestran las frecuencias de células con mitocondrias normales (MTg<sup>+</sup>MTst<sup>+</sup>) y mitocondrias dañadas (MTg<sup>+</sup>MTst<sup>-</sup>) en ratones NI e infectados en FA de las cepas WT y OT-II (B). Dentro de las poblaciones celulares MTg<sup>+</sup>MTst<sup>+</sup> y MTg<sup>+</sup>MTst<sup>-</sup>, se evaluó la frecuencia de células productoras de ROSm para cada grupo de animales (C). Los datos cuantificados son representativos de dos experimentos independientes (n = 3/4 ratones por grupo). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001 por ANOVA de una y dos vías. Se realizó el análisis de Tukey para comparaciones múltiples. Las barras de error representan la media ± DS.

## 1.2 Evaluación de la producción de ROSm y parámetros mitocondriales en el modelo de infección en comparación con un modelo de inmunización.

Los datos anteriores nos dan la certeza de que es necesario el reconocimiento antigénico a través del TCR para inducir los eventos que observamos en la FA de la infección. Sin embargo, nos preguntamos si las alteraciones observadas en células T CD4 de ratones en FA de la infección estarían relacionadas, no sólo a la señalización a través del TCR, sino también al contexto de la infección. Para contestar este interrogante, realizamos un modelo de inmunización para compararlo con nuestro modelo de infección de FA. Para ello, células T CD4 purificadas de bazo de ratones OT-II fueron marcadas con colorante para proliferación Dye-eFluor 670 y transferidas a un ratón C57BL/6 WT seguido de una inmunización a las 24 h con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16<sup>133</sup>. Luego se determinaron marcadores de activación, ROSm, parámetros mitocondriales y muerte por apoptosis en células obtenidas de ganglios linfáticos inguinales de animales transferidos e inmunizados (TI) en

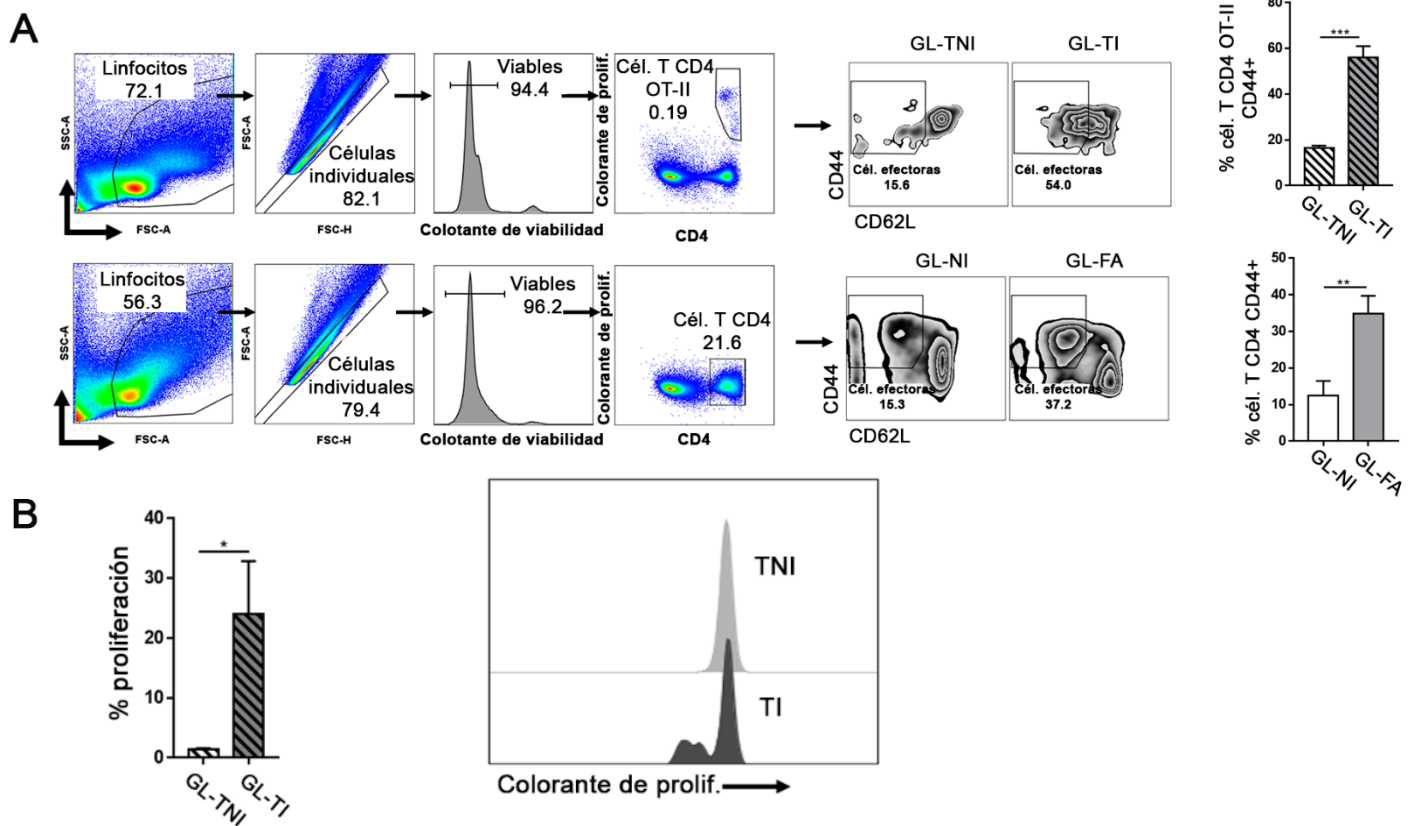
comparación con los transferidos no inmunizados (TNI). Además, los ganglios linfáticos de animales NI e infectados en FA se procesaron en paralelo (Fig. 25).



**Figura 25. Esquema experimental diseñado para comparar los eventos desencadenados por activación de células T CD4 en la FA de la infección, con una inmunización.**

Se infectaron ratones C57BL/6 WT para evaluar células T CD4 en la FA de la infección. Se emplearon ratones WT NI como controles. 4 días previos a que se alcance la FA, se realizó una purificación de células T CD4 de bazo de ratones OT-II. Dichas células se marcaron con un colorante para proliferación Dye-eFluor 670 y fueron transferidas a ratones C57BL/6 WT. Un día posterior a la transferencia adoptiva, se procedió a la inmunización con OVA-CpG-ODN Coa-ASC16 (ratones transferidos inmunizados, TI). Como controles se emplearon ratones transferidos con las células T CD4 de bazo de ratones OT-II no inmunizados (TNI). Al día 4 posterior a la transferencia (coincidente con el día en que los ratones infectados alcanzaron la FA), se extrajeron ganglios linfáticos (GL) inguinales de los ratones NI, FA, TNI y TI para evaluar por citometría de flujo los parámetros de interés.

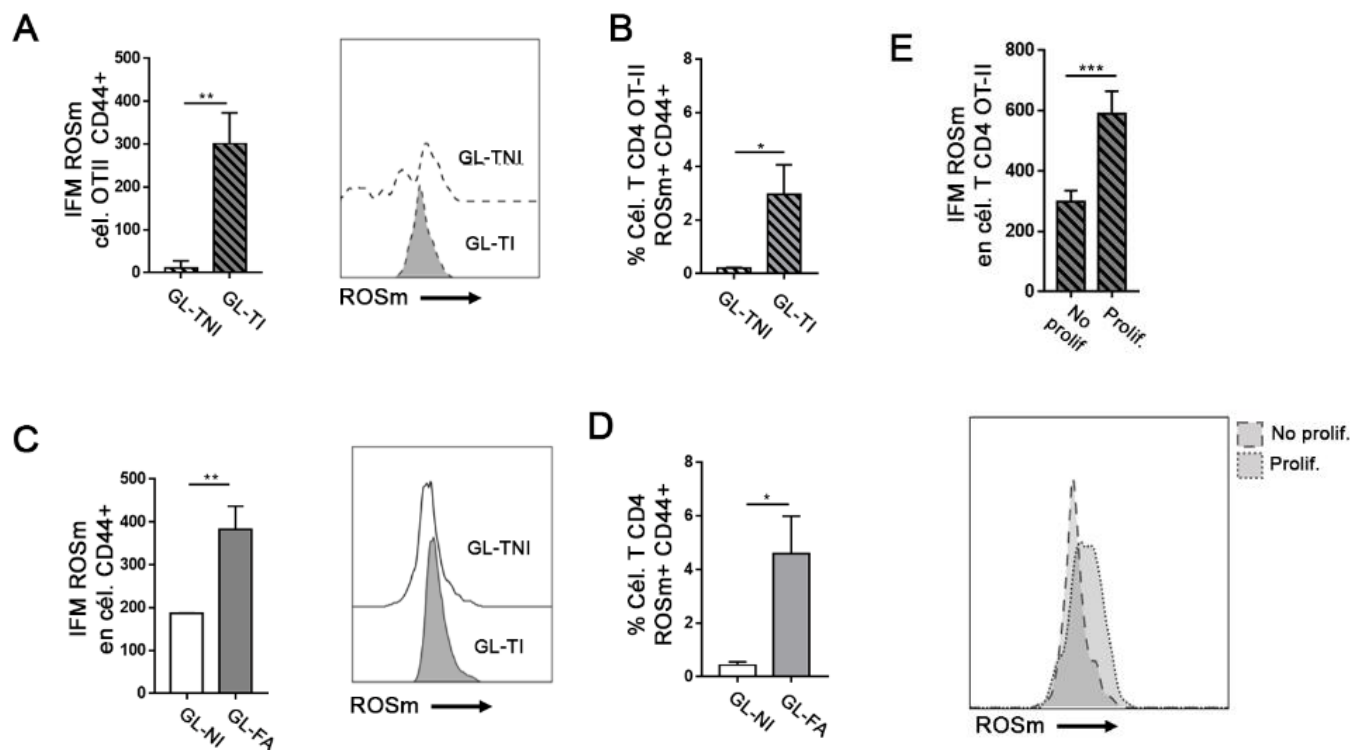
Como medida inicial, corroboramos la activación de las células T CD4 OT-II de ratones TI, así como de ratones infectados en FA mediante la determinación de la expresión de la molécula CD44 (Fig. 26A). Adicionalmente, observamos que las células OT-II de ratones TI evidenciaron proliferación, evaluada a través de la dilución del colorante, lo que demuestra una activación productiva como efecto de la inmunización (Fig. 26B).



**Figura 26. Activación de células T CD4 en animales inmunizados e infectados.**

Para los análisis de citometría de flujo, se detalla la estrategia de ventanas o “gates” que se emplearon. La secuencia de selecciones se detalla en los gráficos de puntos e histogramas, representativo de los animales transferidos e inmunizados (TI) así como para los infectados (FA). Adicionalmente, se evidenció la activación de las poblaciones de células T CD4 OT-II en los animales transferidos y T CD4 de animales infectados mediante la determinación de la frecuencia de células CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> (células efectoras). Se muestran gráficos de representativos para cada grupo de animales. Los gráficos de barras muestran la cuantificación de la frecuencia relativa de células activadas (A). Se corroboró la activación de células OT-II transferidas evaluando la proliferación con la estrategia de dilución del colorante por citometría de flujo. Se emplearon como controles, animales TNI (B).

A continuación, evaluamos la producción de ROSm dentro de la población de células T CD4 OT-II CD44<sup>+</sup> y T CD4 WT CD44<sup>+</sup>, es decir, células activadas ya sea por la inmunización o por la infección, respectivamente. Se observó un incremento en la producción de ROSm (Fig. 27A y C) y en la frecuencia de células productoras de ROSm (Fig. 27B y D) tanto en ratones infectados en FA, así como en ratones TI. Para corroborar que la producción de ROSm en los ratones TI es producto de la activación por la inmunización con OVA, comparamos la producción de ROSm entre las poblaciones de células no proliferadas y proliferadas de ratones TI, evidenciándose un incremento en la producción de ROSm en estas últimas (Fig. 27E).

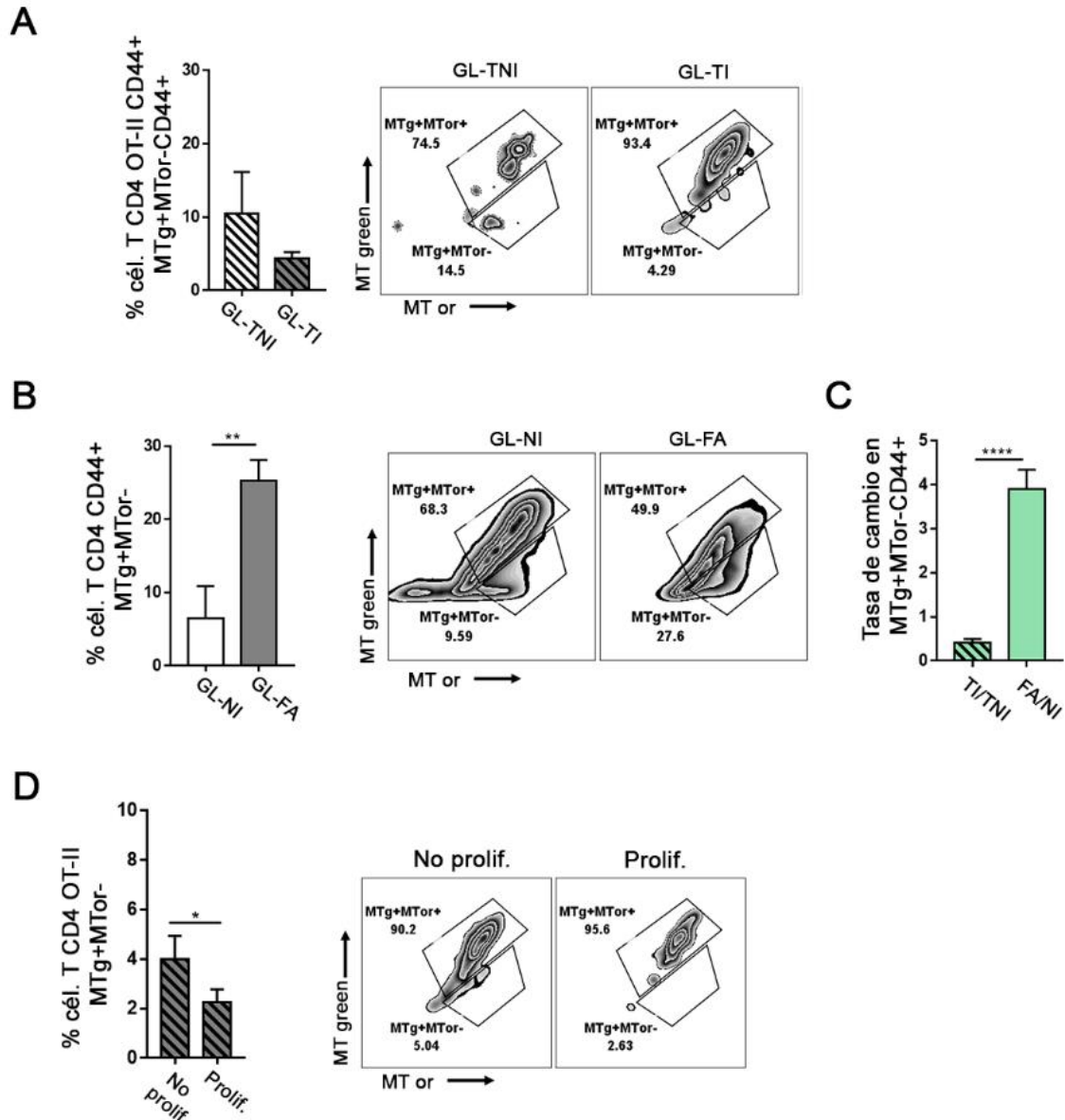


**Figura 27. Las células T CD4 OT-II de animales TI incrementan la expresión de ROSm y la frecuencia de células productoras de ROSm, al igual que las células T CD4 de ratones infectados en FA.**

Se evaluó mediante citometría de flujo la producción de ROSm (A y C) y la frecuencia de células productoras de ROSm (B y D) en células T CD4 OT-II CD44<sup>+</sup> de animales TI y TNI, así como en células T CD4 CD44<sup>+</sup> de ratones NI e infectados en FA. Se muestran histogramas representativos de la IFM de ROSm para todos los grupos experimentales. Se determinó la producción de ROSm en células T CD4 OT-II no proliferadas y proliferadas de animales TI, graficadas representativamente en un histograma (E).  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  por ANOVA de una vía ( $n = 3/4$  ratones por grupo experimental). Se realizó el análisis de Tukey para comparaciones múltiples. Las barras de error representan la media  $\pm$  DS.

Luego evaluamos los parámetros mitocondriales en los dos modelos experimentales descritos en este capítulo. Observamos un incremento en la frecuencia de células con mitocondria depolarizada solo en células T CD4 activadas de ratones en FA de la infección, y no así en células T CD4 OT-II activadas de los animales TI (Fig. 28A y B). Al calcular la tasa de cambio en las frecuencias de células con depolarización mitocondrial, encontramos un aumento significativo en la infección aguda, comparado con la inmunización (Fig. 28C). Adicionalmente, es importante resaltar que a pesar de haberse hallado un incremento en la producción de ROSm en las células OT-II proliferadas en

comparación con aquellas no proliferadas en los ratones TI (Fig. 27E), dichas células no exhibieron incremento en la depolarización mitocondrial (Fig. 28D).



