



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ANÁLISIS DEL METABOLISMO, ESPECIES REACTIVAS DE  
OXÍGENO Y PROLIFERACIÓN EN LINFOCITOS T PROVENIENTES  
DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**María de Jesús Domínguez Cruz**



Ciudad Universitaria, CD. MX.

2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: ORTEGA SOTO ENRIQUE  
**VOCAL:** Profesor: PRADO GARCÍA HERIBERTO  
**SECRETARIO:** Profesor: MANCILLA HERRERA ISMAEL  
**1er. SUPLENTE:** Profesor: CASTRO ESCAMILLA OCTAVIO  
**2° SUPLENTE:** Profesor: GUTIÉRREZ AGUILAR MANUEL

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN, DEPARTAMENTO DE ENFERMEDADES CRÓNICO-DEGENERATIVAS. LABORATORIO DE ONCO-INMUNOBIOLOGÍA, INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS “ISMAEL COSIO VILLEGAS”**

## **ASESOR DEL TEMA**

**DR. HERIBERTO PRADO GARCÍA**

---

## **SUSTENTANTE**

**MARÍA DE JESÚS DOMÍNGUEZ CRUZ**

---

## **AGRADECIMIENTOS**

Esta tesis forma parte del proyecto 682133 apoyado por la Convocatoria de Ciencia de Frontera 2019 de Conacyt.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Heriberto por ser mi mentor y mi guía, por responder cada una de mis dudas y por toda la paciencia que me ha tenido. Al Dr. Sullivan por cultivar mi amor por la inmunología y por siempre recibirme con los brazos abiertos, pero sobre todo por darme un abrazo cuando más lo necesitaba.

A Ana y Rosa que, aunque no tengo el gusto de conocer en persona, me permitieron conocerlas a través de sus trabajos de investigación sin los cuales este proyecto no hubiera sido posible.

A todos mis compañeros y miembros del laboratorio por hacerme parte de su equipo, pero sobre todo a Alicia quien se convirtió en una gran amiga.

La vida sin duda ha puesto en mi camino a un sinfín de buenas personas a las que puedo llamar amigos y a las que me gustaría agradecer. A Lalo, Richy Jorge López por acompañarme desde el primer hasta el último día en la Facultad de Química, por su sinceridad y apoyo, pero sobre todo por siempre creer en mí.

A mis amigos Susy, Jorge Cano, Tavo, Rebe, Denisse, Melba y Diego gracias por ser el protón de mis días. Sin ustedes las desveladas no hubieran sido iguales, gracias por hacer tan divertidas todas esas horas de estudio y por permitirme aprender de ustedes. Gracias por su cariño, amistad y compañía.

A mi mejor amiga y hermana Brissa por estar conmigo desde hace más de una década, por hacerme parte de su familia y por formar parte de la mía. Gracias por estar en mis mejores y peores momentos. Podrán pasar mil años y tu seguirás siendo mi mejor compañía. Te quiero.

Pero sobre todo agradezco a Margarita, mi madre. Por todo su esfuerzo y dedicación, por su infinita paciencia y cariño, por creer en mí y por regalarme un par de hermosas alas para que yo pudiera volar y cumplir mis sueños. Mami toda una vida no me bastará para agradecerte todo lo que has hecho por mí. Te amo.

*“Sólo con el corazón se puede ver bien; lo esencial es invisible a los ojos”*

Antoine de Saint-Exupéry

## Resumen

El cáncer de pulmón es el tipo de cáncer con mayor mortalidad y el segundo con mayor incidencia a nivel mundial, por ello representa un problema de salud pública en México y en el mundo. Los linfocitos T son parte del sistema inmunológico adaptativo y se encargan de mediar la respuesta antitumoral. La activación de las células T conduce a la proliferación, diferenciación y ejecución de sus funciones efectoras. Durante este proceso las células se someten a una reprogramación metabólica, es decir, cambian de un metabolismo predominantemente oxidativo a uno glucolítico de acuerdo con sus requerimientos energéticos.

Recientemente, se reportó que los linfocitos T CD8+ de derrame pleural maligno mostraron un alto contenido de masa mitocondrial y alta producción de especies reactivas de oxígeno. Aunado a ello, también se ha reportado que las células T de memoria de derrame pleural de pacientes con cáncer pulmonar presentan defectos en la captación de glucosa. El metabolismo glucolítico y mitocondrial juegan un papel importante en la proliferación, activación y adquisición de las funciones efectoras de los linfocitos T, por lo que estos defectos podrían estar relacionados con una menor respuesta antitumoral.

El objetivo de este trabajo fue determinar la relación que existe entre la masa mitocondrial, la producción de especies reactivas de oxígeno y la captación de glucosa con la activación, proliferación y el potencial efector de las células T de pacientes con cáncer pulmonar. Dichos parámetros se analizaron en linfocitos T CD4+ y CD8+ provenientes de muestras de derrame pleural y sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón. Para ello se empleó la técnica de citometría de flujo multiparamétrica. Los datos se analizaron a través de análisis supervisado y no supervisado. Para el análisis no supervisado se empleó la técnica de reducción dimensional no lineal UMAP.