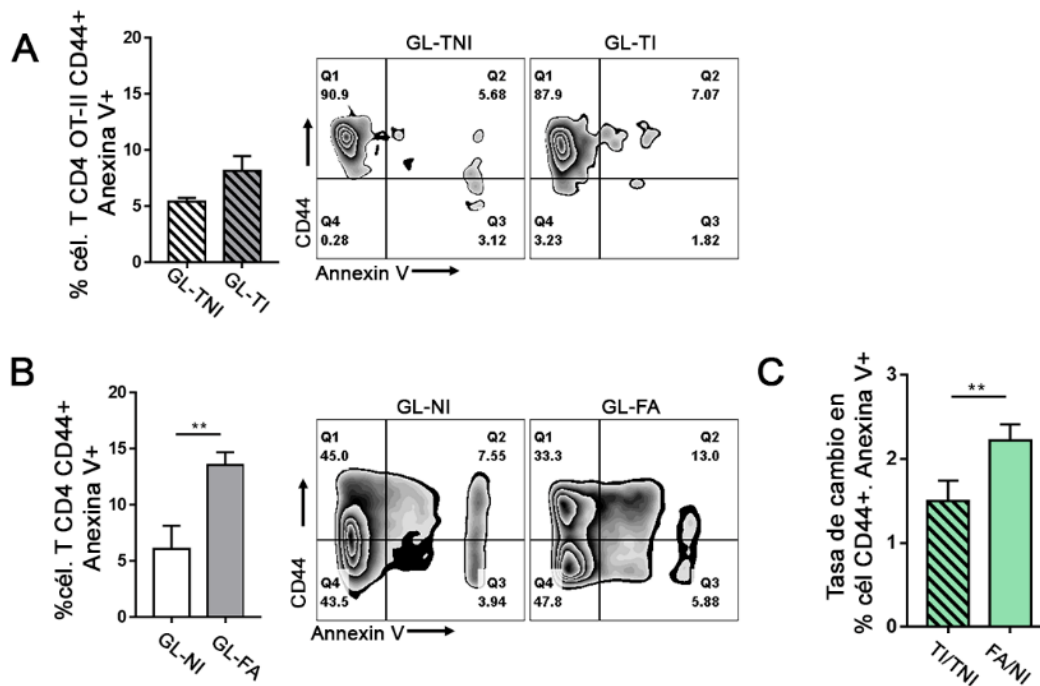
**Figura 28. Las células T CD4 OT-II CD44+ de animales TI no presentan daño mitocondrial, a pesar de tener un incremento en la producción de ROSm.**

Se evaluaron parámetros mitocondriales por citometría de flujo en células T CD4 OT-II CD44+ en ratones TI en contraste con TNI. Frecuencia de células con mitocondrias normales (MTg+MTst+) y con mitocondrias dañadas (MTg+MTst-) para los grupos de animales transferidos con células T CD4 OT-II. Se muestra un gráfico de zebra representativo para cada grupo (A). Paralelamente, se cuantificó la frecuencia de células T CD4 CD44+ con mitocondrias normales (MTg+Mts+) o dañadas (MTg+MTst-) en ratones NI e infectados en FA. Se muestra un gráfico de zebra representativo para cada grupo (B). Se estimó la tasa de cambio en la frecuencia de células T CD4 activadas con daño mitocondrial (MTg+MTst-) provenientes de ratones TI e infectados en FA (C). La frecuencia de células con mitocondrias normales o dañadas se cuantificó en las células T CD4 OT-II no proliferadas y proliferadas provenientes del grupo TI. Se muestra un gráfico de zebra representativo para cada grupo (D). p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001 por ANOVA de una vía (n = 3/4 ratones por grupo



experimental). Se realizó el análisis de Tukey para comparaciones múltiples. Las barras de error representan la media  $\pm$  DS.

Teniendo en cuenta que en los resultados presentados en capítulos previos demostramos que las células T CD4 de animales en la FA de la infección presentan mayor susceptibilidad a la apoptosis, evaluamos la frecuencia de apoptosis en células activadas tanto por la inmunización como por la infección. Encontramos que en células T CD4 OT-II CD44<sup>+</sup> de animales TI no hay un aumento en la frecuencia de células apoptóticas (Fig. 29A), a diferencia de las células T CD4 CD44<sup>+</sup> de ratones infectados en FA, donde se observa un aumento significativo con respecto a los NI (Fig. 29B). Cuando comparamos la tasa de incremento de apoptosis entre el grupo de ratones transferidos (TI/TNI) y los ratones infectados (FA/NI), es posible visualizar que ésta solo incrementa por la infección y no por la inmunización (Fig. 29C).



**Figura 29. La frecuencia de células T CD4 CD44<sup>+</sup> apoptóticas aumenta significativamente durante la FA de la infección y no así en el modelo de inmunización.**

Se evaluó la frecuencia de células apoptóticas por citometría de flujo empleando Anexina V. Se muestran gráficos de zebra representativos para cada grupo de animales en los cuales se observa la frecuencia de células T CD4 OT-II CD44<sup>+</sup> en apoptosis (Anexina V<sup>+</sup>), tanto en ratones TNI como TI. Los gráficos de barras muestran la cuantificación de la frecuencia relativa de células T CD4 OT-II CD44<sup>+</sup> apoptóticas (A). También se analizó el porcentaje de apoptosis en células T CD4 CD44<sup>+</sup> de animales NI e infectados en FA. Se muestran gráficos de zebra representativos para cada grupo y la cuantificación de la frecuencia relativa de células T CD4 CD44<sup>+</sup> Annexina V<sup>+</sup> (B). Complementariamente, se realizó una relación o cociente para animales transferidos (TI/TNI) y para animales infectados en FA y NI (FA/NI) de modo tal que se pueda evidenciar la tasa de incremento de apoptosis entre grupos (C).  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  por ANOVA de una vía ( $n = 3/4$  ratones por grupo experimental). Se realizó el análisis de Tukey para comparaciones múltiples. Las barras de error representan la media  $\pm$  DS.

## Conclusiones capítulo IV

Este último capítulo de resultados se enfoca en dilucidar los eventos que desencadenan el daño mitocondrial y si los mismos están intrínsecamente relacionados a la infección. Durante el desarrollo del mismo, hemos podido determinar que:

- La producción de ROSm y la generación de daño mitocondrial en las células T CD4 durante la FA de la infección son dependientes de la señalización a través del TCR, ya que estos eventos no se observan en ratones OT-II infectados.
- Tanto las células T CD4 activadas durante la FA de la infección como las OT-II activadas luego de la inmunización producen ROSm. Sin embargo, solo las células T CD4 activadas por la infección presentan alteraciones mitocondriales y muestran una incrementada frecuencia de apoptosis. Más aún, las células OT-II activadas luego de la inmunización con capacidad proliferativa muestran mayores niveles de ROSm que aquellas que no proliferan; sin embargo, no muestran alteraciones mitocondriales.

A partir de estos resultados hipotetizamos que es posible que el tiempo de exposición al antígeno, así como las influencias de microambiente dicten el fenotipo observado en las células T CD4 durante la infección por *T. cruzi*. Por el contrario, en el contexto de la activación de células T durante el modelo de inmunización, puede presentarse una cantidad limitada de antígeno durante un período de tiempo finito. Esto podría llevar a que se observe una producción limitada de ROSm sin que se produzcan efectos deletéreos. Por lo tanto, nuestros resultados indican que el fenotipo observado está relacionado con el contexto de la infección por *T. cruzi*.

## DISCUSIÓN

A pesar de décadas de extensa caracterización de la respuesta inmune frente a la infección por *Trypanosoma cruzi*, poco se conoce sobre el modo en el que la reprogramación metabólica contribuye al desarrollo de respuestas inmunes disfuncionales en la enfermedad de Chagas.

Una respuesta inmune adaptativa robusta requiere una fase de proliferación acelerada, seguida de la polarización de las células T en subpoblaciones funcionalmente relevantes. Ambos procesos están asociados con un aumento dramático en las demandas bioenergéticas, biosintéticas y redox, las cuales se satisfacen mediante la reprogramación de las vías metabólicas centrales que generan tanto energía como precursores biosintéticos mediante la catabolización y oxidación de nutrientes en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sup>53,134</sup>. Como consecuencia del metabolismo oxidativo, se generan ROSm, que están estrechamente controlados por antioxidantes y juegan un papel importante en la regulación de las funciones de las células T<sup>37,52</sup>. Alguna falla en la inducción de transiciones metabólicas puede afectar la actividad inmunológica. De hecho, una remodelación metabólica incorrecta contribuye a la degradación de una inmunidad protectora en numerosas enfermedades, incluidas las infecciones crónicas, enfermedades autoinmunes y cáncer<sup>107,108,115,135–137</sup>.

Considerando que una expresión deficiente de GLUT1 en membrana plasmática, alteraciones en el transporte mitocondrial de electrones, disponibilidad insuficiente de nutrientes, o una inhibición metabólica son eventos capaces de impedir la proliferación, la activación de células T y su función efectora<sup>134,138</sup>, el objetivo de nuestro trabajo consistió en determinar si la infección por *T. cruzi* está relacionada con alteraciones metabólicas que afectan la función efectora en células T CD4. Nuestros resultados muestran que, durante la FA de la infección, las células T CD4 captan más glucosa, posiblemente a través del incremento en la expresión del transportador GLUT1, posterior a un estímulo policlonal. Más precisamente, estas células revelaron un metabolismo exacerbado, con un aumento en los niveles basales de glucólisis y OXPHOS (*Fig. 1-3*). Es necesario tener en cuenta que los cambios en OCR y ECAR observados en las células T CD4 durante la FA de la infección pueden estar relacionados con las diferentes subpoblaciones presentes en la población total de células T CD4. Pero, si bien se ha demostrado que los diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4 utilizan diferentes vías como respuesta a la señalización a través del TCR, en conjunto con señales del microambiente y de acuerdo a la disponibilidad de metabolitos<sup>29,139</sup>, se ha evidenciado que todos los tipos de células emplean en distintas medidas, todas las vías metabólicas<sup>138,139</sup>. En este sentido,

aunque es de amplio conocimiento que las células T muestran una marcada inducción de la glucólisis después de la estimulación, también se demostró que hay un aumento considerable en la respiración mitocondrial<sup>23,54</sup>. Es decir que, durante la activación prolongada, las células T CD4 obtienen energía predominantemente de la glucólisis, pero también se someten a una extensa remodelación mitocondrial, lo que resulta en un aumento en la actividad de dicha organela<sup>140</sup>. Por lo tanto, es posible que la fuerte respuesta inmune evocada durante la FA de la infección active ambas vías metabólicas, como se observa en la condición basal. En este sentido, se ha reportado que en linfocitos T CD4 de ratones propensos a desarrollar lupus y de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) se encuentran elevados tanto la vía glucolítica como el metabolismo oxidativo mitocondrial, en comparación con controles sanos y sin enfermedad autoinmune, respectivamente<sup>141</sup>.

Además, durante la FA de la infección, las células T CD4 exhibieron un aumento de la producción de ROSm (*Fig. 4*), una acumulación de mitocondrias disfuncionales caracterizadas por una disminución del PMM (*Fig. 8*), y ciertas alteraciones estructurales en dicha organela (*Fig. 5 y 6*), con una indudable correlación entre la producción de ROSm y depolarización mitocondrial (*Fig. 6*). En concordancia, reportes sobre pacientes con LES indican que hay un aumento del estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y apoptosis en la población de linfocitos <sup>142,143</sup>.

Considerando nuestros resultados, estimamos que el metabolismo exacerbado en células T CD4 durante la FA de la infección, conduce al aumento en los niveles de ROSm. De hecho, evaluando la heterogeneidad de la población T CD4 desde otro aspecto, es posible pensar que el metabolismo de estas células en los inicios de la activación sea altamente oxidativo, pudiendo incrementarse la producción de ROSm, y ello conducir a una depolarización de la membrana mitocondrial. Luego, como consecuencia del daño mitocondrial, la obtención de energía podría ser compensada mediante un incremento en la glucólisis, y de este modo los perfiles metabólicos obtenidos se podrían interpretar como una mezcla de las distintas fases de activación en las que pueden hallarse las células T CD4 frente a la infección.

Adicionalmente, observamos una mayor fuga de protones y expresión de UCP3 (*Fig. 3*) lo que nos conduce a pensar de forma vincular sobre ambos eventos, en una relación de causalidad. En general, el superóxido producido de forma endógena activa la fuga de protones de una manera dependiente de UCP2 o UCP3<sup>144</sup>. De hecho, macrófagos de ratones deficientes en UCP2 evidenciaron un

incremento en el superóxido o ROSm<sup>145</sup>. Se ha propuesto que la producción de superóxido en la ETC mitocondrial se debe a una alta diferencia del PMM, y dicho incremento en las ROSm podría inducir una fuga de protones dependiente de UCP, disminuyendo así el PMM y, en consecuencia, la producción de superóxido en una retroalimentación autorreguladora<sup>35</sup>. Nuestro estudio muestra que las células T CD4 presentan una hiperpolarización poco tiempo después de la infección (*Fig. 7*), pudiéndose interpretar que la producción de ROSm ocurre a tiempos tempranos durante la activación, y se acumulan hasta alcanzar altos niveles que correlacionan con la depolarización mitocondrial observada hacia la FA de la infección (*Fig. 7*). Teniendo en cuenta el frecuente daño mitocondrial evidenciado en la FA, especulamos que la fuga de protones mediante la expresión de UCP3 puede resultar insuficiente para controlar la producción de superóxido en estas células.

Al caracterizar el fenotipo de las células T CD4 provenientes de ratones infectados en FA, observamos que las células T CD4 con mayor producción de ROSm son efectoras (*Fig. 12*) y expresan marcadores CD11a y CD49d (*Fig. 13*), los cuales se han utilizado previamente para identificar en ratones, células T CD4 específicas de antígeno contra patógenos virales y protozoarios<sup>127</sup>.

Recientemente, se determinó que la estimulación de células T mediada por el TCR, coordinada con el estrés metabólico intra-tumoral, promueven la disfunción mitocondrial con defectos en la fosforilación oxidativa y un aumento en la depolarización mitocondrial<sup>110</sup>. Es decir, que la señalización inmunológica y el estrés metabólico contribuyen directamente a la regulación del destino de la célula T y su función en el microambiente tumoral, siendo la mitocondria el centro que orquesta todos estos procesos moleculares<sup>110,146,147</sup>.

Se ha evidenciado que durante la activación continua a través del TCR y la señalización mediada por citoquinas, las células T adquieren una reducida función efectora y un incremento en la expresión de receptores inhibitorios como PD-1. Una vez que las células T se vuelven exhaustas, la alta expresión de PD-1 promueve cambios en la programación metabólica y en la dinámica mitocondrial<sup>107</sup>. La señalización a través de PD-1 en células T genera mitocondrias con menor número de crestas mitocondriales y con menor longitud<sup>148,35-37</sup>, además promueve la acumulación de mitocondrias depolarizadas y la supresión del "fitness" mitocondrial<sup>110</sup>. Adicionalmente, la señal a través de PD-1 puede suprimir la glucólisis, pero también compromete la OXPHOS en células T CD8 e incrementa la FAO y la capacidad respiratoria de reserva en células T efectoras<sup>149</sup>.

Reportes previos han demostrado que infecciones crónicas podría conducir a una disfunción mitocondrial en las células T<sup>135,150,151</sup>. Durante la infección crónica por LCMV, se evidenció depolarización mitocondrial en células T CD8 específicas con expresión de CD44 y PD-1. Las células T CD8 con mitocondrias depolarizadas mostraron un aumento de ROSm, siendo de esta forma, más susceptibles a la apoptosis<sup>107</sup>. Además, demostraron que la frecuencia de células T CD8 específicas con mitocondrias depolarizadas era reducida en las células que no expresaban PD-1 y, concomitantemente, estas células mejoraron su perfil bioenergético<sup>107</sup>. Otro estudio reveló que durante la infección con *Mycobacterium tuberculosis*, se deteriora el metabolismo mitocondrial en células T CD8 totales y específicas, lo que resulta en una mayor dependencia de la glucólisis que potencia la producción de citoquinas inflamatorias<sup>108</sup>. Estos autores demostraron que, con el tiempo, las células T CD8 que expresan CD44 desarrollan una disfunción mitocondrial caracterizada por la producción de ROSm, pérdida del PMM, coincidente con un aumento en la expresión de receptores inhibitorios<sup>108</sup>. Además, recientemente se observó que la estimulación antigénica crónica de linfocitos T CD8 induce una disfunción redox que promueve un fenotipo de agotamiento terminal. Estas células acumulan altos niveles celulares y mitocondriales de ROS en comparación con linfocitos T activados, expandidos en ausencia de estimulación crónica a través del TCR<sup>146</sup>. Se ha reportado que el TCR y las señales a través de PD-1 contribuyen a la acumulación de mitocondrias depolarizadas en linfocitos T CD8 infiltrantes de tumores (sus siglas del inglés, TIL), revelando un aumento en la señalización de p53<sup>110</sup>. Estos autores también demostraron que los TIL de ratones PD-1 KO contenían una población más pequeña de células con mitocondrias depolarizadas<sup>110</sup>. Nuestros resultados, que están en concordancia con estos reportes, mostraron que una alta proporción de células T CD4 de ratones infectados en FA expresan CD44 y PD-1, presentan alteraciones mitocondriales, y producen ROSm (*Fig. 16*). Por lo tanto, esto sugiere que las alteraciones mitocondriales podrían desencadenarse por la activación antígeno-específica y regularse por la expresión de receptores inhibitorios. En concordancia con esto, demostramos que células T CD4 provenientes de ratones OT-II infectados producen menos ROSm y presentan una reducida frecuencia de células con alteraciones mitocondriales durante la FA de infección (*Fig. 24*). Además, en un modelo de inmunización evidenciamos que, aunque las células OT-II de los ratones transferidos e inmunizados mostraron activación, proliferación y producción de ROSm, no presentaron incremento en la frecuencia de células con depolarización mitocondrial ni apoptosis (*Fig. 27-29*). Entonces, es posible que el tiempo de exposición al antígeno y la intensidad de interacción con el mismo, así como las influencias ambientales, dicten el fenotipo observado en

células T CD4 durante la FA de la infección por *T. cruzi*. Por el contrario, en el contexto de una activación T nominal como en el modelo de inmunización, una cantidad limitada del antígeno es presentada durante un período de tiempo finito. Entonces, esto podría conducir a una producción limitada de ROSm sin ningún daño ni efectos perjudiciales. Además, los resultados mostrados en capítulos anteriores referidos a la producción de ROSm y depolarización mitocondrial en los linfocitos T CD4 durante la FA de la infección, fueron observados tanto en bazo como en ganglios de ratones BALB/c y C57BL/6, indicando que este efecto producido por la infección es independiente del órgano linfático y la cepa de animal empleada.