Los linfocitos T CD4+ y CD8+ de pacientes con cáncer pulmonar no parecen mostrar defectos en la activación a pesar de que presentaron una baja proliferación y captación de glucosa. La población T CD8+ mostró un mayor

porcentaje de células MM<sup>High</sup>, esto podría ser un mecanismo para compensar la baja captación de glucosa. Las subpoblaciones T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de memoria central presentaron una disminución en la producción de ROS después de la estimulación, mientras que la subpoblación CD8<sup>+</sup> efectora no modificó su producción de ROS. Por otro lado, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de memoria central y efectores mostraron un potencial efector reducido. Los resultados sugieren que las células T de pacientes con cáncer pulmonar presentan defectos en la captación de glucosa y dinámica y función mitocondrial. Esto podría estar relacionado con la capacidad limitada para proliferar y ejercer su función efectora.



# Índice

<b>Abreviaturas .....</b>	<b>11</b>
<b>Índice de figuras.....</b>	<b>14</b>
<b>Índice de tablas .....</b>	<b>15</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>16</b>
1.1    Cáncer.....	16
1.1.1    Estadísticas del cáncer .....	16
1.1.2    Cáncer de pulmón .....	17
1.2    Derrame pleural .....	18
1.2.1    Derrame pleural trasudado y exudado.....	19
1.2.2    Derrame pleural maligno .....	19
1.3    Activación, metabolismo y función efectora de los linfocitos T .....	20
1.3.1    Función efectora de los Linfocitos T .....	20
1.3.2    Activación de los linfocitos T.....	21
1.3.3    Glucólisis .....	22
1.3.4    Fosforilación oxidativa .....	23
1.3.5    Especies reactivas de oxígeno .....	23
1.3.6    Reprogramación metabólica de los linfocitos T .....	24
1.4    Mitocondria y dinámica mitocondrial en linfocitos T .....	26
1.4.1    Dinámica mitocondrial en células T .....	26
<b>2. Antecedentes .....</b>	<b>31</b>
2.1    El microambiente tumoral modifica el metabolismo glucolítico y disminuye la función efectora de las células T .....	31
2.2    Los linfocitos T infiltrantes de tumor presentan alteraciones en el metabolismo, dinámica mitocondrial y producción de ROS .....	34
<b>3. Justificación.....</b>	<b>36</b>
<b>4. Pregunta de investigación .....</b>	<b>37</b>
<b>5. Hipótesis.....</b>	<b>37</b>
<b>6. Objetivos .....</b>	<b>38</b>

6.1	Objetivo general .....	38
6.2	Objetivos particulares .....	38
<b>7.</b>	<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>39</b>
7.1	Población estudiada .....	39
7.2	Procesamiento de las muestras biológicas .....	39
7.3	Cultivo celular y estimulación de las células mononucleares .....	40
7.4	Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno en linfocitos T provenientes de sangre periférica y líquido pleural.....	41
7.5	Análisis de la proliferación, masa mitocondrial y captación de glucosa en linfocitos T provenientes de sangre periférica.....	42
7.5.1	Evaluación de la proliferación de linfocitos T provenientes de sangre periférica.....	42
7.5.2	Evaluación de la masa mitocondrial en linfocitos T provenientes de sangre periférica.....	43
7.5.3	Evaluación de la captación de glucosa en linfocitos T provenientes de sangre periféricas .....	43
7.6	Evaluación de la degranulación y masa mitocondrial en linfocitos T provenientes de sangre.....	44
7.7	Análisis de resultados .....	46
7.7.1	Análisis supervisado .....	46
7.7.2	Análisis no supervisado .....	48
<b>8.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>53</b>
8.1	Características de la población .....	53
8.2	Los pacientes con cáncer de pulmón presentaron un alto porcentaje de linfocitos T CD8+ efectoras en sangre periférica. ....	54
8.3	Los linfocitos T CD4+ y CD8+ de memoria central provenientes de pacientes con cáncer de pulmón, disminuyen su producción de ROS cuando se activan.....	55
8.4	Las células T CD8+ efectoras provenientes de pacientes con cáncer de pulmón se activan, pero no modifican su producción de ROS.....	59

8.5	Los linfocitos T provenientes de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón mostraron una tendencia a proliferar menos. ....	60
8.6	Los linfocitos T proliferativos de sangre periférica de pacientes con cáncer pulmonar presentaron una menor captación de glucosa .....	61
8.7	Los pacientes con cáncer de pulmón presentaron un mayor porcentaje de linfocitos T CD8+ MM <sup>High</sup> en sangre periférica.....	62
8.8	Las células T CD4+ de memoria central de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón presentan una mayor degranulación después de la estimulación .....	64
8.9	Las células T CD8+ de memoria central y efectoras de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón presentan una baja degranulación.....	66
<b>9.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>68</b>
<b>10.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>74</b>
<b>11.</b>	<b>Referencias bibliográficas .....</b>	<b>75</b>

## Abreviaturas\*

2-NBDG: 2-desoxi-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il) amino]-D-glucosa

7-AAD: 7-amino actinomicina D

AICD: Muerte celular inducida por activación

Akt: Proteína cinasa B

APC: Célula presentadora de antígeno

ATP: Adenosina trifosfato

BSA: Albúmina sérica bovina

CMN: Células mononucleares

CTV: Cell Trace Violet

DAPI: 4', 6-diamidino-2-fenilindol

DCFDA: 2',7'-diacetato de diclorofluorescina

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DP: Derrame pleural

Drp1: Proteína relacionada con la dinamina 1

ETC: Cadena transportadora de electrones

FAO: Oxidación de ácidos grasos

GLUT1: Transportador de glucosa 1

IFN- $\gamma$ : Interferon gamma

IL: Interleucina

IMM: Membrana mitocondrial interna

LAG-3: Gen 3 de activación de linfocitos

MFI: Intensidad media de fluorescencia

Mfn: Mitofusina

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad

MM<sup>High</sup>: Masa mitocondrial alta

MM<sup>Low</sup>: Masa mitocondrial baja

mTOR: Objetivo de la rapamicina en mamíferos

NAD<sup>+</sup>: Nicotamida Adenina Dinucleótido oxidado

NADH: Nicotamida Adenina Dinucleótido reducido

NoM: No maligno

NSCLC: Carcinoma de pulmón de células no pequeñas.

OMM: Membrana mitocondrial externa

OPA1: Proteína relacionada con atrofia óptica 1

OXPHOS: Fosforilación oxidativa

PBS: Buffer de fosfatos salino

PD-1: Receptor de muerte programada 1

PD-L1: Ligando 1 de muerte programada

PGC-1 $\alpha$ : Coactivador 1-alfa del receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma

PI3K: Fosfatidilinositol 3 cinasa

ROS: Especies reactivas de oxígeno mitocondriales

RPMI-1640: Medio Roswell Park Memorial Institute

SCLC: Carcinoma de pulmón de células pequeñas

SEM: Error estándar de la media

SP: Sangre periférica

TCR: Receptor de células T

TIL: Linfocitos infiltrantes de tumor

TIM-3: Inmunoglobulina de células T y dominio 3 de mucina

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa

UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection

\*Las abreviaturas provienen de las siglas en inglés.

## Índice de figuras

Figura 1. Dinámica mitocondrial.....	27
Figura 2. Análisis citométrico para determinar las regiones de linfocitos T CD4+ y CD8+.....	47
Figura 3. Análisis de la proliferación, masa mitocondrial y captación de glucosa en linfocitos T CD4+ y CD8+ provenientes de sangre periférica.....	48
Figura 4. Preanálisis de datos para seleccionar a la región de linfocitos T.....	49
Figura 5. Análisis de reducción dimensional UMAP para el conjunto de datos de producción de ROS y expresión de CD137.....	50
Figura 6. Proyecciones UMAP de los datos de producción de ROS y expresión de CD137 mostrando grupo de Donador y Paciente.....	51
Figura 7. Análisis de reducción dimensional UMAP para conjuntos de datos de masa mitocondrial y expresión de CD107a, en linfocitos T provenientes de sangre periférica.....	52
Figura 8. Proyecciones UMAP de los datos de masa mitocondrial y expresión de CD107a mostrando grupo de Donador y Paciente.....	52
Figura 9. Porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ en sangre periférica y derrame pleural.....	54
Figura 10. Las células T CD4+ de memoria central provenientes de paciente con cáncer de pulmón disminuyen su producción de ROS cuando son activadas. ....	56
Figura 11. Las células T CD8+ de memoria central provenientes de pacientes con cáncer de pulmón disminuyen su producción de ROS cuando son activadas. ....	58
Figura 12. Las células T CD8+ efectoras provenientes de pacientes con cáncer de pulmón se activan, pero no modifican su producción de ROS. ....	59
Figura 13. Los linfocitos T CD4+ y CD8+ totales de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón mostraron una tendencia a proliferar menos.....	60
Figura 14. Los linfocitos T CD4+ y CD8+ totales provenientes de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón muestra una tendencia a captar menos glucosa.....	62

Figura 15. En sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón hay un mayor porcentaje de células T CD8+ MM <sup>High</sup> . .....	63
Figura 16. Las células T CD4+ de memoria central de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón presentan una mayor degranulación tras la estimulación. ....	65
Figura 17. Las células T CD8+ de memoria central y efectoras de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón presentan una baja degranulación.....	67

### **Índice de tablas**

Tabla 1. Anticuerpos empleados en la inmunofenotipificación para determinar la producción de ROS en células T.....	42
Tabla 2. Anticuerpos empleados en la inmunofenotipificación para determinar la proliferación, masa mitocondrial, captación de glucosa y degranulación de las células T.....	44



## **1. Introducción**

### **1.1 Cáncer**

La organización mundial de la salud (OMS) define al cáncer como un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar prácticamente cualquier parte del cuerpo, y que se caracterizan por un crecimiento descontrolado de células anormales. Las células cancerosas pueden invadir tejidos adyacentes y extenderse progresivamente a otros órganos mediante un proceso conocido como metástasis, el cual es una causa importante de muerte de pacientes con cáncer (OMS, 2021).

El cáncer es considerado como una enfermedad multifactorial resultado de factores genéticos y ambientales. Desde el punto de vista genético implica cambios en el genoma, entre estos cambios se encuentran mutaciones de ganancia de función que activan oncogenes, mutaciones de pérdida de función que inactivan genes supresores y mutaciones que inactivan genes de estabilidad implicados en la recombinación mitótica y en la segregación cromosómica. Estas mutaciones conducen a la célula hacia un fenotipo maligno (Romero-Garcia et al., 2011). Las células cancerosas poseen características adquiridas que las distinguen de las células normales, dentro de estas características se encuentran el mantenimiento de las señales de proliferación, evasión de los supresores de crecimiento, resistencia a la muerte, capacidad de replicación ilimitada, angiogénesis, invasión activa y metástasis (Hanahan & Weinberg, 2011).

#### **1.1.1 Estadísticas del cáncer**

El cáncer es un problema de salud pública a nivel mundial, se asocia con factores de riesgo como envejecimiento, sobre peso, inactividad física, consumo de alcohol y tabaco e ingesta reducida de frutas y verduras (Torre et al., 2015). En 2020, el cáncer fue la segunda causa de muerte a nivel mundial y representó un aproximado de 10 millones de defunciones (OMS, 2021), mientras que la incidencia fue de aproximadamente 19.3 millones de casos (Globocan, 2020).