De acuerdo con nuestros resultados, durante la FA de la infección, las células T CD4 con alteraciones mitocondriales son menos funcionales y más sensibles a la apoptosis (*Fig. 17 y 18*). Se ha evidenciado que durante las infecciones parasitarias la apoptosis puede ser provocada por antígenos, factores secretados y/o liberados por patógenos, infección crónica e intensa activación celular<sup>98</sup>. Más específicamente, la apoptosis de células T ocurre durante la infección humana y experimental con *T. cruzi*<sup>152</sup>. Sin embargo, nuestra investigación es la primera en demostrar que las alteraciones mitocondriales y metabólicas estarían relacionadas con la apoptosis de linfocitos T CD4 durante la FA de la infección.

Por otra parte, referido a la dinámica mitocondrial, se ha propuesto que la fisión mitocondrial y la remodelación de crestas facilitan la liberación de proteínas pro-apoptóticas, tales como el citocromo c, desde las crestas mitocondriales al citosol para iniciar la cascada apoptótica irreversible<sup>59</sup>. Si bien, está ampliamente demostrado que la proteína OPA1 participa en la fusión mitocondrial<sup>119,153</sup>, la forma corta de la proteína, S-OPA1, tiene un rol esencial en el proceso de remodelación de crestas y fusión cuando es escindida constitutivamente por la enzima Yme1L (metaloproteasa dependiente de ATP)<sup>60,154</sup>. Se ha demostrado que cuando se pierde el PMM, OPA1 es clivada por la proteasa OMA (metaloproteasa de zinc en superposición con proteasa m-AAA), además de Yme1L, a la isoforma corta S-OPA1 la cual es liberada, causando que la red mitocondrial colapse en una población fragmentada de mitocondrias, constituyendo un mecanismo principal de participación de las mitocondrias en la respuesta celular al estrés<sup>61,155,156</sup>. Analizados en forma conjunta, estos hallazgos sugieren que el control de OMA1 en la escisión de OPA1 tiene un papel importante en la modulación de la apoptosis<sup>61</sup>. La liberación mitocondrial de S-OPA1 facilita la liberación del citocromo c. La pérdida resultante de OPA1 como consecuencia de su liberación, inhibe la fusión mitocondrial, promoviendo así la característica fragmentación mitocondrial

observada durante la muerte celular programada<sup>157</sup>. De hecho, la supresión de la actividad de OMA1 impide fuertemente la liberación de citocromo c en el citosol frente a estímulos apoptóticos externos<sup>59</sup>. Considerando estos reportes, podríamos establecer un vínculo entre la expresión de OPA1 y la apoptosis que evidenciamos en células T CD4 en la FA de la infección. Si bien observamos un incremento en la expresión de OPA1 (*Fig. 10*), cuando analizamos las mitocondrias cualitativamente observamos estructuras puntiformes, diferentes a las cadenas mitocondriales que presentan las células T CD4 de animales NI (*Fig. 9*). Nuestros ensayos no permitieron determinar si se trata de la forma L-OPA1 o S-OPA1. Sin embargo, no hay evidencia de mitocondrias fusionadas, así como tampoco encontramos un aumento en la expresión de Mfn1 (*Fig. 10*), otra de las proteínas involucradas en la fusión. Por lo tanto, podríamos especular que se trata de un incremento en la forma S-OPA1 generada como consecuencia de la depolarización mitocondrial observada en células T CD4 durante la FA. Adicionalmente, sería esencial determinar la expresión de Drp1 y la localización sub-celular, tanto de OPA1 como del citocromo c para acercarnos a un mejor entendimiento en la secuencia de sucesos que conduce a la apoptosis de estas células.

Considerando otros procesos involucrados en la dinámica mitocondrial, se sabe que la autofagia se activa en respuesta al estrés oxidativo para proteger a las células de la apoptosis. Para prevenir la muerte celular, la mitofagia como vía autofágica selectiva, puede limitar la continua producción de ROSm mediante el recambio de mitocondrias, evitando así la acumulación de mitocondrias disfuncionales<sup>158</sup>.

Algunas evidencias han sugerido que las fases de expansión, contracción y generación de memoria pueden verse afectadas por la producción excesiva de ROS, la inhibición de la autofagia, la mitofagia y la generación temprana de apoptosis<sup>159-163</sup>. También se ha demostrado que el exceso de ROS puede impedir la respuesta de las células T a las infecciones virales, lo que destaca la necesidad de un control estricto de la producción y desintoxicación de ROS<sup>159,164</sup>. Durante la infección por el virus influenza, se observó una cantidad significativa de acumulación de ROS en las células T CD8 efectoras con un bloqueo en el flujo autofágico, y este aumento de ROS se asoció con una mayor actividad de p53. Además, se demostró que una pérdida profunda en la supervivencia de las células T efectoras conduce a una reducción severa en la generación de células T de memoria a largo plazo en varios tejidos linfoides<sup>160</sup>. Asimismo, se evidenció que la muerte celular observada de las células T con bloqueo en el flujo autofágico se debe a una acumulación de ROS, ya que el tratamiento con el antioxidante NAC es capaz de revertir la muerte celular y la activación de p53<sup>160</sup>. Del mismo modo,



se ha reportado que las células T CD4 de memoria dependen de la autofagia para su supervivencia con el fin de regular los efectos tóxicos de la actividad mitocondrial<sup>165</sup>.

Altos niveles celulares de ROS han sido vinculados con un reducido flujo autofágico en fibroblastos humanos, que se reestablece cuando son tratadas con el antioxidante NAC<sup>166</sup>. Recientemente, se reportó que la mitofagia defectuosa en linfocitos T CD8 infiltrantes de tumor resulta en una acumulación de mitocondrias depolarizadas, lo que conduce al desarrollo de células T terminalmente exhaustas<sup>110</sup>. Considerando dichos reportes, y teniendo en cuenta la alta producción de ROSm que hallamos en los linfocitos T CD4 durante la FA de la infección, podríamos interpretar de nuestros resultados, que la acumulación de mitocondrias depolarizadas en los linfocitos T CD4 podría deberse a un defecto en la generación del mitofagolisosoma (*Fig. 11*).

Un estudio en células T CD8 específicas de individuos infectados crónicamente con hepatitis B evidenció marcadas alteraciones mitocondriales que deterioraron la respuesta antiviral, pero que mejoraron después del tratamiento con antioxidantes, sugiriendo un papel central para ROSm en el agotamiento de las células T<sup>136</sup>. Estos autores demostraron que los antioxidantes reducen la apoptosis y conducen a una mejora de la producción de citoquinas en células T CD8 específicas. Otro estudio realizado en un modelo de trasplante alogénico de médula ósea donde se encuentran células T CD4 con expresión de PD-1 y niveles de ROSm incrementados, reveló que mediante un tratamiento con antioxidantes, estas células mejoraban su supervivencia<sup>109</sup>. Sin embargo, en este estudio, los autores no evaluaron si las células T tenían defectos en los sistemas antioxidantes.

Como se ha mencionado previamente, los niveles bajos/moderados de ROSm median la señalización redox a través de la modulación de factores de transcripción para impulsar la activación de las células T y su función<sup>7</sup>. Sin embargo, altos niveles de ROSm pueden provocar alteraciones en la señalización celular y modificaciones postraduccionales de proteínas, que puede tener un impacto en el resultado metabólico<sup>7</sup>. En otras palabras, así como la producción de ROS es esencial en la activación, también lo son los sistemas antioxidantes que contienen sus niveles en rangos que resultan suficientes, pero no deletéreos para la célula. Para ello, las células cuentan con varios sistemas antioxidantes para neutralizar ROSm. Entre ellos, SOD2 a nivel mitocondrial, catalasa y GSH a nivel citoplasmático, juegan un papel importante en las funciones de células T<sup>34</sup>. En un estudio que emplea un modelo de infección experimental de la enfermedad de Chagas, se observó que la deficiencia en SOD2 promueve mayores niveles de ROSm y, en consecuencia, aumenta el estrés

oxidativo en miocardio<sup>167</sup>. Asimismo, un estudio en animales con células T CD4 deficientes para SOD2, demostró que el aumento endógeno de ROSm conduce a un incremento en los efectos inflamatorios, apoptóticos y epigenéticos sobre los linfocitos T CD4 que parece ser impulsado, al menos parcialmente, por la desregulación del metabolismo<sup>168</sup>. Ciertamente, la expresión y actividad de SOD2 han sido propuestas como una señal de freno posterior a la activación de las células T<sup>51</sup>. En línea con el incremento de ROSm y el daño mitocondrial que correlacionan con el aumento en la tasa de apoptosis de células T CD4 durante la FA de la infección (*Fig. 18*), evaluamos el sistema antioxidante mitocondrial, hallando un incremento en la expresión de SOD2 y de su regulador FOXO3A. Como se mencionó previamente, nuestro estudio revela niveles elevados de ROSm en linfocitos T CD4 durante la FA a pesar de encontrarse incrementada la expresión de SOD2 (*Fig. 20*). Sin embargo, fue posible prevenir la apoptosis de células T CD4 de animales infectados en FA mediante el tratamiento *in vitro* con NAC (*Fig. 21*). Por lo tanto, consideramos necesario realizar análisis adicionales de otras especies reactivas de oxígeno en células T CD4 de la FA de la infección, tales como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, así como también la determinación de la actividad de SOD2.

En lo que respecta a sistemas antioxidantes citosólicos, la captación de cisteína es el paso limitante para la síntesis de GSH, por lo que el NAC es considerado el pro-fármaco más simple de cisteína capaz de reponer los niveles intracelulares de GSH, y es fácilmente absorbido por las células además de ser no tóxico<sup>169</sup>. De hecho, se ha utilizado para tratar la deficiencia de GSH en una amplia gama de infecciones y trastornos metabólicos<sup>69,170</sup>. Nuestros resultados nos conducen a pensar que, aunque la expresión de SOD2 pueda ser suficiente para controlar los niveles de superóxido, los niveles altos de peróxido pueden aumentar debido a la deficiencia de glutatión y podría tener efectos deletéreos en las células T, como se ha descrito previamente<sup>171</sup>. En concordancia con nuestros resultados obtenidos *in vitro*, se ha observado en células T CD8 de memoria que el agotamiento del GSH conduce a un aumento de ROS, deteriorando la función de las mismas<sup>172</sup>. Además, se ha visto que la suplementación con GSH en personas infectadas por el VIH con recuentos bajos de linfocitos T CD4 puede ayudar a restaurar la homeostasis redox y el equilibrio de citoquinas<sup>173</sup>. Características distintivas del LES como el incrementado estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y apoptosis en linfocitos, se asocian con el agotamiento del GSH<sup>174</sup>, que pueden revertirse mediante el tratamiento con NAC<sup>137</sup>. Más recientemente, se descubrió que el antioxidante NAC revierte los defectos metabólicos causados por la acumulación de ROS en linfocitos T CD8 de pacientes crónicamente estimulados por antígenos, reestableciendo así tanto la proliferación como la expresión de genes necesaria para la auto-renovación y su función efectora<sup>25</sup>.

Adicionalmente, estos autores demostraron que el tratamiento con NAC promovió una respuesta antitumoral adecuada, y sinérgicamente mejoró la eficacia antitumoral de la terapia con anti PD-L1 en modelos de linfoma y melanoma<sup>146</sup>. Se ha reportado que el microambiente tumoral reprime la biogénesis mitocondrial en células T CD8 impulsando la insuficiencia metabólica de células T intra-tumorales y su consecuente disfunción<sup>115,175</sup>. La desregulación mitocondrial e insuficiencia glucolítica en linfocitos T CD8 que infiltran carcinomas de células renales humanas, han sido asociadas con una producción elevada de ROSm y una baja regulación por parte de la enzima SOD2<sup>115</sup>. Estos autores también demostraron que la función efectora en estos linfocitos T CD8 podría ser rescatada por tratamientos antioxidantes<sup>115</sup>. Además, una excesiva cantidad de ROSm como producto de un desbalance entre su producción y eliminación, puede conducir a la inhibición en la activación de reguladores claves como mTOR y NFAT, así como reducirse la producción de IL-2, limitando de esa forma la proliferación de células T<sup>52</sup>. Por lo tanto, un equilibrio preciso entre la producción de ROS y la capacidad antioxidante asegura niveles apropiados de ROS intracelular<sup>37</sup>. En una investigación previa de nuestro grupo, se observó que durante la FA de la infección, las células T CD4 mostraban bajos niveles de activación de mTOR<sup>105</sup>. En consonancia con estos datos, hemos observado que la población de células T CD4 que producen altos niveles de ROSm y expresan PD-1, libera menos IL-2 en comparación con las células T CD4 que no producen ROSm ni expresan PD-1 (Fig. 17). Es probable que el metabolismo exacerbado (Fig. 1-3) sea una consecuencia de la activación temprana de mTOR, cuya señalización podría verse interrumpida por el estrés oxidativo que evidenciamos en la FA.

Resulta fundamental que se establezca un fino balance entre los niveles de ROS capaces de activar apropiadamente a las células e inducir daño al parásito en los fagocitos y entre los mecanismos antioxidantes que preservan las células del hospedador expuestas a la infección. Sin embargo, la respuesta antioxidante se va agotando en la medida en que la enfermedad de Chagas progresa. Numerosos antioxidantes han sido evaluados en estudios recientes, los cuales han mostrado beneficios potenciales para el control de estrés oxidativo en tejidos del hospedador<sup>176</sup>.

Numerosas investigaciones se propusieron establecer el rol de las ROS en la infección por *T. cruzi* empleando tratamientos *in vivo*, aunque los datos obtenidos aún resultan controversiales. En un estudio donde se administró el inductor de la enzima antioxidante hemooxigenasa 1 (CoPP) a ratones C57BL/6 infectados con la cepa Y de *T. cruzi*, se redujo el parasitismo, mientras que el inhibidor de la misma (SnPP), lo incrementó<sup>177</sup>. El compuesto pro-oxidante paraquat también

incrementó el pico de la parasitemia y la mortalidad de los ratones infectados con *T. cruzi* en la etapa aguda, indicando que el estrés oxidativo alimenta la infección *in vivo*<sup>177</sup>. En consonancia con dichos resultados, hay evidencia reciente de que un microambiente oxidante estimula el crecimiento parasitario proveyendo condiciones favorables como la disponibilidad de hierro en los macrófagos<sup>178</sup>.

Por otra parte, se demostró que NAC tiene un efecto protector durante la infección por *T. cruzi*<sup>179</sup>. Estos autores observaron una reducción de la parasitemia y un aumento en las proporciones de células T CD4/CD8 en ratones infectados y tratados con NAC o GSH mono-éster. Sin embargo, este estudio no realizó un análisis mecanístico en profundidad<sup>179</sup>. Si bien nuestros ensayos *in vitro* mostraron que el antioxidante NAC es capaz de prevenir la apoptosis de células T CD4 con mitocondria depolarizada, los resultados del tratamiento *in vivo* con NAC durante la FA de la infección no evidencian una mejora en dichos parámetros, así como tampoco una reducción en la producción de ROSm y depolarización mitocondrial (Fig. 22), incluso no se observaron diferencias en la parasitemia. En comparación con los modelos *in vitro*, los efectos de antioxidantes *in vivo* son algo más complejos, ya que podríamos pensar el efecto final como resultado de un balance que involucra más de un mecanismo de acción, los cuales pueden tener relevancia en este caso, tanto en el patógeno como en el hospedador. En este sentido, diferentes microorganismos unicelulares patogénicos usan estrategias antioxidantes y cada patógeno tiene su sistema particular. La homeostasis redox de ciertos patógenos intracelulares como *T. cruzi* depende del estatus de tioles de bajo peso molecular y enzimas antioxidantes que incluyen SODs, las peroxidasas del tipo peroxirredoxina clásica (PRXs) y las estructuralmente relacionadas a las GSH peroxidasas (GPXs), que trabajan sinérgicamente para combatir las sustancias oxidantes provenientes de su hospedador<sup>180</sup>.

La cisteína es un aminoácido neutro, el cual por lo general es el precursor limitante de la síntesis del GSH<sup>181,182</sup>. La forma oxidada de cisteína, la cistina, es la que se encuentra biodisponible en circulación, e incluso a altas concentraciones, no es una fuente eficiente de cisteína para la síntesis de GSH en distintos tipos celulares<sup>181</sup>. El propósito principal del tratamiento realizado con el fármaco NAC es de restaurar los reservorios celulares de GSH mediante la provisión de cisteína. El NAC puede ingresar a la célula por difusión ya que es permeable a la membrana<sup>182</sup> o ser transportado vía proteínas de intercambio aniónico<sup>183</sup> y ser rápidamente hidrolizado a cisteína por una aminoacilasa<sup>181,182,184</sup>. Por otra parte, el NAC es capaz de reaccionar con cistina en circulación, clivando la unión disulfuro para generar cisteína la cual puede ser transportada al interior de la

célula por el transporte de aminoácidos neutros<sup>72,181</sup>. Particularmente, el *T. cruzi* depende de un metabolismo redox inusual y su principal tiol de bajo peso molecular es un derivado del GSH y espermidina, el tripanotión (T(SH)<sub>2</sub>). En general, el arsenal de antioxidantes de *T. cruzi* actúa como un factor de virulencia al desintoxicar las especies reactivas en el compartimento fagosómico<sup>180</sup>. Por otro lado, existen pruebas que sugieren que el contenido intracelular de GSH podría modular el perfil o fenotipo desarrollado por el macrófago<sup>185</sup>. Se ha propuesto una discriminación funcional entre macrófagos de tipo reductores, con un alto contenido de GSH, y macrófagos oxidativos, con bajos niveles de GSH intracelular<sup>186</sup>, por lo que la modulación del contenido de GSH dentro una célula del sistema innato también podría determinar el éxito de la respuesta adaptativa desarrollada.