De acuerdo con los datos estimados en GLOBOCAN 2020, el cáncer de pulmón fue el tipo de cáncer con mayor mortalidad y el segundo con mayor incidencia. El cáncer de mama representó el 11.7% de casos nuevos totales, seguido del cáncer de pulmón (11.4%) y el cáncer colorrectal (10.0%). El cáncer pulmonar representó el 18.0% del total de muertes asociadas a cáncer, seguido del cáncer colorrectal (9.4%) y cáncer de hígado (8.3%). En México, se registraron 7 mil 811 casos nuevos y 6 mil 733 muertes por cáncer de pulmón en 2020. Debido a su alta incidencia y mortalidad, el cáncer de pulmón es un problema de salud pública en México y en el mundo por lo que representa un tema importante de investigación que podría ayudar a mejorar la supervivencia y calidad de vida de los pacientes (Globocan, 2020).

### **1.1.2 Cáncer de pulmón**

El cáncer de pulmón se refiere a las neoplasias que se originan en el parénquima pulmonar o dentro de los bronquios (Siddiqui & Siddiqui, 2019), se caracteriza por ser altamente invasivo y con metástasis rápida (Lemjabbar-Alaoui et al., 2015). El tabaquismo es la causa más común de cáncer de pulmón, un 90% de los casos se atribuyen al consumo de tabaco, sin embargo, existen otros factores de riesgo como la exposición a carcinógenos como el asbesto, factores ambientales y genéticos (Siddiqui & Siddiqui, 2019).

El cáncer de pulmón constituye un grupo de enfermedades heterogéneas que se clasifican en dos principales grupos histológicos: Carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC por sus siglas en inglés) que representa aproximadamente el 15% de los casos de cáncer de pulmón, y carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC por sus siglas en inglés) que comprende aproximadamente el 85% de los casos (Inamura, 2017). El NSCLC se subcategoriza en carcinoma de células grandes, carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma, siendo este último, el subtipo histológico más frecuente en la población con un 40% de casos (Lemjabbar-alaoui et al., 2015).

El cáncer de pulmón en etapas tempranas es asintomático, por lo que se suele diagnosticar cuando los pacientes se encuentran en etapas avanzadas de la enfermedad. De manera temprana sólo se diagnostica un 0.6% de los casos; mientras que en estadio cuatro o periodo crítico se diagnostica el 65% de los casos (INSP, 2021). Los pacientes con cáncer de pulmón presentan derrame pleural como una manifestación clínica cuando se encuentran en estadios avanzados de la enfermedad (Sahn, 1993).

## **1.2 Derrame pleural**

La pleura es una membrana serosa que recubre a los pulmones y la cavidad torácica (Herbert et al., 2018) y consiste en una monocapa de células mesoteliales (Finley & Rusch, 2011). La pleura permite que el pulmón se contraiga y expanda dentro de la cavidad torácica, transmite las fuerzas mecánicas del diafragma y la pared torácica y protege al pulmón de infecciones (Yalcin et al., 2013).

La pleura está organizada en dos capas, una parietal y una visceral; la pleura visceral cubre al pulmón y la parietal cubre al diafragma, la pared torácica y el mediastino (Yalcin et al., 2013). Entre las dos pleuras se encuentra el espacio o cavidad pleural que contiene entre 10-20 mL de líquido pleural, cuya función es lubricar las dos estructuras para llevar a cabo los movimientos respiratorios (D'Agostino & Edens, 2020). Este fluido surge particularmente de los capilares de la pleura parietal y luego se absorbe a través de los vasos linfáticos pleurales parietales, de modo que se conserva el equilibrio entre producción y absorción (Porcel, 2013).

El derrame pleural es la acumulación excesiva de líquido en el espacio pleural y ocurre cuando hay demasiada producción o muy poca absorción de líquido en la cavidad pleural, generalmente una combinación de ambos factores (Skok et al., 2019). Es importante destacar que la acumulación de líquido no es una enfermedad, sino más bien, la consecuencia de una patología; las causas más

frecuentes de derrame pleural son insuficiencia cardiaca, cáncer, neumonía, tuberculosis, enfermedades pericárdicas y cirrosis (Porcel, 2013).

### **1.2.1 Derrame pleural trasudado y exudado**

Los derrames pleurales se clasifican como trasudados o exudados, esto de acuerdo con las características bioquímicas del fluido, que generalmente reflejan el mecanismo fisiológico de su formación (Porcel & Light, 2006). Un derrame pleural trasudado o no inflamatorio, es causado por un desequilibrio en el gradiente de presión hidrostática u osmótica entre los capilares pulmonares y el espacio pleural. Este tipo de derrames se asocia comúnmente con insuficiencia cardiaca y cirrosis hepática (Porcel, 2013).

Los derrames pleurales exudativos se deben a factores locales en la pleura, como el aumento de permeabilidad capilar o el deterioro de drenaje linfático y es el resultado de procesos inflamatorios. Las causas más comunes de estos derrames son neoplasia metastásica, derrame paraneumónico, tuberculosis y mesotelioma (Porcel, 2013).