Por otra parte, el tratamiento con un precursor de NAD<sup>+</sup>, Nicotinamida ribosa (NR), se ha empleado en algunos modelos para mejorar la calidad de las mitocondrias<sup>132,187</sup>, principalmente a través de la estimulación de la mitofagia<sup>86</sup>. Se ha reportado que el tratamiento *in vivo* con NR mediante inyección intra-tumoral o administración oral tanto en un modelo de melanoma como de tumor de colon produjo una reducción en los niveles de ROS y se minimizó la acumulación de mitocondrias depolarizadas en linfocitos T CD8. De esta forma, se demostró que la administración de NR puede reestablecer la función mitocondrial, prevenir el agotamiento en células T y sostener una respuesta T antitumoral *in vivo*<sup>110</sup>. Nuestros resultados del tratamiento con NR en ratones infectados en FA, mostraron una reducción en la frecuencia de células productoras de ROSm. Además, se evidenció una tendencia a reducir la proporción de células con mitocondrias depolarizadas, aunque la diferencia con el grupo no tratado, no es significativa (*Fig. 22*). De forma análoga al NAC, cabe la posibilidad de que el tratamiento con NR también resulte, en cierta medida, beneficioso para el parásito. El NR, así como el ribósido de ácido nicotínico pueden ser importados dentro de las células por la familia de transportadores equilibrantes de nucleósidos (de sus siglas en inglés, ENT)<sup>188</sup>. Teniendo en cuenta la biología del *T. cruzi*, éste depende del hospedador para incorporar purinas y lo hace mediante los ENTs. Durante el estadio de amastigote, el cual tiene una alta tasa de replicación, expresa todas las isoformas de ENTs, lo que resulta consistente con la alta demanda de purinas y pirimidinas<sup>189</sup>. La biosíntesis del NAD<sup>+</sup> se realiza *de novo* o mediante la vía de salvataje, que convergen en el paso que involucra la enzima nicotinamida mononucleótido adeniltransferasa (NMNAT)<sup>190</sup>. El *T. cruzi* expresa dos deacetilasas dependientes de NAD<sup>+</sup> o sirtuinas las cuales están involucradas en numerosos procesos de señalización intracelulares esenciales para su supervivencia<sup>190</sup>, y que se han convertido en blancos candidatos para inhibir el desarrollo del parásito<sup>191,192</sup>. Por otra

parte, el NAD<sup>+</sup> ha sido involucrado en mecanismos de resistencia a drogas antiparasitarias. Todos estos reportes indican la posibilidad de que el parásito incorpore y metabolice el NR de modo que podría incrementarse la disponibilidad de NAD<sup>+</sup> y favorecer los procesos involucrados en la sobrevivencia y replicación parasitaria. Probablemente el efecto observado es un equilibrio dinámico entre los beneficios que le confieren los tratamientos tanto al sistema inmune como al *T. cruzi*. Otro estudio que sustenta nuestra hipótesis con respecto a los tratamientos antioxidantes en infecciones, es el que se realizó en un modelo de malaria donde se evidenció el desarrollo de malaria cerebral gatillada por la suplementación con vitamina E. La alimentación con una dieta pro-oxidante que contenía aceite de pescado, pero sin vitamina E, protegió a los ratones contra los parásitos de malaria y mejoró la sobrevivencia en la malaria cerebral<sup>193</sup>. Considerando los desbalances redox y alteraciones mitocondriales que observamos en células T CD4 durante la FA de la infección y el efecto del tratamiento *in vitro* con NAC, en contraste con los resultados de los tratamientos *in vivo* con NAC y NR, podríamos especular que la administración *in vivo* de antioxidantes podría ser beneficioso tanto para el hospedador como para el parásito. Es por ello que, mediante estas evidencias sumadas a nuestros resultados, sostenemos que resultaría prometedora la incorporación de tratamientos antioxidantes como adyuvantes de los tratamientos tradicionales frente a la infección por *T. cruzi*<sup>176</sup>.

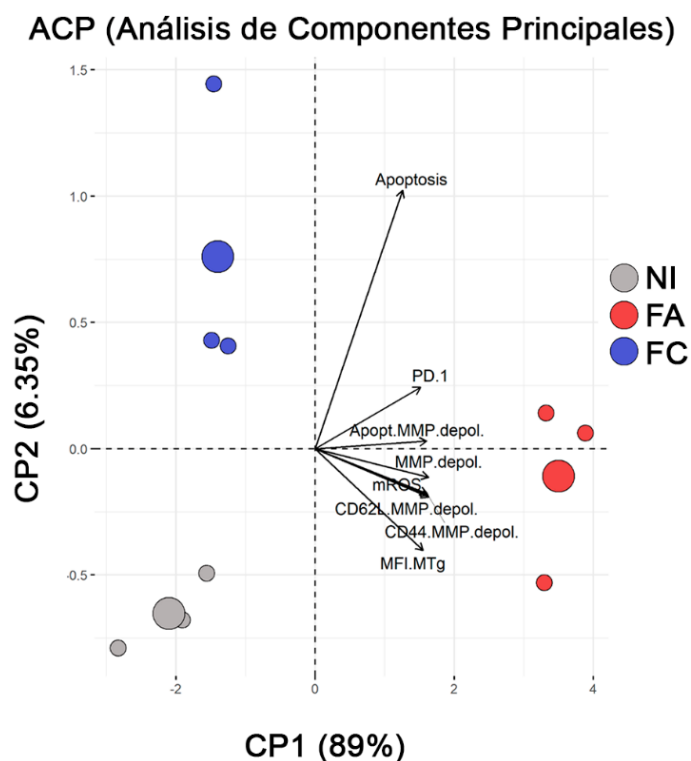
Existen muchas similitudes entre lo que hemos observado durante la FA de la infección con respecto a las células T CD8 agotadas descritas anteriormente<sup>107,108,115,135,136</sup>. Sin embargo, es posible que estas alteraciones en células T CD4 sean inducidas tempranamente durante la FA de la infección por *T. cruzi*, con elevación en los niveles de ROSm, que en conjunto con una disponibilidad deficiente del sistema GSH daría lugar a alteraciones mitocondriales que finalmente inducen la apoptosis. En nuestro estudio, las células T CD4 de la FC de la infección mostraron perfiles bioenergéticos y metabólicos similares a las células de animales NI. Considerando que las alteraciones observadas son dependientes de TCR, esperaríamos que después de una re-estimulación antígeno específica, las células de los animales infectados en FC adquieran un fenotipo metabólico y mitocondrial alterado, similar a las células de ratones infectados en FA. Así, este efecto, posiblemente asociado a la FA, cobraría relevancia en casos de reactivación de la infección por *T. cruzi* debido a trasplantes de corazón o inmunosupresión en general<sup>89</sup>. Sin un control estricto del comportamiento mitocondrial, las respuestas inmunes están comprometidas, lo que resulta en una protección ineficaz contra una infección o células tumorales, o desequilibrios en las poblaciones de linfocitos T efectores, posiblemente desencadenando inflamación crónica o enfermedades autoinmunes<sup>194</sup>.

Actualmente, las mitocondrias pueden considerarse el regulador metabólico maestro de las células T<sup>34,37</sup>, lo que implica que al controlar el metabolismo mitocondrial podríamos controlar el destino de los linfocitos y su función<sup>7,37</sup>. Por lo tanto, mejorar la aptitud metabólica comprende una estrategia terapéutica prometedora para el cáncer y las infecciones. En conclusión, nuestro estudio es el primero en vincular una desregulación metabólica y mitocondrial con una respuesta ineficaz de las células T CD4 durante la infección por *T. cruzi*, que contribuye a la incapacidad para eliminar el parásito y, en consecuencia, permitir su supervivencia y persistencia en el hospedador.

## CONCLUSIÓN GENERAL

El trabajo realizado en esta tesis estuvo abocado al estudio y a la caracterización de los mecanismos moleculares y vías metabólicas que participan en la activación del Linfocito T CD4, y cómo las mismas pueden interferir en la eficiente respuesta del sistema inmune para controlar la infección causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*. Evaluamos distintos parámetros metabólicos y mitocondriales, marcadores de activación, frecuencia de apoptosis, entre otros, en células T CD4 de animales NI, y en las FA y FC de la infección.

Integrando nuestros resultados en un análisis de componentes principales (ACP) nos permitieron diferenciar 3 poblaciones de células T CD4, siendo las provenientes de ratones infectados en FA las que se diferencian ampliamente de las células de animales NI y de ratones infectados en FC (Fig. 30).



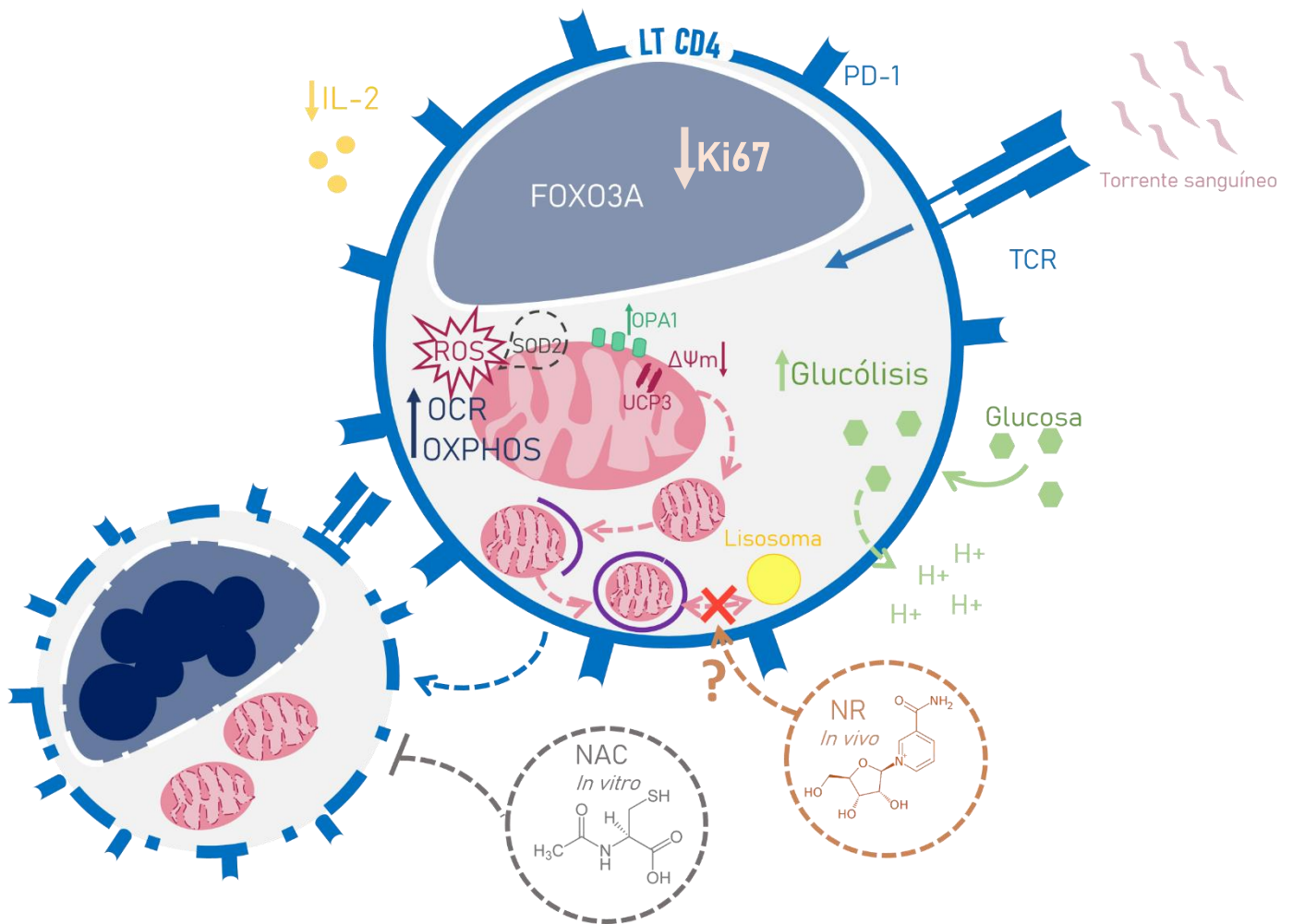
**Figura 30. Análisis de Componentes Principales (ACP).**

Se realizó un ACP de parámetros evaluados en células T CD4 de ratones NI e infectados en FA y FC. El Componente Principal 1 o CP1 explica el 89% de la varianza y está principalmente compuesto por las variables graficadas con flechas en el eje x como lo son la depolarización mitocondrial, la apoptosis en dicha población celular y la producción de ROSm. El CP1 nos permite diferenciar en este gráfico bidimensional multiparamétrico, la población de células T CD4 provenientes de animales infectados en FA.



Durante la FA de la infección por *T. cruzi*, los linfocitos T CD4 presentan un metabolismo glucolítico y oxidativo exacerbados. Hay una alta frecuencia de células T CD4 convencionales activadas, con alta expresión de PD-1 y elevados niveles de ROSm que tienen reducida capacidad de liberar IL-2 y de proliferar. Evidenciamos una producción creciente de ROSm a medida que la infección progresa con un máximo nivel hacia la FA de la infección. Estas células presentan depolarización mitocondrial, probablemente como consecuencia de las elevadas cantidades de ROSm acumuladas. Los altos niveles de ROSm conducen a la activación de mecanismos regulatorios como el incremento en la expresión de proteínas desacoplantes y del principal sistema antioxidante mitocondrial. Sin embargo, se evidencia una acumulación de mitocondrias dañadas, probablemente a causa de un defecto en la eliminación de mitofagosomas. Estos eventos conducen a una alta tasa de apoptosis en los linfocitos T CD4 con daño mitocondrial. No obstante, el tratamiento *in vitro* con el antioxidante NAC, precursor del antioxidante citoplasmático GSH, previene la apoptosis de dicha población celular. Por el contrario, no se observaron cambios significativos con el tratamiento de NAC *in vivo* durante la FA de la infección. No obstante, el tratamiento con NR, capaz de estimular la mitofagia, mostró una tendencia a reducir la población de células T CD4 efectoras productoras de ROSm con daño mitocondrial. Nuestros resultados además demostraron que las alteraciones mitocondriales evidenciadas en células T CD4 durante la FA de la infección, podrían ser provocadas por la activación y reguladas por la expresión de receptores inhibitorios. Estas alteraciones relacionadas al contexto de la infección, indicarían que tanto el tipo de activación que se induce como el tiempo de exposición al patógeno, además de las señales del microambiente, podrían tener un efecto sinérgico determinante en la generación de los eventos mitocondriales observados.

Por tanto, la apoptosis excesiva de células T CD4 podría contribuir a la incapacidad del hospedador para eliminar al *T. cruzi*, permitiendo su persistencia. Nuestros resultados están en línea con diversos estudios que han demostrado que alteraciones metabólicas conducen a una disfunción mitocondrial que redundaría en menor funcionalidad de las células T en el contexto de infecciones virales y cáncer. Por lo tanto, los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis permitirán una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en estos procesos, fundamentales para el desarrollo de futuras estrategias terapéuticas.



**Figura 31. Resumen gráfico.**

Esquematización de los eventos y características que presentan los linfocitos T CD4 durante la infección aguda por *Trypanosoma cruzi*. La activación antígeno-específica en el contexto de la infección conduce a un metabolismo glucolítico y oxidativo exacerbado con una alta producción de ROSm, una pérdida del potencial de membrana mitocondrial y un incremento en la formación de mitofagosomas, aunque su unión con lisosomas se encontraría reducida. Estas células productoras de ROSm y con alta expresión de PD-1 presentan una reducida proliferación y liberación de IL-2. Además, se evidencia un incremento en la apoptosis que es prevenida con el tratamiento *in vitro* con NAC. El tratamiento *in vivo* con NR evidenciaría una disminución en la producción de ROSm.

## PROYECCIONES

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis doctoral nos impulsan a considerar un estudio más exhaustivo de las señales que inducen el estrés mitocondrial y las consecuencias de estas alteraciones en la diferenciación, destino y función de diferentes subpoblaciones de células T CD4, así como de las células T CD8 durante la infección. Estos estudios permitirán en el futuro construir conocimiento para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Entre las proyecciones que se desprenden a partir de los resultados obtenidos en esta tesis consideramos:

- Caracterizar las subpoblaciones de células T CD4 con daño mitocondrial.
- Estudiar las repercusiones de estas alteraciones en la generación de células T de memoria.
- Evaluar en un modelo de reactivación tanto *in vitro* como *in vivo*, el fenotipo metabólico y mitocondrial de células T CD4 de memoria efectora.
- Determinar la participación de alteraciones metabólicas y mitocondriales en células T CD8 durante la infección.
- Profundizar el estudio de los mecanismos de dinámica mitocondrial y mitofagia.
- Evaluar la capacidad adyuvante de los tratamientos propuestos, para administrarlos junto a tratamientos antiparasitarios.

## Cadena transportadora de electrones

Conjunto de complejos proteicos y grupos prostéticos que se encuentran en la membrana mitocondrial interna que reciben electrones de equivalentes reductores como NADH y FADH<sub>2</sub>, y cuya transferencia de electrones entre sí está regida por su potencial reductor.

## Potencial de membrana mitocondrial

Gradiente de cargas generado por el bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana como consecuencia del transporte de electrones entre los complejos de la cadena transportadora de electrones.

## Depolarización mitocondrial

Pérdida del potencial de membrana, es decir que se pierde la diferencia de cargas ya que los protones se encuentran igualmente distribuidos entre la matriz y el espacio intermembrana.

## Especies reactivas del oxígeno

Especies químicas de vida media corta, altamente reactivas, generadas a partir de reducciones incompletas del oxígeno. En

caso de generarse como consecuencia de la sesión de electrones desde los complejos de la cadena transportadora de electrones, nos referimos a especies reactivas del O<sub>2</sub> mitocondriales, principalmente superóxido.

## Fosforilación oxidativa

Es el proceso metabólico que utiliza energía liberada por la oxidación de sustratos (ciclo del TCA) para producir ATP. La energía protón motriz generada por la cadena transportadora de electrones promueve la fosforilación del ADP a ATP por acción de la ATP sintasa. Se distingue de otras rutas que producen ATP con menor rendimiento y sin involucrar ATP sintasas, donde ocurren las llamadas fosforilaciones a nivel de sustrato, como, por ejemplo, durante la glucólisis.

## Glucólisis

Es la ruta metabólica a través de la cual se oxida la glucosa con la obtención de 2 moléculas de ATP. Consiste en reacciones enzimáticas consecutivas que convierten a la glucosa en 2 moléculas de piruvato, el cual es capaz de seguir otras vías metabólicas y así continuar entregando energía al organismo. Esta ruta se realiza tanto en ausencia como presencia de oxígeno.

## Fusión mitocondrial

Proceso mediante el cual se unen las mitocondrias para la adquisición de un mayor metabolismo oxidativo. Consiste en la unión de la membrana mitocondrial externa (MME) de ambas mitocondrias donde participan las proteínas Mfn1/2, seguido de la unión de las membranas mitocondriales internas (MMI) en la cual está involucrada la proteína OPA1. Como consecuencia se obtienen redes filamentosas de mitocondrias.

## Fisión mitocondrial

Mecanismo de fragmentación mitocondrial a partir del cual se obtienen mitocondrias de pequeño tamaño, con una reducida actividad de OXPHOS y baja producción de ROSm. En dicho proceso se encuentran involucrados el Retículo endoplásmico, filamentos de Actina y Miosina, y la proteína Drp1. La apariencia de las mitocondrias luego de ocurrir el fenómeno de fisión, son mitocondrias pequeñas dispersas en el citosol.

## Mitofagia

Proceso autofágico de eliminación selectivo de mitocondrias disfuncionales o dañadas. Este proceso mantiene la integridad mitocondrial y previene el desencadenamiento de eventos relacionados con la apoptosis.

## Células T CD4 naive

Linfocito que se ha diferenciado en la médula ósea y luego ha experimentado con éxito los

procesos de selección positiva y negativa en el timo. Su co-receptor es la molécula CD4 y puede responder a nuevos antígenos para los cuales posean TCR específico.

## Activación T

Proceso inducido por el reconocimiento del antígeno en el contexto de moléculas MHC, a través del TCR y co-estimulación mediada por la molécula CD28 ubicada en los linfocitos T, junto con la señal de sobrevida y crecimiento brindada por la IL-2. Ello conlleva a un cambio metabólico, la producción de especies reactivas del O<sub>2</sub>, y una serie de fosforilaciones que conducen a la expansión clonal y producción de citoquinas efectoras que caracterizan al fenotipo efector.

## Células T CD4 efectoras

Linfocitos T CD4 que se activaron de forma antígeno-específica y que en función del tipo de antígeno y de las señales microambientales presentes, adquirieron cierto fenotipo traducido en citoquinas secretadas, las cuales tienen funciones o efectos asociados, y que caracterizan el tipo de respuesta generado.

## Respuesta Th1

Es promovida por la citoquina IL-12 y conduce a la producción de IFN $\gamma$  por parte de linfocitos Th. Colabora con la activación de células T CD8 citotóxicas para combatir infecciones extracelulares y tumores.

## Respuesta Th2

Es promovida por la citoquina IL-4 y conduce a la producción de IL-4, IL-5 e IL-13 por parte de linfocitos Th. Protege contra parásitos extracelulares.

## Respuesta Th17

Es promovida por IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-21, IL-23, IL-1 $\beta$  y TGF- $\beta$ , y conduce a la producción de IL-

17A, IL-17F e IL-22. Se especializa en la eliminación de bacterias y hongos extracelulares.

## Células T CD4 de memoria

Son el conjunto de células que sobrevive posterior a la contracción de la respuesta efectora, y poseen la capacidad de responder en menor tiempo, a una re-exposición al antígeno o patógeno.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Modelo de infección con *T. cruzi* en ratón

Se emplearon ratones de tipo salvaje (WT) C57BL/6 y BALB/c de la Facultad de Veterinaria, Universidad Nacional de la Plata (La Plata, Argentina). Ratones reporteros Foxp3-EGFP (B6.Cg-Foxp3tm2Tch/J) y ratones transgénicos con TCR específicos de OVA (OT-II, RAG-suficientes, con fondo genético B6) se obtuvieron del Laboratorio Jackson. Los animales fueron endocriados en la instalación encargada de los animales (Bioterio) de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, según lineamientos institucionales. Se infectaron intraperitonealmente ratones BALB /c de 6-8 semanas de edad, con  $1 \times 10^6$  tripomastigotes de la cepa Tulahuen derivados de sangre que se mantuvieron mediante inoculación intraperitoneal cada 11 días.

## Modelo experimental

Ratones BALB/c o C57BL/6 se infectaron intraperitonealmente con 500 o 1000 tripomastigotes (Tp.). Durante la fase aguda (FA, pico de parasitemia) a los 18-21 días posterior a la infección (dpi) o la fase crónica temprana (también denominada fase indeterminada) a los 42-45 dpi (FC, parasitemia indetectable) se les tomó una muestra de sangre por punción cardíaca empleando una atmósfera de isoflurano como anestésico, muestra a la cual se heparinizó para el recuento de parásitos. En consecuencia, se procedió a la lisis de glóbulos rojos con una solución de cloruro de amonio al 10%, y posterior recuento en cámara de Neubauer. Los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical y se extrajo el bazo y eventualmente los ganglios inguinales de cada ratón. Se utilizaron animales no infectados (NI) como control.

## Aislamiento de esplenocitos

Se aislaron células de animales NI, de animales de FA y FC mediante disgregación mecánica de bazos o ganglios usando una malla metálica. Se ejerció presión con un émbolo sobre el tejido dispuesto sobre la malla, destruyendo la estructura organizada del tejido y de ese modo obteniendo células

en suspensión. Luego, los esplenocitos se centrifugaron (1500 rpm, 5 min, 4°C) y los sedimentos se trataron con una solución de lisis de glóbulos rojos (ACK Lysing buffer A1049201, GIBCO). Una vez enriquecida la población de leucocitos, se resuspendieron en medio RPMI completo que contiene suero bovino fetal al 10% (SBF, NATOCOR), GlutaMAX o L-alanil-L-glutamina (2 mM, 35050061 GIBCO) y gentamicina (40 ug/mL), para realizar el recuento de células en cámara de Neubauer. Luego, las suspensiones celulares se pasaron a través de un nailon de 27 mm (BD Falcon) para cultivo celular, citometría de flujo o purificación celular.

## Purificación de células T CD4

Las células T CD4 fueron aisladas de la suspensión de esplenocitos utilizando el kit de selección positiva EasySep™ Mouse CD4 II según las instrucciones del fabricante (tecnologías Stemcell™). Brevemente, se calculó una cierta concentración de anticuerpo para una determinada cantidad de células. Se procedió al bloqueo de sitios de unión inespecífica con suero de rata provisto por el kit, se incubaron las células durante 5 minutos con el anticuerpo específico para la molécula CD4, y luego del lavado, se incubó con las perlas magnéticas por 3 minutos. Posteriormente se coloca el tubo de la reacción dentro del magneto (EasySep™ Magnet) y se procede al lavado para remover poblaciones CD4 negativas. Finalmente, el tubo se removió del magneto y se resuspendieron las células purificadas para proceder al recuento y determinación de la pureza por FACS, para la cual se emplearon los anticuerpos anti CD3 PerCPcy5.5 (BD Pharmingen #551163) y CD4 APC (clon RM4-4, 116013 Biolegend). La pureza media encontrada fue de 90-98%.

## Transferencia adoptiva e inmunización

Para los experimentos de transferencia adoptiva, se marcaron células T CD4 purificadas de bazo de animales OT-II con el colorante para proliferación Dye-eFluor 670 (ThermoFisher) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Luego,  $7 \times 10^6$  células T CD4 OT-II marcadas con eFluor 670 se resuspendieron en 100 uL de PBS y se inyectaron en ratones WT C57BL/6 a través de la vena de la cola. A las 24 h pos-transferencia, los ratones fueron inmunizados con OVA y CpG-ODN formulado con Coa-ASC16 (nanoestructura formada por auto-ensamble del éster de palmitato de 6-O-ascorbilo) (OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16)<sup>133</sup>. Cada ratón fue inmunizado con un volumen de 100 uL distribuido equitativamente en ambas extremidades traseras (12 µg OVA y 15 µg CpG-ODN/50



μl/sitio). Para la preparación de la OVA (Worthington Biochemical Corporation) se empleó una columna para la remoción de endotoxinas (ThermoFisher) de la solución stock a < 1 EU/mL (Endosafe test). Se empleó el CpG-ODN 1826 (5'-TCCATGACGTTCCCTGACGTT-3') de clase B (Operon Technologies). Luego, 48 h posteriores a la inmunización, los ratones fueron sacrificados y se extrajeron los ganglios linfáticos inguinales drenantes, los cuales fueron disgregados como se detalló previamente.

## Cultivo celular

Células T CD4 purificadas fueron cultivadas en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) con una concentración de glucosa de 2 g/L, suplementado con SBF al 10% o al 2% según el ensayo, gentamicina 40 ug/mL y GlutaMAX que se suministra como 200 mM de dipéptido de L-alanil-L-glutamina en 0,85 % de NaCl y se emplea a una concentración de 2 mM en el medio de cultivo. Las condiciones estimulantes se proveen mediante la sensibilización por 12-16 h con anticuerpos αCD3 (1 ug/mL) y αCD28 (2 ug/mL) diluidos en PBS.

## Ensayos de Seahorse

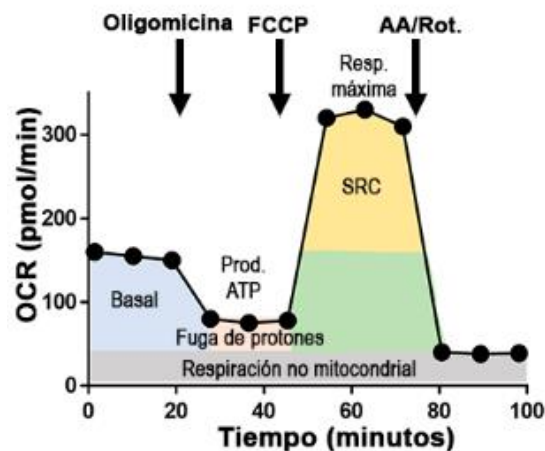
Células T CD4 purificadas de ratones NI, o infectados en FA y FC se adhirieron ( $7 \times 10^5$  células por pocillo) con Poli-D-Lisina 0,1 mg/ml (SIGMA-ALDRICH, P7280) en una microplaca de cultivo de 24 pocillos XF-24 (Seahorse Bioscience).

### Prueba de estrés mitocondrial

El medio de cultivo fue reemplazado por Medio Seahorse XF (pH 7,4) suplementado con L-glutamina 2 mM, glucosa 5 mM y 1 mM Piruvato (Gibco) una hora antes del experimento y la placa se colocó en una incubadora libre de CO<sub>2</sub>. Se inyectaron secuencialmente oligomicina (5 μM), carbonyl cianida-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP, 1 μM,) y una mezcla de antimicina A (AA, 5 μM) y rotenona (Rot, 1 μM) a través de los puertos en los cartuchos de Seahorse. Las tasas de consumo de oxígeno (OCR) se midieron en células de animales NI, e infectados de FA y FC. Los índices calculados son:

- Respiración Basal: (última medición previa a la primera inyección) – (respiración no mitocondrial)

- Respiración máxima: (determinación de la tasa máxima luego de la inyección de FCCP) – (respiración no mitocondrial)
- Capacidad respiratoria de reserva (SRC): (respiración máxima) – (respiración basal)
- Respiración ligada a la síntesis de ATP: (última determinación previa a la inyección de oligomicina) – (tasa mínima medida posterior a la inyección de oligomicina)
- Consumo de oxígeno no mitocondrial: tasa mínima medida luego de la inyección de AA/Rot.
- Fuga de protones: (Tasa mínima medida luego de la inyección de oligomicina) – (respiración no mitocondrial)

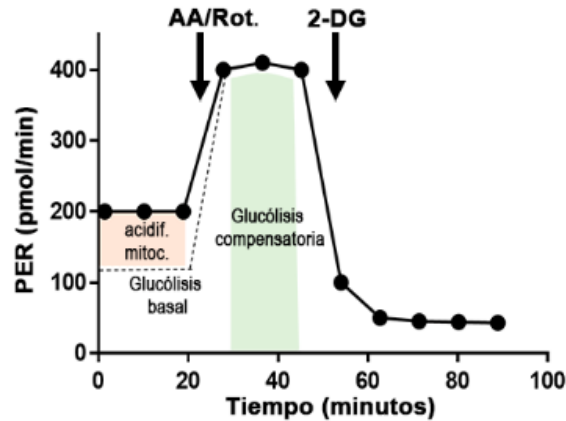


### Ensayo de estrés mitocondrial.

Se obtienen los diferentes índices determinando el consumo de oxígeno (OCR, del inglés) basal y luego del agregado de Oligomicina, FCCP y AA/Rot.

### Ensayo de determinación de la tasa de glucólisis

Las células fueron plaqueadas en medio Seahorse XF para ensayo de glucólisis conteniendo glucosa (5mM) y buffer HEPES (10mM), y se registraron los valores basales. Luego, se inyectó AA/Rot. La sustracción de la acidificación mitocondrial de la tasa total de eflujo de protones (PER) da como resultado la tasa glucolítica de eflujo de protones (glycoPER). La segunda inyección llevada a cabo fue la 2-deoxi-D-glucosa (2-DG, 100mM) con la determinación de la glucólisis basal como la última medición de glycoPER antes de la primera inyección, y la glucólisis compensatoria como la máxima determinación de glycoPER luego de la inyección con AA/Rot.



### Ensayo de glucólisis.

Se obtienen los diferentes índices determinando la acidificación del medio por eflujo de protones (PER, del inglés) basal y luego del agregado de AA/Rot y el inhibidor de la glucólisis 2-DG.

Los valores representados en la cinética de la tasa de acidificación del medio que se cuantificaron como glucólisis basal y compensatoria son netamente asociados a la glucólisis no sólo por el hecho de haberse adicionado un inhibidor de la glucólisis (2-DG), sino que se procedió según condiciones experimentales que propone Agilent Seahorse, para la corrección automática de la acidificación mitocondrial. Dicha corrección se realiza con el software Wave (Agilent), usando el protocolo de Glycolytic Rate Assay para la corrida. Como resultado final se obtienen datos de GlycoPER que corresponden a la tasa de eflujo de protones debida a la glucólisis.

Los ensayos se realizaron *ex vivo*, y además en condiciones de activación. Para ello, las células fueron incubadas por 30 minutos previos a los ensayos, con Dynabeads® Mouse T-Activator CD3/CD28 (Gibco #11453D) en una relación células:perlas de 1:2.

## Citometría de flujo

Se obtuvieron células de bazo, células de ganglios linfáticos o células T CD4 purificadas en suspensión, y se procedió a la tinción en placa de las células provenientes de cada animal pertenecientes a los distintos grupos experimentales. Las tinciones posteriores fueron realizadas en  $2 \times 10^6$  células por cada animal. Luego se procedió a la marcación.

### Tinción de superficie

Las marcaciones de moléculas de superficie se realizaron mediante el empleo de los siguientes anticuerpos dirigidos contra: CD3 PerCPcy5.5, CD4 APC, APCcy7 o BV421, PD- 1 PEcy7, CD44 PEcy7 y PEcy5, CD62L APCcy7 y CD98 PE. Se realizaron las correspondientes diluciones en solución fisiológica con suero bobino fetal al 2% (SF-SBF 2%), y se resuspendieron las células en un volumen de 25  $\mu$ L de dichas diluciones/mezclas de anticuerpos durante 20-30 minutos a 4 °C.

## Tinción de intracelular

La detección de la molécula intracelular Ki67 para la determinación de proliferación se realizó mediante el empleo del anticuerpo anti Ki67 AF660. Una vez realizada la marcación de superficie, se procedió a la fijación de la muestra con buffer BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit. Las células fueron inicialmente incubadas durante 20 minutos a 4 °C con 75  $\mu$ L de buffer de fijación. Luego se procedió a la permeabilización para lo cual se realizaron 2 lavados con 100  $\mu$ L de buffer de permeabilización (buffer Perm wash 1X) en centrífuga a 10 °C durante 8 minutos a 2000 rpm. Por último, se realizó la marcación con el anticuerpo anti Ki67 diluido en buffer de permeabilización, en el que se resuspendieron las células y se incubaron durante 30 minutos a TA en oscuridad. Se realizó un lavado final con buffer de permeabilización en centrífuga a 10 °C durante 8 minutos a 2000 rpm.

## Determinación de viabilidad

Para discriminar células muertas en nuestras muestras, se realizó una tinción de viabilidad (LIVE/DEAD™ Fixable dead cell stain kits). Se diluyó 1/1000 en PBS (Gibco) y las células se incubaron en 20  $\mu$ L de dicha dilución por 15 minutos a TA.

## Parámetros mitocondriales

Los parámetros mitocondriales se determinaron mediante el empleo de una sonda independiente del potencial de membrana MitoSpy™ Green FM y una sonda dependiente del potencial, eventualmente MitoSpy™ Orange CMTMRos o MitoStatus Red. Se emplearon ambas sondas a una concentración de 100 nM diluidas en medio RPMI incompleto. Se resuspendieron las células en 100  $\mu$ L de ambas sondas y se incubaron durante 20-30 minutos a 37 °C en oscuridad.

## Especies reactivas del O<sub>2</sub> mitocondriales

La presencia de ROS mitocondrial se midió empleando la sonda MitoSOX en una concentración de 5  $\mu$ M diluida en PBS (Gibco). Las células se resuspendieron en 100  $\mu$ L de dicha solución y se incubaron 15-20 minutos a temperatura ambiente (TA).

## Apoptosis

La apoptosis fue evaluada mediante el empleo de Anexina V APC, Anexina V PE o Anexina V Pacific Blue. Se resuspendieron las células en 50  $\mu$ L en buffer comercial para dicho reactivo y se colocaron 2,5  $\mu$ L de Anexina V. Se incubó 15 minutos a TA y finalmente se agregan 300  $\mu$ L del buffer comercial para posteriormente adquirir en el citómetro.