### **1.2.2 Derrame pleural maligno**

Los derrames pleurales malignos son derrames exudativos que se forman cuando las células tumorales se infiltran en el espacio pleural y bloquean el drenaje linfático (Skok et al., 2019). Más del 75% de los derrames pleurales malignos son causados por neoplasias de pulmón (36%), mama (26%) y linfoma (13%) (Karkhanis & Joshi, 2012).

El cáncer de pulmón es la principal causa de derrame pleural maligno, siendo el adenocarcinoma el tipo más frecuente. Estos derrames comúnmente se presentan en estadios avanzados de la enfermedad, por lo que se asocia con un mal pronóstico para los pacientes. Se estima una media de supervivencia menor a 5 meses desde el momento del diagnóstico (Ingelfinger et al., 2018). Además, la calidad de vida del paciente se ve afectada debido a la disminución de la

capacidad respiratoria y a las posibles limitaciones de los pacientes para tolerar el tratamiento sistémico (Murthy et al., 2019).

El líquido pleural normalmente se compone de leucocitos, en su mayoría macrófagos y linfocitos, sin embargo, en el derrame pleural maligno además de estas poblaciones celulares se encuentran células neoplásicas (D'Agostino & Edens, 2020). La población de linfocitos T varía entre el líquido pleural sano y el maligno; en los sujetos sanos predomina el fenotipo de memoria efectora tanto en linfocitos T CD4+ como CD8+. En los pacientes con derrame pleural maligno se observa una mayor proporción de células T CD4+ de memoria central y una disminución de las células T CD8+ de memoria efectora (Murthy et al., 2019).

### **1.3 Activación, metabolismo y función efectora de los linfocitos T**

#### **1.3.1 Función efectora de los Linfocitos T**

Los linfocitos T son parte del sistema inmunológico adaptativo, se encargan de mediar la respuesta contra infecciones y tumores malignos. Existen dos linajes de células T, las células T CD4+ y CD8+. Las células T CD8+ o citotóxicas se encargan de la destrucción de la célula blanco a través de sus gránulos con granzimas y perforinas, aunque también secretan citocinas como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferon gamma (IFN- $\gamma$ ). Mientras que las células T CD4+ ejercen su función efectora a través de la secreción de citocinas como interleucina 2 (IL-2), TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Dimeloe et al., 2017).

Para que los linfocitos T lleven a cabo sus funciones efectoras, primero deben ser activados por las células presentadoras de antígeno (APC) (Dimeloe et al., 2017). Cuando los linfocitos T interactúan con las células blanco se degranulan para liberar sus citocinas efectoras, durante este proceso expresan en su membrana moléculas como CD107a, CD107b y CD63 (Betts & Koup, 2004).

### 1.3.2 Activación de los linfocitos T

La activación de los linfocitos T se lleva a cabo mediante un proceso conocido como sinapsis inmunológica. Este proceso incluye receptores como el TCR (Receptor de células T), moléculas de coestimulación y adhesión (Dustin, 2014); además durante la sinapsis inmunológica se expresan marcadores de activación como CD137 y CD69 (Prado & Sandoval, 2020). La activación de las células T requiere principalmente de tres señales. La primera señal se da cuando las APCs asocian antígenos de origen peptídico a las moléculas del MHC (Complejo principal de histocompatibilidad), estos antígenos son presentados a los linfocitos T y reconocidos por su TCR. Las células T CD4+ reconocen a antígenos asociados a moléculas del MHC II, mientras que las células T CD8+ reconocen a los antígenos unidos a moléculas del MHC I (Sauls & Taylor, 2019).

La segunda señal involucra a las moléculas de coestimulación. Las APCs expresan en su superficie moléculas de coestimulación tales como CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2), que interactúan con el CD28 expresado por los linfocitos T (Dustin, 2014). La señal de coestimulación además de amplificar la señal del TCR, tiene diversos efectos sobre las funciones de las células T, incluidos eventos bioquímicos como el aumento de la glucólisis y producción de IL-2. El aumento en la glucólisis de los linfocitos T permite que se genere la energía necesaria para su crecimiento y proliferación; mientras que la IL-2 actúa como un factor de crecimiento (Esensten et al., 2016).

La tercera señal está dada por citocinas que dirigen y amplifican la diferenciación y expansión de las células T (Sckisel et al., 2015). En las células T CD4+ esta señal determina el espectro de citocinas que serán producidas por el fenotipo efector. Mientras que para las células T CD8+, la señal 3 que es producida cuando las APCs liberan IL-12 y IFN- $\alpha/\beta$  promueve el desarrollo de funciones efectoras, la supervivencia y la formación de la población de memoria (Curtsinger & Mescher, 2010).

Durante la sinapsis inmunológica también participan moléculas de adhesión como CD2 y CD58. La molécula CD2 es expresada en la membrana de los linfocitos T, mientras que su ligando CD58, es expresado en la superficie de las APCs. Estas moléculas son importantes para mantener la estabilidad de la sinapsis y están relacionadas con la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Shao et al., 2018).

### **1.3.3 Glucólisis**

La activación de las células T CD4+ y CD8+ es acompañada de un aumento en la glucólisis aerobia, sin embargo, las células T CD4+ exhiben niveles basales de glucólisis más altos que las células T CD8+. Esto se debe a que los linfocitos T CD4+ tienen una expresión elevada de la enzima glucolítica hexocinasa II, esta enzima cataliza el primer paso de la glucólisis mediante la conversión de la glucosa a glucosa-6-fosfato. La fosforilación de la glucosa permite que sea retenida dentro de las células (Jones et al., 2017).