## Captación de glucosa

Se determinó la captación de glucosa de la siguiente manera:  $2 \times 10^6$  células se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) bajo en glucosa con SBF al 2% por media hora. Luego se agregó un análogo de la glucosa fluorescente 2-NBDG a una concentración de 10 nM y se incubó durante 40 minutos a 37 °C. Esta molécula ingresa a la célula de forma competitiva, uniéndose irreversiblemente a la enzima Hexoquinasa-2 y al no ser susceptible a su actividad, se acumula en el citoplasma. De esta forma, la intensidad de fluorescencia media (MFI) es proporcional a la capacidad de captar glucosa que tienen las células en estudio. Normalmente muestra unos niveles máximos de excitación/emisión de  $\sim 465/540$  nm y puede visualizarse con filtros ópticos diseñados para la fluoresceína (FITC).

En todos los experimentos, se realizaron los controles negativos, simples positivos y FMO (Fluorescence Minus One) correspondientes para cada panel de tinción.

Finalmente, las muestras fueron adquiridas en los citómetros de flujo BD FACS Cantoll (BD Biosciences) o BD LSRFortessa (BD Biosciences).

## Microscopía de epifluorescencia

Se realizó la técnica de inmunofluorescencia para evaluar la depolarización mitocondrial en células T CD4 purificadas. Se marcaron las células en suspensión con las sondas mitocondriales MitoSpy™ Green FM y MitoSpy™ Orange CMTMRos a una concentración de 100 nM, siguiendo los pasos del

protocolo para citometría de flujo. Posteriormente, se incubó con DAPI como tinción nuclear durante 5 minutos en oscuridad, se procedió al lavado y las células se adhirieron a los portaobjetos mediante la técnica de Cytospin. Brevemente, se resuspendieron  $0,5 \times 10^6$  células en 200  $\mu$ L de PBS-SBF 0,5%. Se colocaron vidrios cargados en la centrifuga de cytopspin y se sembraron las células resuspendidas en la cámara de muestra. Se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm. Luego se retiraron y secaron en el ambiente. Finalmente se montó con fluorsave y se visualizó al microscopio de epifluorescencia Leica DMI 8.

## Microscopía confocal

Se adhirieron células T CD4 a cubreobjetos de vidrio para cultivo celular dispuestos en una placa multi pocillo de 24 pocillos tratados con Poli-D-Lisina (0.1 mg/mL). Luego se fijaron con una solución de p-Formaldehído al 4% (p/v) en PBS durante 10 minutos a TA. Consecutivamente se procedió a la permeabilización con PBS-tritón 0,1%. Se realizó el bloqueo de sitios de unión inespecífica incubando las células durante 1 hora a TA con PBS-Albúmina sérica bovina (BSA) 5%. Posteriormente se incubó durante la noche con los respectivos anticuerpos primarios diluidos en buffer de bloqueo: anticuerpo anti-mouse FOXO3A, SOD2 y citocromo c. Finalmente se añadió en anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo durante 1 hora a TA diluido en buffer de bloqueo: anticuerpo anti-rabbit conjugado con Alexa Fluor 488 y anticuerpo anti-mouse conjugado con Alexa Fluor 594. Como último paso se agregó DAPI durante 5 minutos a TA en oscuridad. Una vez concluido el protocolo de marcación, se procedió al montaje con fluorsave y posterior visualización al microscopio confocal Zeiss- LSM 800 con objetivo 63X de inmersión, y los cortes en el plano Z tienen un espesor de 0,2  $\mu$ m para la determinación de expresión de proteínas y 0,15  $\mu$ m para los ensayos de colocalización. El análisis se realizó utilizando el software ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018).

## Evaluación de mitofagia

Para los ensayos de mitofagia se realizó una clasificación o “sorting” de células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> de ratones BALB/c NI e infectados en FA. Posteriormente se adhirieron con poli-D-lisina a portaobjetos circulares incluidos en cada pocillo de una placa multi pocillo. Una vez adheridas, se trataron con cloroquina 50  $\mu$ M durante 4 h. Con la adición de cloroquina, que inhibe la fusión autofagosoma-lisosoma, se acumulan autofagosomas con el consecuente incremento en LC3. Dado que el lisosoma

no puede descomponer el autofagosoma, esto conduce a un aumento en la colocalización de LC3 y LAMP1 de autolisosomas acumulados<sup>195</sup>. A un grupo de células T provenientes de ratones NI se los trató durante 30 min con CCCP 50 uM previo a la incubación con cloroquina. Posteriormente se lavaron y se procedió a la marcación con la sonda mitocondrial independiente del potencial de membrana (MT green). Luego se procedió a la fijación y permeabilización empleando metanol a -20 °C durante 15 minutos a T° ambiente. Se realizó la incubación con anticuerpos primarios anti-LC3B y anti-LAMP1 over-night a 4 °C. Seguidamente, se realizó la incubación con un anticuerpo secundario anti-rabbit marcado con Alexa Fluor 647 durante 1 h a T° ambiente en oscuridad. Se finalizó con la tinción de DAPI y el montaje de la impronta celular, como se detalló previamente.

Los análisis de colocalización se realizaron con el software ImageJ mediante el uso del plug in Coloc2 con el que se calculó el coeficiente de colocalización de Manders empleando el umbral de costes. Se realizó la selección del área de interés mediante la construcción de máscaras binarias, y se calculó el coeficiente de colocalización de la proteína LC3B y LAMP1 con la sonda mitocondrial MT green para cada corte del conjunto de cortes obtenido de un campo. Luego se sacó un promedio de los coeficientes correspondientes a un campo, para cada condición. Se analizaron 3 campos por condición, con 4-7 células cada uno. Se calculó la media y el desvío estándar para cada grupo experimental.

## Western Blotting

Las células T CD4 purificadas de los distintos grupos experimentales fueron lavadas y lisadas por 30 minutos a 4 °C en buffer RIPA [1% tritón X-100 (v/v) deoxicolato de sodio 0.5% (p/v), dodecil sulfato de sodio (SDS) 0.1% (v/v)] conteniendo un cocktail de inhibidores de proteasas (Roche). El debris celular se sedimentó a 13000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Se determinó la concentración de proteínas en dichos sobrenadantes mediante la técnica de Bradford. Se prepararon volúmenes de lisados conteniendo 50 µg de proteína para su corrida electroforética en condiciones desnaturalizante y reductora, con buffer de muestra conteniendo SDS y 2-Mercaptoetanol. Se hirvieron a 100 °C por 3 minutos, se centrifugaron y sembraron en geles de acrilamida al 10%. Posteriormente se realizó la corrida electroforética durante 1 hora a 150 V en buffer Tris-glicina-SDS. Concluida la corrida, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) a 100 V por 1 h en buffer tris-glicina con metanol al 20% (v/v). El bloqueo de sitios de unión inespecífica se realizó con buffer TBS-BSA 3%. Las membranas fueron incubadas con los siguientes anticuerpos diluidos en buffer de

bloqueo: SOD2 , UCP3, y citocromo c (clone 7H8.2C12), con  $\beta$ -actina. Para la detección, las membranas se incubaron posteriormente con anticuerpos secundarios para detección de fluorescencia infrarroja (IRD) anti-mouse o anti-rabbit, conjugados con Fluor 800 o Fluor 680 por 1 hora a TA. Luego del lavado, las membranas fueron escaneadas con el sistema de imágenes infrarrojas Odyssey (LI-COR, Lincoln, NE, USA) a las longitudes de onda de 700-800 nm. La cuantificación se realizó mediante el software ImageJ.

## Tratamiento *in vitro* con N-Acetil Cisteína (NAC)

$5 \times 10^5$  células T CD4 purificadas se cultivaron en una placa multi pocillo de 96 pocillos con medio RPMI completo en condiciones no estimulantes o frente a un estímulo policlonal con  $\alpha$ CD3 (1 ug/mL) y  $\alpha$ CD28 (2 ug/mL) en presencia o ausencia de N-Acetil Cisteína 10 mM durante 48 horas. Posterior al cultivo, se evaluó la apoptosis por citometría de flujo mediante el empleo Anexina V como se describió previamente.

## Purificación de poblaciones mediante clasificación o “*cell sorting*”

Previo a la clasificación, se realiza un pool de los distintos animales tanto del grupo control como del grupo infectado. Luego se procedió con la purificación de células CD4+ mediante selección positiva como se detalló anteriormente. Se realizó la marcación de  $1-1,5 \times 10^8$  células purificadas con sonda MitoSOX y con el anticuerpo anti-PD1 como se detalló en la sección de citometría de flujo. Luego se resuspendieron en medio RPMI con SBF 1% en una concentración de  $40 \times 10^6$  células/mL y se filtraron con filtros de nylon de 0,40-0,70  $\mu$ m. Se recolectaron las 4 poblaciones resultantes que son: células negativas para ambos marcadores, células productoras de ROSm, células que expresan PD1 y células productoras de ROSm que expresan PD1. La recolección de las células sorteadas se realizó en medio con gentamicina 80 g/mL y de SBF 20%. Posteriormente, se dejaron reposar, y finalmente se cultivaron en las diferentes condiciones a evaluar.

## Determinación de citoquinas por ELISA



La citoquina IL-2 fue cuantificada por la técnica de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) empleando el kit para detección de IL-2 en sobrenadantes de cultivo. Se cultivaron durante 72 h, células sorteadas según la expresión de la molécula PD-1 y la producción de ROSm. De este modo, se cultivaron células T CD4 ROSm<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> y ROSm<sup>-</sup>PD-1<sup>-</sup> en presencia o ausencia de estímulo policlonal ( $\alpha$ CD3- $\alpha$ CD28 en concentraciones antes mencionadas) provenientes tanto de animales controles (NI) como de animales infectados. Los sobrenadantes se procesaron diluidos 1/5. Se realizó el protocolo según las especificaciones del fabricante. Finalmente se leyó la absorbancia generada mediante un espectrofotómetro de placas a 495 nm. Se interpoló la densidad óptica a la curva patrón de IL-2 y la concentración de IL-2 se expresó en pg/mL.

## Microscopía electrónica de transmisión

Se purificaron células T CD4 de animales NI, e infectados de FA y FC como se detalló previamente. Dichas células se fijaron por inmersión durante 2 h en una mezcla de glutaraldehído 2% (v/v) y formaldehído 4% (v/v) en buffer cacodilato 0,1 M. Posteriormente los pellets de células fijadas se trataron con tetróxido de osmio 1% (w/v) por 1 h, deshidratados en una serie de cetonas frías graduadas y embebidos en Araldito a 60 °C por 48 h. Para estudios ultraestructurales, se cortaron secciones finas con una cuchilla de diamante en un ultramicrotomo JEOL JUM-7 y examinado en un microscopio electrónico Zeiss LEO-906E (Oberkochen, Alemania).

## Tratamientos *in vivo*

Distintos grupos de animales infectados fueron tratados con N-acetil cisteína (NAC), Nicotinamida Riboside (NR) y vehículo (solución fisiológica) como control. Se les administró intraperitonealmente un volumen de 200  $\mu$ L del tratamiento correspondiente a cada grupo, comenzando a los 5 días posterior a la infección (d.p.i.), hasta los 21 d.p.i (fase aguda) durante 16 días continuados. La concentración empleada para cada ratón tratado con NAC fue de 150 mg/kg y para el tratamiento con NR se emplearon dosis de 1000 mg/kg.

## Declaraciones éticas para el modelo animal

Todos los experimentos en animales fueron aprobados y conducidos en concordancia con los lineamientos de Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL)

de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (Ord. 6/16) (Número de Resolución del Honorable Consejo Directivo (HCD) 209/16 y 942/18). El CICUAL sigue los lineamientos para el cuidado animal de la “Guía para el cuidado y uso de animales de experimentación” (Consejo de cuidado animal canadiense, 1993) y del “Guía del Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales” (Guía ARENA/OLAW IACUC, National Institutes of Health (NIH), 2002).

## Análisis de datos

Se empleó el software Prism (GraphPad) para llevar a cabo los análisis estadísticos. Todos los datos se expresan como la media  $\pm$  desvío estándar (DS). Se realizó el análisis de normalidad Shapiro-Wilk y según su resultado referido a la distribución poblacional, se emplearon las pruebas estadísticas Mann-Whitney y Kruskal-Wallis (no paramétricos) o T de Student y ANOVA (paramétricos). El análisis de Tukey se empleó para múltiples comparaciones. El análisis de componentes principales (ACP) se realizó con el software R (R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria URL <https://www.R-project.org/>) y la interfaz de Rstudio (RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>). Una  $p \leq 0.05$  se consideró estadísticamente significativa.

**Tabla 1. Datos de reactivos**

Reactivo	Empresa	Catálogo	Título/ concentración	Metodología
<b>Dye-eFluor 670</b>	Thermofisher	650840	Fabricante	CF
<b>OVA</b>	Worthington Biochemical Corporation		12 ug	TTO <i>in vivo</i>
<b>Cpg-ODN 1826 (5'- TCCATGACGTTCTGACGTT-3') de clase B</b>	Operon Technologies			TTO <i>in vivo</i>
<b>Easy Sep Mouse CD4 II</b>	Stemcell		Fabricante	Purificación
<b>CD3 PerCPcy5.5)</b>	BD Pharmingen	551163	1/200	CF
<b>CD4 APC (clone RM4-4).</b>	Biolegend	116013	1/200	CF
<b><math>\alpha</math>CD3</b>	BD Pharmingen	553057	1 ug/mL	Estímulo <i>in vitro</i>
<b><math>\alpha</math>CD28</b>	BD Pharmingen	553294	2 ug/mL	Estímulo <i>in vitro</i>

<b>Poli-D-Lisina</b>	SIGMA-ALDRICH	P7280	0,1 mg/mL	Adherencia
<b>Dynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28</b>	GIBCO	11453D	Rel. Células:Perlas 1:2	Estímulo <i>in vitro</i>
<b>CD4 APC</b>	BD Pharmigen	553051	1/200	CF
<b>CD4 APCcy7</b>	BD Pharmigen	565650	1/200	CF
<b>CD4 BV421</b>	Biolegend	100543	1/200	CF
<b>PD 1 PEcy7</b>	eBioscience	25-9985-82	1/100	CF
<b>CD44 PEcy7</b>	eBioscience	25-044181	1/400	CF
<b>CD44 PEcy5</b>	BD Pharmigen	553135	1/400	CF
<b>CD62L APCcy7</b>	BD Pharmigen	560514	1/200	CF
<b>CD98 PE</b>	Biolegend	128207	1/200	CF
<b>Ki67 AF660</b>	eBioscience	505698-82	1/600	CF
<b>LIVE/DEAD™ Fixable dead cell stain kits</b>	Invitrogen	L34957	1/1000	CF
<b>MitoSpy™ Green FM</b>	Biolegend	424806	CF 100 nM/ IF 250 nM	CF, IF
<b>MitoSpy™ Orange CMTMRos</b>	Biolegend	424804	CF 100 nM/ IF 250 nM	CF, IF
<b>MitoStatus Red</b>	BD Pharmigen	564697	CF 100 nM/ IF 250 nM	CF, IF
<b>MitoSOX (3,8-phenanthridinediamine,5-(6-triphenylphosphoniumhexyl)-5,6-dihydro-6- phenyl</b>	Molecular Probes	M36008	5 uM	CF
<b>Anexina V APC</b>	Biolegend	640920	Fabricante	CF
<b>Anexina V PE</b>	BD Pharmigen	559763	Fabricante	CF
<b>Anexina V Pacific Blue</b>	Biolegend	640918	Fabricante	CF
<b>2-NBDG (2-( N -(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)-2-desoxiglucosa</b>	Thermofisher	13195	10 nM	CF
<b>Fluorsave</b>	Merck	US1345789	5 uL/condición	IF
<b>FOXO3A</b>	Abcam	109629	1/40	IF
<b>SOD2</b>	Santa Cruz	30080	1/40	IF, WB
<b>Citocromo c (mAb clon 6 H2.B4)</b>	In house (CEINBIO, Montevideo, Uruguay)			IF
<b>anti-rabbit Alexa Fluor 488</b>	Invitrogen	A11008	1/200	IF
<b>anti-mouse Alexa Fluor 594</b>	Invitrogen	11005	1/200	IF
<b>UCP3</b>	Abcam	3477		WB
<b>Citocromo c (clon 7H8.2C12)</b>	In house (CEINBIO, Montevideo, Uruguay)		1/1000	WB
<b>β-actina</b>	Cell Signaling	3700	1/500	WB
<b>Goat anti-mouse Fluor 800</b>	LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA	926-32210	1/10000	WB
<b>Goat anti-mouse Fluor 680</b>		926-68070		

<b>Goat anti-rabbit Fluor 800</b> <b>Goat anti-rabbit Fluor 680</b>	LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA	926-32211 926-68071	1/10000	WB
<b>N-Acetil Cisteína 10 mM (NAC)</b>	SIGMA-ALDRICH	A9165-5G	10 mM	TTO <i>in vitro</i>
<b>Kit IL-2</b>	Biologend	431003	Fabricante	ELISA
<b>LC3B</b>	Cell Signaling	2775	1/400	IF
<b>LAMP1</b>			1/1000	IF
<b>Anti-rabbit Alexa Fluor 647</b>	Biologend	406414	1/200	IF
<b>N-Acetil cisteína (NAC)</b>	SIGMA-ALDRICH	A9165-5G	150 mg/kg	TTO <i>in vivo</i>
<b>Nicotinamida Riboside (Na. Ribo)</b>	SIGMA-ALDRICH	N0636	1000 mg/kg	TTO <i>in vivo</i>

**CF:** Citometría de Flujo. **TTO:** Tratamiento. **IF:** Inmunofluorescencia. **WB:** Western Blot.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat. Immunol.* **16**, 343–353 (2015).
2. Saravia, J., Chapman, N. M. & Chi, H. Helper T cell differentiation. *Cell. Mol. Immunol.* **16**, 634–643 (2019).
3. Crotty, S. Follicular Helper CD4 T Cells (T<sub>FH</sub>). *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 621–663 (2011).
4. Fang, D. & Zhu, J. Dynamic balance between master transcription factors determines the fates and functions of CD4 T cell and innate lymphoid cell subsets. *J. Exp. Med.* **214**, 1861–1876 (2017).
5. Patsoukis, N. *et al.* The role of metabolic reprogramming in T cell fate and function. **15** (2017).
6. Steinert *et al.* - Mitochondrial Metabolism Regulation of T Cell–Medi.pdf.
7. Franchina, D. G., Dostert, C. & Brenner, D. Reactive Oxygen Species: Involvement in T Cell Signaling and Metabolism. *Trends Immunol.* **39**, 489–502 (2018).
8. Arasanz, H. *et al.* PD1 signal transduction pathways in T cells. *Oncotarget* **8**, (2017).
9. Snanoudj, R. *et al.* The blockade of T-cell co-stimulation as a therapeutic stratagem for immunosuppression: Focus on belatacept. **12**.
10. Baaten, B. J. G., Tinoco, R., Chen, A. T. & Bradley, L. M. Regulation of Antigen-Experienced T Cells: Lessons from the Quintessential Memory Marker CD44. *Front. Immunol.* **3**, (2012).
11. Mathis, D. & Shoelson, S. E. Immunometabolism: an emerging frontier. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 81–83 (2011).
12. Ganeshan y Chawla - 2014 - Metabolic Regulation of Immune Responses.pdf.
13. Pearce, E. L. & Pearce, E. J. Metabolic Pathways in Immune Cell Activation and Quiescence. *Immunity* **38**, 633–643 (2013).
14. Hu, Z., Zou, Q. & Su, B. Regulation of T cell immunity by cellular metabolism. *Front. Med.* **12**, 463–472 (2018).
15. Ge, T. *et al.* The Role of the Pentose Phosphate Pathway in Diabetes and Cancer. *Front. Endocrinol.* **11**, 365 (2020).
16. Biochemistry, Oxidative Phosphorylation - StatPearls - NCBI Bookshelf.pdf.
17. Peng, H.-Y. Metabolic Reprogramming and Reactive Oxygen Species in T Cell Immunity. *Front. Immunol.* **12**, 10 (2021).
18. Dumitru, C., Kabat, A. M. & Maloy, K. J. Metabolic Adaptations of CD4+ T Cells in Inflammatory Disease. *Front. Immunol.* **9**, 540 (2018).
19. Tang, J. X., Thompson, K., Taylor, R. W. & Oláhová, M. Mitochondrial OXPHOS Biogenesis: Co-Regulation of Protein Synthesis, Import, and Assembly Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 3820 (2020).
20. Calder, P. C. Fatty Acids: Metabolism. in *Encyclopedia of Food and Health* 632–644 (Elsevier, 2016). doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00276-2.
21. Yang, L., Venneti, S. & Nagraath, D. Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **19**, 163–194 (2017).