Durante la activación de las células T, la señal de coestimulación dada por CD28 regula positivamente la expresión del transportador de glucosa GLUT1, lo que permite que la captación de glucosa sea mayor (Dimeloe et al., 2017). El metabolismo glucolítico proporciona precursores biosintéticos para la síntesis de lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, los cuales son necesarios para que las células T proliferen y ganen su función efectora (O'Sullivan & Pearce, 2015).

La glucólisis en las células T CD4+ juega un papel fundamental en la adquisición de su función efectora, particularmente en la producción de citocinas como IL-2 y IFN- $\gamma$ . Por otra parte, los linfocitos T CD8+ efectores muestran una mayor dependencia del metabolismo mitocondrial para la producción de citocinas (Jones et al., 2017).

### 1.3.4 Fosforilación oxidativa

En condiciones aerobias, el piruvato proveniente de la glucólisis entra a la mitocondria donde se lleva a cabo el ciclo de Krebs. En este ciclo se producen intermediarios biosintéticos y portadores de electrones reducidos como NADH (Nicotamida Adenina Dinucleótido) y FADH<sub>2</sub> (Flavina Adenina Dinucleótido) que promueven a la fosforilación oxidativa (OXPHOS) (Dimeloe et al., 2017).

Las células T de memoria y *naïve* en reposo muestran un perfil metabólico en el cual tienen una alta dependencia a la OXPHOS, ya que esta vía metabólica les permite producir energía de manera eficiente. Desde el punto de vista bioenergético, OXPHOS maximiza la cantidad de ATP (Adenosina trifosfato) obtenida a partir de la glucosa, ya que produce hasta 36 moléculas de ATP por molécula de glucosa (Pearce et al., 2013).

Durante la activación de las células T también incrementa la fosforilación oxidativa, esto tiene como resultado un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS pueden actuar como segundos mensajeros para promover la proliferación de los linfocitos T. Además del aumento de OXPHOS, durante la activación de las células T también se incrementa su masa mitocondrial (Dimeloe et al., 2017).

### 1.3.5 Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno se generan en la cadena transportadora de electrones (ETC) durante la fosforilación oxidativa; pero también se pueden producir en respuesta a factores como citocinas, señales hormonales o inmunológicas y cambios en el pH y presión de oxígeno. Las ROS son moléculas de vida corta y altamente reactivas que derivan de la reducción química del oxígeno. Las ROS pueden ser radicales libres como el anión super óxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) y el radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>) o moléculas no radicales como el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Redza-Dutordoir & Averill-Bates, 2016).



Las ROS participan en la regulación de funciones fisiológicas como la proliferación, diferenciación y progresión del ciclo celular. Sin embargo, niveles excesivos de ROS intracelulares pueden ser perjudiciales y desencadenar estrés oxidativo. Altos niveles de ROS pueden dañar proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y organelos como las mitocondrias, lo cual puede provocar la activación de procesos de muerte como la apoptosis (Redza-Dutordoir & Averill-Bates, 2016).

En los linfocitos T puede haber un aumento en la producción de ROS debido a la saturación de la cadena transportadora de electrones, esto como consecuencia de una estimulación sostenida. Las especies reactivas de oxígeno desempeñan un papel fundamental en las células T, ya que estimulan la biosíntesis de nucleótidos y la entrada de las células a la fase S del ciclo celular. De esta manera, ROS actúa como segundo mensajero, indicando que existen las condiciones energéticas necesarias para que los linfocitos T proliferen (Jones & Thompson, 2007). Aunado a esto, las ROS también inducen la producción de IL-2, lo cual promueve la proliferación de los linfocitos T (Dimeloe et al., 2017).

### **1.3.6 Reprogramación metabólica de los linfocitos T**

La activación de las células T conduce a la proliferación, diferenciación y ejecución de sus funciones efectoras, durante este proceso, las células se someten a una reprogramación metabólica. Entendiendo por reprogramación metabólica, como capacidad que tienen los linfocitos T para cambiar de un metabolismo predominantemente oxidativo a uno predominantemente glucolítico, de acuerdo con los requerimientos energéticos que presentan en sus etapas de diferenciación (Yin et al., 2019).

Los linfocitos T en reposo oxidan lípidos, aminoácidos y el piruvato derivado de la glucosa para producir energía en forma de ATP a través de la fosforilación oxidativa (OXPHOS). Tras la activación, disminuye la oxidación de lípidos, pero aumenta la glucólisis, la oxidación de glutamina, la función mitocondrial y la síntesis de lípidos (Maclver et al., 2013).

De acuerdo con su estado de diferenciación, los linfocitos T se dividen en células T *naïve*, efectoras y de memoria. Cada una de estas poblaciones celulares tiene demandas energéticas distintas que deben ser cubiertas por el metabolismo (Yin et al., 2019). Los linfocitos T *naïve* descritos como CD45RA+ CD27+, son células que no han tenido ningún contacto antigénico y que presentan un alto potencial proliferativo. Cuando se encuentran en reposo obtienen energía principalmente a través de OXPHOS (O'Sullivan & Pearce, 2015).

La transición de célula T *naïve* en reposo a célula T efectora (CD45RA+ CD27-) activada y altamente proliferativa requiere un cambio metabólico. Si bien debido a la activación hay un aumento en la función y masa mitocondrial, los linfocitos T efectores utilizan principalmente la glucólisis aerobia para cubrir sus necesidades energéticas y para producir las citocinas involucradas en la destrucción de la célula blanco (O'Sullivan & Pearce, 2015).

La transición a células T de memoria implica nuevamente cambios en el metabolismo. Los linfocitos T de memoria se subdividen en células de memoria central (CD45RA- CD27+) y memoria efectora (CD45RA- CD27-). Los linfocitos de memoria central pueden secretar altos niveles de IL-2, mientras que los linfocitos T de memoria efectora tienen un alto potencial citotóxico, junto con la producción de citocinas inflamatorias como IFN- $\gamma$  (Prado & Sandoval, 2020). Los linfocitos T de memoria realizan preferentemente OXPHOS, adicionalmente muestran una masa mitocondrial elevada y mantienen una capacidad respiratoria de repuesto (SRC) (O'Sullivan & Pearce, 2015). Entendiendo a la SRC como la capacidad mitocondrial extra que tiene una célula para producir energía en condiciones de mayor trabajo o estrés y que se relaciona con la capacidad de las células T de memoria para responder rápidamente ante un reencuentro antigénico (van der Windt et al., 2012).

## **1.4 Mitocondria y dinámica mitocondrial en linfocitos T**

Las mitocondrias son organelos celulares que cumplen con diversas funciones, clásicamente son conocidas por estar implicadas en procesos bioenergéticos como la generación de ATP a través de OXPHOS. Sin embargo, también participan en la señalización de calcio, oxidación de ácidos grasos y regulación de la apoptosis, ciclo celular y respuesta inmune (Scott & Youle, 2010).

Las mitocondrias están conformadas por una matriz mitocondrial y dos membranas, una interna y otra externa. La matriz mitocondrial es el sitio donde se lleva a cabo el ciclo de Krebs, la replicación de DNA mitocondrial y la síntesis de proteínas mitocondriales. Cada membrana tiene diferente composición y función; la membrana mitocondrial interna (IMM) está conformada por crestas que son invaginaciones pleomórficas donde se lleva a cabo la fosforilación oxidativa. Por otro lado, la membrana mitocondrial externa (OMM), actúa como una barrera de difusión que alberga proteínas precursoras mitocondriales y media la transducción de señales dentro y fuera de la mitocondria (Giacomello et al., 2020).

### **1.4.1 Dinámica mitocondrial en células T**

La dinámica mitocondrial regula la forma, distribución y tamaño de las mitocondrias, es necesaria para satisfacer las necesidades fisiológicas de las células e involucra la biogénesis mitocondrial y ciclos coordinados de fusión y fisión (Ver Figura 1) (Scott & Youle, 2010). La fusión y fisión mitocondrial desempeñan un papel en el mantenimiento de la integridad mitocondrial, la renovación de las mitocondrias y segregación y protección de DNA mitocondrial (Berman et al., 2008).

En las células T la dinámica mitocondrial se ha relacionado con la vía metabólica que utilizan para obtener energía. Los linfocitos T efectores activados presentan un aumento en la fisión mitocondrial seguido del incremento del metabolismo

glucolítico. Por otro lado, los linfocitos T de memoria exhiben un aumento en la fusión mitocondrial y en consecuencia un incremento de OXPHOS (Angajala et al.,2018).



**Figura 1. Dinámica mitocondrial.** La dinámica mitocondrial regula la forma, distribución y tamaño de las mitocondrias para satisfacer las necesidades fisiológicas de las células. (Modificado de Alarcón y colaboradores, 2019)

## Biogénesis mitocondrial

La biogénesis mitocondrial es el crecimiento y división de las mitocondrias preexistentes, por lo que se caracteriza por el aumento en el tamaño y masa de estos organelos. La biogénesis es la respuesta a estímulos como restricción calórica, estrés oxidativo, división y diferenciación celular (Cherry & Piantadosi, 2015).

El principal regulador de este proceso es PGC-1 $\alpha$  (Coactivador 1-alfa del receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma), este coactivador coordina el genoma nuclear y el mitocondrial (Dorn et al., 2015). PGC-1 $\alpha$  activa diferentes factores de transcripción, entre los que destacan los factores respiratorios nucleares (NRF). Estos factores se encargan de regular positivamente la

transcripción de proteína mitocondriales, que sirven como bloques de construcción para la biogénesis mitocondrial (Jornayvaz, 2010).

La activación de las células T conduce a un aumento de la biogénesis mitocondrial que da como resultado un aumento de la masa mitocondrial y OXPHOS. Esto proporciona a la célula la energía necesaria para aumentar el tamaño celular y el contenido citoplasmático para llevar a cabo una alta tasa de proliferación celular (Souza et al., 2007).

### **Fusión mitocondrial**

La fusión mitocondrial implica la formación de una única mitocondria a partir de estructuras independientes (Scott & Youle, 2010). Es un proceso caracterizado en tres etapas: El anclaje de las mitocondrias, el acoplamiento de las membranas y la fusión de las membranas (Tilokani et al., 2018). El proceso de fusión mitocondrial está regulado por dos mitofusinas (Mfn1 y Mfn2) que se encuentran en la OMM y OPA1 (Proteína relacionada con atrofia óptica 1) que se localiza en la IMM. Las mitofusinas están involucradas en la unión de las mitocondrias, así como en la hidrólisis de GTP (Guanosina trifosfato), que induce cambios conformacionales que conducen a la fusión de las OMM (Giacomello et al., 2020); mientras que OPA1 coordina la fusión de la IMM e induce el alargamiento mitocondrial (Tilokani et al., 2018).