22. Bantug, G. R., Galluzzi, L., Kroemer, G. & Hess, C. The spectrum of T cell metabolism in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 19–34 (2017).
23. Macintyre, A. N. *et al.* The Glucose Transporter Glut1 Is Selectively Essential for CD4 T Cell Activation and Effector Function. *Cell Metab.* **20**, 61–72 (2014).
24. Chang, C.-H. *et al.* Posttranscriptional Control of T Cell Effector Function by Aerobic Glycolysis. *Cell* **153**, 1239–1251 (2013).
25. Sinclair, L. V. *et al.* Control of amino-acid transport by antigen receptors coordinates the metabolic reprogramming essential for T cell differentiation. *Nat. Immunol.* **14**, 500–508 (2013).
26. Desdín-Micó, G., Soto-Herederó, G. & Mittelbrunn, M. Mitochondrial activity in T cells. *Mitochondrion* **41**, 51–57 (2018).
27. MacIver, N. J. & Rathmell, J. C. Editorial overview: Metabolism of T cells: integrating nutrients, signals, and cell fate. *Curr. Opin. Immunol.* **46**, viii–xi (2017).
28. Patel, C. H. & Powell, J. D. Targeting T cell metabolism to regulate T cell activation, differentiation and function in disease. *Curr. Opin. Immunol.* **46**, 82–88 (2017).
29. Chapman, N. M., Boothby, M. R. & Chi, H. Metabolic coordination of T cell quiescence and activation. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 55–70 (2020).
30. Gerriets, V. A. & Rathmell, J. C. Metabolic pathways in T cell fate and function. *Trends Immunol.* **33**, 168–173 (2012).
31. Peng, M. *et al.* Aerobic glycolysis promotes T helper 1 cell differentiation through an epigenetic mechanism. *Science* **354**, 481–484 (2016).
32. Kamiński, M. M., Liedmann, S., Milasta, S. & Green, D. R. Polarization and asymmetry in T cell metabolism. *Semin. Immunol.* **28**, 525–534 (2016).
33. Bailis, W. *et al.* Distinct modes of mitochondrial metabolism uncouple T cell differentiation and function. *Nature* **571**, 403–407 (2019).
34. Angajala, A. *et al.* Diverse Roles of Mitochondria in Immune Responses: Novel Insights Into Immuno-Metabolism. *Front. Immunol.* **9**, 1605 (2018).
35. Krauss, S., Zhang, C.-Y. & Lowell, B. B. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 248–261 (2005).
36. Ježek *et al.* - 2018 - Mitochondrial Uncoupling Proteins Subtle Regulators.pdf.
37. Rashida Gnanaprakasam, J. N., Wu, R. & Wang, R. Metabolic Reprogramming in Modulating T Cell Reactive Oxygen Species Generation and Antioxidant Capacity. *Front. Immunol.* **9**, 1075 (2018).
38. Sies, H. & Jones, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 363–383 (2020).
39. Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **417**, 1–13 (2009).
40. Sena, L. A. & Chandel, N. S. Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Mol. Cell* **48**, 158–167 (2012).
41. Diebold, L. & Chandel, N. S. Mitochondrial ROS regulation of proliferating cells. *Free Radic. Biol. Med.* **100**, 86–93 (2016).
42. Murphy, M. P. & Siegel, R. M. Mitochondrial ROS Fire Up T Cell Activation. *Immunity* **38**, 201–202 (2013).

43. Schieber, M. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. **24**, 10.
44. Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A. & Jordan, M. S. T Cell Activation. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 591–619 (2009).
45. Ferber, E. C. *et al.* FOXO3a regulates reactive oxygen metabolism by inhibiting mitochondrial gene expression. *Cell Death Differ.* **19**, 968–979 (2012).
46. Mailloux, R. J. & Harper, M.-E. Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 1106–1115 (2011).
47. Klotz, L.-O. Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biol.* **22** (2015).
48. Xiong, Y., Uys, J. D., Tew, K. D. & Townsend, D. M. S-Glutathionylation: From Molecular Mechanisms to Health Outcomes. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 233–270 (2011).
49. Rashdan, N. A., Shrestha, B. & Pattillo, C. B. S-glutathionylation, friend or foe in cardiovascular health and disease. *Redox Biol.* **37**, 101693 (2020).
50. Mailloux, R. J. Glutathionylation Acts as a Control Switch for Uncoupling Proteins UCP2 and UCP3\*. **286**, 11 (2011).
51. Kamiński, M. M. *et al.* Manganese superoxide dismutase: A regulator of T cell activation-induced oxidative signaling and cell death. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1823**, 1041–1052 (2012).
52. Mak, T. W. *et al.* Glutathione Primes T Cell Metabolism for Inflammation. *Immunity* **46**, 675–689 (2017).
53. Buck, M. D. *et al.* Mitochondrial Dynamics Controls T Cell Fate through Metabolic Programming. *Cell* **166**, 63–76 (2016).
54. Sena, L. A. *et al.* Mitochondria Are Required for Antigen-Specific T Cell Activation through Reactive Oxygen Species Signaling. *Immunity* **38**, 225–236 (2013).
55. Ashrafi, G. & Schwarz, T. L. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ.* **20**, 31–42 (2013).
56. Yu, R., Lendahl, U., Nistér, M. & Zhao, J. Regulation of Mammalian Mitochondrial Dynamics: Opportunities and Challenges. *Front. Endocrinol.* **11**, 374 (2020).
57. Chao, T., Wang, H. & Ho, P.-C. Mitochondrial Control and Guidance of Cellular Activities of T Cells. *Front. Immunol.* **8**, 473 (2017).
58. Lee, H. & Yoon, Y. Mitochondrial Membrane Dynamics—Functional Positioning of OPA1. *Antioxidants* **7**, 186 (2018).
59. MacVicar, T. & Langer, T. OPA1 processing in cell death and disease – the long and short of it. *J. Cell Sci.* **129**, 2297–2306 (2016).
60. Mishra, P. & Chan, D. C. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J. Cell Biol.* **212**, 379–387 (2016).
61. Gilkerson, R., De La Torre, P. & St. Vallier, S. Mitochondrial OMA1 and OPA1 as Gatekeepers of Organellar Structure/Function and Cellular Stress Response. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 626117 (2021).
62. Corrado, M. Deletion of the mitochondria-shaping protein Opa1 during early thymocyte maturation impacts mature memory T cell metabolism. **13**.
63. Harris, J., Deen, N., Zamani, S. & Hasnat, M. A. Mitophagy and the release of inflammatory cytokines. *Mitochondrion* **41**, 2–8 (2018).

64. Palikaras, K., Lionaki, E. & Tavernarakis, N. Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nat. Cell Biol.* **20**, 1013–1022 (2018).
65. Zhao, Y. *et al.* Mitophagy Contributes to the Pathogenesis of Inflammatory Diseases. *Inflammation* **41**, 1590–1600 (2018).
66. Xu, Y., Shen, J. & Ran, Z. Emerging views of mitophagy in immunity and autoimmune diseases. *Autophagy* **16**, 3–17 (2020).
67. Cui, H., Kong, Y. & Zhang, H. Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. *J. Signal Transduct.* **14**.
68. Bratic, A. & Larsson, N.-G. The role of mitochondria in aging. *J. Clin. Invest.* **123**, 951–957 (2013).
69. Rushworth, G. F. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: The need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. **10** (2014).
70. Aruoma, O. I., Halliwell, B., Hoey, B. M. & Butler, J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: Its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic. Biol. Med.* **6**, 593–597 (1989).
71. Samuni, Y., Goldstein, S., Dean, O. M. & Berk, M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1830**, 4117–4129 (2013).
72. Aldini, G. *et al.* N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. **13**.
73. Lasram, M. M., Dhouib, I. B., Annabi, A., Fazaa, S. E. & Gharbi, N. A review on the possible molecular mechanism of action of N-acetylcysteine against insulin resistance and type-2 diabetes development. *Clin. Biochem.* **9** (2015).
74. Dinicola, S., Grazia, S. D., Carlomagno, G. & Pintucci, J. P. N-acetylcysteine as powerful molecule to destroy bacterial biofilms. A systematic review. **7**.
75. Pei, Y. *et al.* Biological Activities and Potential Oral Applications of N-Acetylcysteine: Progress and Prospects. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **15**.
76. De Flora *et al.* - 2020 - Rationale for the use of N -acetylcysteine .pdf.
77. Horowitz, R. I. & Freeman, P. R. Three novel prevention, diagnostic, and treatment options for COVID-19 urgently necessitating controlled randomized trials. *Med. Hypotheses* **143**, 109851 (2020).
78. Shi, Z. & Puyo, C. A. N-Acetylcysteine to Combat COVID-19: An Evidence Review. *Ther. Clin. Risk Manag.* **Volume 16**, 1047–1055 (2020).
79. Berk, M., Malhi, G. S., Gray, L. J. & Dean, O. M. The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. *Trends Pharmacol. Sci.* **34**, 167–177 (2013).
80. Pilipow, K. *et al.* Antioxidant metabolism regulates CD8+ T memory stem cell formation and antitumor immunity. *JCI Insight* **3**, e122299 (2018).
81. Katsyuba, E., Romani, M., Hofer, D. & Auwerx, J. NAD+ homeostasis in health and disease. *Nat. Metab.* **2**, 9–31 (2020).
82. Mehmel, M., Jovanović, N. & Spitz, U. Nicotinamide Riboside—The Current State of Research and Therapeutic Uses. *Nutrients* **12**, 1616 (2020).



83. Giroud-Gerbetant, J. *et al.* A reduced form of nicotinamide riboside defines a new path for NAD<sup>+</sup> biosynthesis and acts as an orally bioavailable NAD<sup>+</sup> precursor. *Mol. Metab.* **30**, 192–202 (2019).
84. Xie, N. *et al.* NAD<sup>+</sup> metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential. *Signal Transduct. Target. Ther.* **5**, 227 (2020).
85. Kang, H. T. & Hwang, E. S. Nicotinamide enhances mitochondria quality through autophagy activation in human cells. *Aging Cell* **8**, 426–438 (2009).
86. Jang, S., Kang, H. T. & Hwang, E. S. Nicotinamide-induced Mitophagy. *J. Biol. Chem.* **287**, 19304–19314 (2012).
87. Desdín-Micó, G. *et al.* T cells with dysfunctional mitochondria induce multimorbidity and premature senescence. *Science* **368**, 1371–1376 (2020).
88. Hong, G. *et al.* Administration of nicotinamide riboside prevents oxidative stress and organ injury in sepsis. *Free Radic. Biol. Med.* **123**, 125–137 (2018).
89. Pérez-Molina, J. A. & Molina, I. Chagas disease. *The Lancet* **391**, 82–94 (2018).
90. Pinazo, M. J. *et al.* Interventions to bring comprehensive care to people with Chagas disease: Experiences in Bolivia, Argentina and Colombia. *Acta Trop.* **203**, 105290 (2020).
91. chagas arg 4.pdf.
92. Bonney, K. M., Luthringer, D. J., Kim, S. A., Garg, N. J. & Engman, D. M. Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. *Annu. Rev. Pathol.* **14**, 421–447 (2019).
93. Dutra, W. O., Menezes, C. A. S., Magalhães, L. M. D. & Gollob, K. J. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol.* **36**, 377–387 (2014).
94. Andrade, D. V., Gollob, K. J. & Dutra, W. O. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, e3010 (2014).
95. Cardoso, M. S., Reis-Cunha, J. L. & Bartholomeu, D. C. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. *Front. Immunol.* **6**, (2016).
96. Dosreis, G., Freiredelima, C., Nunes, M. & Lopes, M. The importance of aberrant T-cell responses in Chagas disease. *Trends Parasitol.* **21**, 237–243 (2005).
97. Kierszenbaum, F., Fresno, M. & Szein, M. B. The *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein AGC10 inhibits human lymphocyte activation by a mechanism preceding translation of both, interleukin-2 and its high-affinity receptor subunits. *Mol. Biochem. Parasitol.* **125**, 91–101 (2002).
98. Decote-Ricardo, D., Nunes, M. P., Morrot, A. & Freire-de-Lima, C. G. Implication of Apoptosis for the Pathogenesis of *Trypanosoma cruzi* Infection. *Front. Immunol.* **8**, 518 (2017).
99. GRAIL, Stempin 2017.pdf.
100. Nunes, M. P., Andrade, R. M., Lopes, M. F. & DosReis, G. A. Activation-Induced T Cell Death Exacerbates *Trypanosoma cruzi* Replication in Macrophages Cocultured with CD4 + T Lymphocytes from Infected Hosts. **8**.
101. Jiménez, P., Jaimes, J., Poveda, C. & Ramírez, J. D. A systematic review of the *Trypanosoma cruzi* genetic heterogeneity, host immune response and genetic factors as plausible drivers of chronic chagasic cardiomyopathy. *Parasitology* **146**, 269–283 (2019).
102. Acosta Rodríguez, E. V., Araujo Furlan, C. L., Fiocca Vernengo, F., Montes, C. L. & Gruppi, A. Understanding CD8<sup>+</sup> T Cell Immunity to *Trypanosoma cruzi* and How to Improve It. *Trends Parasitol.* **35**, 899–917 (2019).

103. Truyens, C. & Carlier, Y. Protective host response to *Trypanosoma cruzi* and its limitations. in *American Trypanosomiasis Chagas Disease* 579–604 (Elsevier, 2017). doi:10.1016/B978-0-12-801029-7.00026-5.
104. Cai, C. W., Blase, J. R., Zhang, X., Eickhoff, C. S. & Hoft, D. F. Th17 Cells Are More Protective Than Th1 Cells Against the Intracellular Parasite *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* **12**, e1005902 (2016).
105. Stempin, C. C., Rojas Marquez, J. D., Ana, Y. & Cerban, F. M. GRAIL and Otubain-1 are Related to T Cell Hyporesponsiveness during *Trypanosoma cruzi* Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, e0005307 (2017).
106. Fisicaro, P. *et al.* Targeting mitochondrial dysfunction can restore antiviral activity of exhausted HBV-specific CD8 T cells in chronic hepatitis B. *Nat. Med.* **23**, 327–336 (2017).
107. Bengsch, B. *et al.* Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8 + T Cell Exhaustion. *Immunity* **45**, 358–373 (2016).
108. Russell, S. L. *et al.* Compromised Metabolic Reprogramming Is an Early Indicator of CD8+ T Cell Dysfunction during Chronic *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Cell Rep.* **29**, 3564–3579.e5 (2019).
109. Tkachev, V. *et al.* Programmed Death-1 Controls T Cell Survival by Regulating Oxidative Metabolism. *J. Immunol.* **194**, 5789–5800 (2015).
110. Yu, Y.-R. *et al.* Disturbed mitochondrial dynamics in CD8+ TILs reinforce T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* **21**, 1540–1551 (2020).
111. Gergely, P. *et al.* Mitochondrial hyperpolarization and ATP depletion in patients with systemic lupus erythematosus. **16**.
112. Chen, J. *et al.* T cells display mitochondria hyperpolarization in human type 1 diabetes. *Sci. Rep.* **7**, 10835 (2017).
113. Traba, J., Miozzo, P., Akkaya, B., Pierce, S. K. & Akkaya, M. An Optimized Protocol to Analyze Glycolysis and Mitochondrial Respiration in Lymphocytes. *J. Vis. Exp.* 54918 (2016) doi:10.3791/54918.
114. van der Windt, G. J. W., Chang, C. & Pearce, E. L. Measuring Bioenergetics in T Cells Using a Seahorse Extracellular Flux Analyzer. *Curr. Protoc. Immunol.* **113**, (2016).
115. Siska, P. J. *et al.* Mitochondrial dysregulation and glycolytic insufficiency functionally impair CD8 T cells infiltrating human renal cell carcinoma. *JCI Insight* **2**, e93411 (2017).
116. Echtay, K. S. *et al.* Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* **415**, 96–99 (2002).
117. Willems, P. H. G. M., Rossignol, R., Dieteren, C. E. J., Murphy, M. P. & Koopman, W. J. H. Redox Homeostasis and Mitochondrial Dynamics. *Cell Metab.* **22**, 207–218 (2015).
118. Scorrano, L. *et al.* A Distinct Pathway Remodels Mitochondrial Cristae and Mobilizes Cytochrome c during Apoptosis. *Dev. Cell* **2**, 55–67 (2002).
119. Frezza, C. *et al.* OPA1 Controls Apoptotic Cristae Remodeling Independently from Mitochondrial Fusion. *Cell* **126**, 177–189 (2006).
120. Zorov, D. B., Juhaszova, M. & Sollott, S. J. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiol Rev* **94**, 42 (2014).

121. Perry, S. W., Norman, J. P., Barbieri, J., Brown, E. B. & Gelbard, H. A. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *BioTechniques* **50**, 98–115 (2011).
122. Clutton, G., Mollan, K., Hudgens, M. & Goonetilleke, N. A Reproducible, Objective Method Using MitoTracker® Fluorescent Dyes to Assess Mitochondrial Mass in T Cells by Flow Cytometry. *Cytometry A* **95**, 450–456 (2019).
123. Sckisel, G. D. Differential phenotypes of memory CD4 and CD8 T cells in the spleen and peripheral tissues following immunostimulatory therapy. **11** (2017).
124. McDermott, D. S. & Varga, S. M. Quantifying Antigen-Specific CD4 T Cells during a Viral Infection: CD4 T Cell Responses Are Larger Than We Think. *J. Immunol.* **187**, 5568–5576 (2011).
125. Hwang, S., Cobb, D. A., Bhadra, R., Youngblood, B. & Khan, I. A. Blimp-1-mediated CD4 T cell exhaustion causes CD8 T cell dysfunction during chronic toxoplasmosis. **213**, 20.
126. Butler, N. S. *et al.* Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage Plasmodium infection. *Nat. Immunol.* **13**, 8 (2012).
127. Christiaansen, A. F. CD11a and CD49d enhance the detection of antigen-specific T cells following human vaccination. **7** (2017).
128. Yu, Y.-R. *et al.* Disturbed mitochondrial dynamics in CD8+ TILs reinforce T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* **21**, 1540–1551 (2020).
129. Hildeman, D. A. *et al.* Reactive Oxygen Species Regulate Activation-Induced T Cell Apoptosis. *Immunity* **10**, 735–744 (1999).
130. Kops, G. J. P. L. *et al.* Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* **419**, 316–321 (2002).
131. Kim, W.-S. *et al.* The caspase-8/Bid/cytochrome c axis links signals from death receptors to mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radic. Biol. Med.* **112**, 567–577 (2017).
132. Vannini, N. *et al.* The NAD-Booster Nicotinamide Riboside Potently Stimulates Hematopoiesis through Increased Mitochondrial Clearance. *Cell Stem Cell* **24**, 405–418.e7 (2019).
133. Chiodetti, A. L. *et al.* Class-B CpG-ODN Formulated With a Nanostructure Induces Type I Interferons-Dependent and CD4+ T Cell-Independent CD8+ T-Cell Response Against Unconjugated Protein Antigen. *Front. Immunol.* **9**, 2319 (2018).
134. Buck, M. D., Sowell, R. T., Kaech, S. M. & Pearce, E. L. Metabolic Instruction of Immunity. *Cell* **169**, 570–586 (2017).
135. Schurich, A. *et al.* Distinct Metabolic Requirements of Exhausted and Functional Virus-Specific CD8 T Cells in the Same Host. *Cell Rep.* **16**, 1243–1252 (2016).
136. Fisicaro, P. Targeting mitochondrial dysfunction can restore antiviral activity of exhausted HBV-specific CD8 T cells in chronic hepatitis B. *Nat. Med.* **23**, 12 (2017).
137. Perl, A. Oxidative stress in the pathology and treatment of systemic lupus erythematosus. *Nat. Rev. Rheumatol.* **9**, 674–686 (2013).
138. MacIver, N. J., Michalek, R. D. & Rathmell, J. C. Metabolic Regulation of T Lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 259–283 (2013).
139. Klein Geltink, R. I., Kyle, R. L. & Pearce, E. L. Unraveling the Complex Interplay Between T Cell Metabolism and Function. *Annu. Rev. Immunol.* **36**, 461–488 (2018).

140. Akkaya, B. *et al.* Increased Mitochondrial Biogenesis and Reactive Oxygen Species Production Accompany Prolonged CD4<sup>+</sup> T Cell Activation. *J. Immunol.* **201**, 3294–3306 (2018).
141. Yin, Y. *et al.* Normalization of CD4<sup>+</sup> T cell metabolism reverses lupus. *Sci. Transl. Med.* **7**, 274ra18-274ra18 (2015).
142. Perl, A. *et al.* Apoptosis and Mitochondrial Dysfunction in Lymphocytes of Patients With Systemic Lupus Erythematosus. in *Autoimmunity* vol. 102 087–114 (Humana Press, 2004).
143. Perl, A., Gergely, P. & Banki, K. MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN T CELLS OF PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS. *Int. Rev. Immunol.* **23**, 293–313 (2004).
144. Talbot, D. A., Lambert, A. J. & Brand, M. D. Production of endogenous matrix superoxide from mitochondrial complex I leads to activation of uncoupling protein 3. *FEBS Lett.* **556**, 111–115 (2004).
145. Arsenijevic, D. *et al.* Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat. Genet.* **26**, 435–439 (2000).
146. Vardhana, S. A. *et al.* Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation limits the self-renewal of T cells exposed to persistent antigen. *Nat. Immunol.* **21**, 1022–1033 (2020).
147. Scharping, N. E. Mitochondrial stress induced by continuous stimulation under hypoxia rapidly drives T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* **22**, 27 (2021).
148. Ogando, J. *et al.* PD-1 signaling affects cristae morphology and leads to mitochondrial dysfunction in human CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *J. Immunother. Cancer* **7**, 151 (2019).
149. Patsoukis, N. *et al.* PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat. Commun.* **6**, 6692 (2015).
150. Pallett, L. J., Schmidt, N. & Schurich, A. T cell metabolism in chronic viral infection. *Clin. Exp. Immunol.* **197**, 143–152 (2019).
151. Yu, F. *et al.* Distinct Mitochondrial Disturbance in CD4<sup>+</sup>T and CD8<sup>+</sup>T Cells From HIV-Infected Patients: *JAIDS J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **74**, 206–212 (2017).
152. Chaves, A. T. *et al.* Immunoregulatory mechanisms in Chagas disease: modulation of apoptosis in T-cell mediated immune responses. *BMC Infect. Dis.* **16**, 191 (2016).
153. Olichon, A. *et al.* Loss of OPA1 Perturbates the Mitochondrial Inner Membrane Structure and Integrity, Leading to Cytochrome c Release and Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **278**, 7743–7746 (2003).
154. Mishra, P., Carelli, V., Manfredi, G. & Chan, D. C. Proteolytic Cleavage of Opa1 Stimulates Mitochondrial Inner Membrane Fusion and Couples Fusion to Oxidative Phosphorylation. *Cell Metab.* **19**, 630–641 (2014).
155. Ehses, S. *et al.* Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1. *J. Cell Biol.* **187**, 1023–1036 (2009).
156. Ban, T., Heymann, J. A. W., Song, Z., Hinshaw, J. E. & Chan, D. C. OPA1 disease alleles causing dominant optic atrophy have defects in cardiolipin-stimulated GTP hydrolysis and membrane tubulation. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 2113–2122 (2010).
157. Arnoult, D., Grodet, A., Lee, Y.-J., Estaquier, J. & Blackstone, C. Release of OPA1 during Apoptosis Participates in the Rapid and Complete Release of Cytochrome c and Subsequent Mitochondrial Fragmentation. *J. Biol. Chem.* **280**, 35742–35750 (2005).
158. Yun, H. R. *et al.* Roles of Autophagy in Oxidative Stress. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 3289 (2020).

159. Lang, P. A. *et al.* Reactive oxygen species delay control of lymphocytic choriomeningitis virus. *Cell Death Differ.* **20**, 649–658 (2013).
160. Schlie, K. *et al.* Survival of Effector CD8<sup>+</sup> T Cells during Influenza Infection Is Dependent on Autophagy. *J. Immunol.* **194**, 4277–4286 (2015).
161. Gupta, S. S. *et al.* NIX-Mediated Mitophagy Promotes Effector Memory Formation in Antigen-Specific CD8<sup>+</sup> T Cells. *Cell Rep.* **29**, 1862-1877.e7 (2019).
162. Xu, X. *et al.* Autophagy is essential for effector CD8<sup>+</sup> T cell survival and memory formation. *Nat. Immunol.* **15**, 1152–1161 (2014).
163. Puleston, D. J. *et al.* Autophagy is a critical regulator of memory CD8<sup>+</sup> T cell formation. *eLife* **3**, e03706 (2014).
164. Case, A. J. *et al.* Elevated mitochondrial superoxide disrupts normal T cell development, impairing adaptive immune responses to an influenza challenge. *Free Radic. Biol. Med.* **50**, 448–458 (2011).
165. Murera, D. *et al.* CD4 T cell autophagy is integral to memory maintenance. *Sci. Rep.* **8**, (2018).
166. Song, S. B. & Hwang, E. S. High Levels of ROS Impair Lysosomal Acidity and Autophagy Flux in Glucose-Deprived Fibroblasts by Activating ATM and Erk Pathways. *Biomolecules* **10**, 761 (2020).
167. Wen, J. J. & Garg, N. J. Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates the mitochondrial ROS production and oxidative damage in Chagas disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **12**, e0006687 (2018).
168. Moshfegh, C. M. *et al.* Mitochondrial superoxide disrupts the metabolic and epigenetic landscape of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes. *Redox Biol.* **27**, 101141 (2019).
169. Griffith, O. W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 922–935 (1999).
170. Fraternali, A., Brundu, S. & Magnani, M. Glutathione and glutathione derivatives in immunotherapy. *Biol. Chem.* **398**, 261–275 (2017).
171. Flescher E, Ledbetter JA, Schieven GL, Vela-Roch N, Fossum D, Dang H, Ogawa N, Talal N. Longitudinal exposure of human T lymphocytes to weak oxidative stress suppresses transmembrane and nuclear signal transduction. *J Immunol.* 1;153(11):4880-9. (1994).
172. Ma, R. A Pck1-directed glycogen metabolic program regulates formation and maintenance of memory CD8<sup>+</sup> T cells. *Nat. Cell Biol.* **13** (2017).
173. Valdivia, A. *et al.* Restoring Cytokine Balance in HIV-Positive Individuals with Low CD4 T Cell Counts. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **33**, 905–918 (2017).
174. Shah, D., Aggarwal, A., Bhatnagar, A., Kiran, R. & Wanchu, A. Association between T lymphocyte sub-sets apoptosis and peripheral blood mononuclear cells oxidative stress in systemic lupus erythematosus. *Free Radic. Res.* **45**, 559–567 (2011).
175. Scharping, N. E. *et al.* The Tumor Microenvironment Represses T Cell Mitochondrial Biogenesis to Drive Intratumoral T Cell Metabolic Insufficiency and Dysfunction. *Immunity* **45**, 374–388 (2016).

176. Sánchez-Villamil, J. P., Bautista-Niño, P. K., Serrano, N. C., Rincon, M. Y. & Garg, N. J. Potential Role of Antioxidants as Adjunctive Therapy in Chagas Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2020**, 1–13 (2020).
177. Paiva, C. N. *et al.* Oxidative stress fuels Trypanosoma cruzi infection in mice. *J. Clin. Invest.* **122**, 2531–2542 (2012).
178. Paiva, C. N., Medei, E. & Bozza, M. T. ROS and Trypanosoma cruzi: Fuel to infection, poison to the heart. *PLoS Pathog.* **14**, e1006928 (2018).
179. Guevara, A. G., Guilvard, E., Borges, M. M., Cordeiro da Silva, A. & Ouaiissi, A. N-Acetylcysteine and glutathione modulate the behaviour of Trypanosoma cruzi experimental infection. *Immunol. Lett.* **71**, 79–83 (2000).
180. Reactive species and pathogen antioxidant networks during phagocytosis. 16.
181. Whillier, S., Raftos, J. E., Chapman, B. & Kuchel, P. W. Role of N-acetylcysteine and cystine in glutathione synthesis in human erythrocytes. *Redox Rep.* **14**, 115–124 (2009).
182. Bavarsad Shahripour, R., Harrigan, M. R. & Alexandrov, A. V. N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. *Brain Behav.* **4**, 108–122 (2014).
183. Raftos, J. E., Whillier, S., Chapman, B. E. & Kuchel, P. W. Kinetics of uptake and deacetylation of N-acetylcysteine by human erythrocytes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 1698–1706 (2007).
184. Uttamsingh, V., Keller, D. A. & Anders, M. W. Acylase I-Catalyzed Deacetylation of N-Acetyl-L-cysteine and S-Alkyl-N-acetyl-L-cysteines. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 800–809 (1998).
185. Dobashi, K. *et al.* Regulation of LPS induced IL-12 production by IFN- $\gamma$  and IL-4 through intracellular glutathione status in human alveolar macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* **7** (2001).
186. Murata, Y., Shimamura, T. & Hamuro, J. The polarization of Th1/Th2 balance is dependent on the intracellular thiol redox status of macrophages due to the distinctive cytokine production. *Int. Immunol.* **14**, 201–212 (2002).
187. Schöndorf, D. C. *et al.* The NAD<sup>+</sup> Precursor Nicotinamide Riboside Rescues Mitochondrial Defects and Neuronal Loss in iPSC and Fly Models of Parkinson's Disease. *Cell Rep.* **23**, 2976–2988 (2018).
188. Kropotov, A. *et al.* Equilibrative Nucleoside Transporters Mediate the Import of Nicotinamide Riboside and Nicotinic Acid Riboside into Human Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1391 (2021).
189. Campagnaro, G. D., de Freitas Nascimento, J., Girard, R. B. M., Silber, A. M. & de Koning, H. P. Cloning and characterisation of the Equilibrative Nucleoside Transporter family of Trypanosoma cruzi: ultra-high affinity and selectivity to survive in the intracellular niche. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1862**, 2750–2763 (2018).
190. Niño, C. H. *et al.* Identification of the nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase of Trypanosoma cruzi. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **110**, 890–897 (2015).
191. Matutino Bastos, T. *et al.* Identification of Inhibitors to Trypanosoma cruzi Sirtuins Based on Compounds Developed to Human Enzymes. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 3659 (2020).
192. Moretti, N. S. *et al.* Characterization of Trypanosoma cruzi Sirtuins as Possible Drug Targets for Chagas Disease. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 4669–4679 (2015).
193. Lutgen, P. Malaria and antioxidants: beware. *Pharm. Pharmacol. Int. J.* **6**, (2018).

194. Sukumar, M. *et al.* Mitochondrial Membrane Potential Identifies Cells with Enhanced Stemness for Cellular Therapy. *Cell Metab.* **23**, 63–76 (2016).
195. Pugsley, H. R. Assessing Autophagic Flux by Measuring LC3, p62, and LAMP1 Co-localization Using Multispectral Imaging Flow Cytometry. *J. Vis. Exp.* 55637 (2017) doi:10.3791/55637.

## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

- 2021 **Psilotachyines as trypanocidal compounds: bioguided fractioning of chemically modified extract.** Adessi, T.G.; Ana, Y.; Stempin, C.C; García, M.C.; Bisogno, F.R.; Nicotra, V.E.; García, M.E. *Phytochemistry*, En revisión.
- 2021 **An exacerbated metabolism and mitochondrial reactive oxygen species contribute to mitochondrial alterations and apoptosis in CD4 T cells during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection.** Ana, Y.; Rojas Marquez, J.D.; Fozzatti, L.; Baigorri, R.E.; Marin, C.; Maletto, B.A.; Cerbán, F.M.; Radi, R.; Piacenza, L.; Stempin, C.C. *Free Radical Biology and Medicine*. 2021; 163: 268-280. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.12.009.
- 2019 **T “Regulatory Cells From Non-obese Diabetic Mice Show Low Responsiveness to IL-2 Stimulation and Exhibit Differential Expression of Anergy-Related and Ubiquitination Factors”.** Godoy, G.J.; Olivera, C.; Paira, D.A.; Salazar, F.C.; Ana, Y.; Stempin, C.C.; Motrich, R.D.; Rivero, V.E. *Frontiers Immunology*. 2019; 10: 2665. doi: 10.3389/fimmu.2019.02665.
- 2019 **Argentinean Puna Plants with In Vitro Antioxidant and Anti - Inflammatory Activities as a Potential Nutraceutical.** Torres - Carro, R.; Ana, Y.; RojasMárquez, J. D.; Stempin, C. C.; Zampini, I. C.; Isla, M. I., & Alberto, M. R. *Journal of Food Science*. 2019; 84: 3352-3363. doi:10.1111/1750-3841.14957.
- 2017 **mTOR inhibition in *Trypanosoma cruzi* infected macrophages produces inflammatory mediators that regulate parasite survival.** Rojas Márquez, J.D.; Ana, Y.; Baigorri, R.E.; Stempin, C.C.; Cerban, F.M. *Frontiers Immunology*. 2018; 9: 313. doi: 10.3389/fimmu.2018.00313.
- 2017 **Gene Related to Anergy in Lymphocytes (GRAIL) and Otubain-1 regulate T cell hyporesponsiveness during *Trypanosoma cruzi* infection.** Stempin, C.C.; Rojas Marquez, J.D.; Ana, Y.; Cerban, F.M. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2017; 11: e0005307. doi: 10.1371/journal.pntd.0005307.