La fusión de mitocondrias en redes lineales o tubulares induce supercomplejos de ETC, lo cual aumenta la actividad de OXPHOS. De esta manera, la fusión favorece la producción de ATP y se relaciona con la progresión del ciclo celular. Por otro lado, las mitocondrias se alargan como un mecanismo de supervivencia en respuesta a la falta de nutrientes y estrés, por lo que también se vincula con la longevidad celular (Buck et al., 2016).

Las células T de memoria mantienen redes mitocondriales fusionadas y una mayor masa mitocondrial en comparación con las células T *naïve* o efectoras, esto

se ha relacionado con un aumento de OXPHOS y oxidación de ácidos grasos (FAO). En las células T de memoria OPA1 regula la organización de crestas mitocondriales estrechas. Esto facilita la actividad eficiente de ETC, lo que permite que la entrada de piruvato a las mitocondrias sea constante y que por lo tanto aumente OXPHOS (Buck et al., 2016). Además, la fusión mitocondrial puede aumentar la formación de crestas y por lo que proporciona una mayor superficie para realizar OXPHOS y FAO (Angajala et al.,2018).

### **Fisión mitocondrial**

La fisión mitocondrial es la separación de una mitocondria en dos o más organelos (Scott & Youle, 2010), es un proceso regulado principalmente por la proteína relacionada con la dinamina 1 (Drp1) (Giacomello et al., 2020). Drp1 se recluta y ancla en la OMM donde forma una estructura anular que conduce al estrechamiento de la membrana, marcando el sitio de escisión mitocondrial (Tilokani et al., 2018).

La fisión genera mitocondrias discretas y fragmentadas que pueden aumentar la producción de ROS y mediar la apoptosis (Buck et al., 2016). Drp1 puede mediar la liberación de citocromo *c* durante la apoptosis por vía intrínseca; sin embargo, este proceso va acompañado de la sobre expresión de las proteínas proapoptóticas Bax y Bak, por lo que la fisión mitocondrial por sí sola no necesariamente da como resultado la muerte celular (Sheridan & Martin,2010). Por otro lado, la fisión mitocondrial es un proceso necesario para llevar a cabo la distribución de mitocondrias durante la proliferación (Giacomello et al., 2020), pero también puede ser el resultado del daño prolongado al DNA (Angajala et al.,2018).

Los linfocitos T efectores activados presentan un aumento en la fisión y masa mitocondrial, pero una menor formación de crestas mitocondriales (Angajala et al.,2018). La fisión mitocondrial también provoca una expansión de las crestas, lo cual resulta en una disminución en la eficiencia del transporte de electrones debido a la separación física de los complejos de ETC. Esto provoca un desequilibrio redox debido a la acumulación de NADH en las mitocondrias y por lo

tanto una disminución del ciclo de Krebs y de la producción de ATP. Para restaurar el equilibrio redox y la producción de ATP, la glucólisis aerobia aumenta en las células T efectoras. El piruvato proveniente de la glucólisis es convertido a lactato para generar NAD<sup>+</sup> (Nicotamida Adenina Dinucleótido oxidado) en el citoplasma de las células. Finalmente, NAD<sup>+</sup> ingresa a las mitocondrias y de esta manera se restaura el equilibrio redox (Buck et al., 2016).

## **2. Antecedentes**

### **2.1 El microambiente tumoral modifica el metabolismo glucolítico y disminuye la función efectora de las células T**

A pesar de tener suficiente oxígeno para llevar a cabo OXPHOS, las células tumorales utilizan principalmente a la glucólisis aerobia para obtener energía en forma de ATP, este fenómeno es conocido como efecto Warburg. Como producto de la glucólisis realizada por las células tumorales aumenta el ácido láctico, la glutamina y el CO<sub>2</sub>, lo que resulta en la acidificación del microambiente tumoral. Además, las células tumorales también consumen una alta cantidad de oxígeno esto provoca que el microambiente tumoral se torne hipóxico (Yin et al., 2019).

La limitación de glucosa es una de las características más importantes del microambiente tumoral. Los linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) compiten con las células tumorales por la glucosa del medio, esta restricción nutrimental puede provocar que las células T se vuelvan hiporeactivas. Cuando la limitación de glucosa persiste, las células T pueden presentar un fenotipo exhausto (Prado & Sandoval, 2020). Este fenotipo es caracterizado por la disminución de las funciones efectoras de los linfocitos T y por la expresión de receptores coinhibitorios como PD1 (Receptor de muerte programada 1), LAG-3 (Gen 3 de activación de linfocitos) y TIM-3 (Inmunoglobulina de células T y dominio 3 de mucina) (Prado & Romero, 2020).

PD-1 es un receptor coinhibidor que se expresa en las células T, se encarga de regular la señalización del receptor de antígeno al interactuar con su ligando PD-L1. La señalización PD-L1/PD-1 es un mecanismo regulador que mantiene la homeostasis y protege contra la autoinmunidad (Prado et al., 2017). Sin embargo, cuando PD-L1 se expresa en las células tumorales media señales inhibitorias sobre las células T, lo cual tiene efectos perjudiciales sobre la inmunidad antitumoral (Patsoukis et al., 2015). La expresión de PD-1 en los linfocitos T depende de las condiciones microambientales. La adenosina producto del metabolismo tumoral, la hipoxia y una estimulación antigénica continua inducen



una mayor expresión de esta molécula en los linfocitos T (Allison & Coomber, 2017, Prado et al., 2017).

Cuando las células T son activadas, se enciende la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR (Fosfatidilinositol 3 cinasa/ Proteína cinasa B/ Objetivo de la rampamicina en mamíferos). Esto aumenta la expresión de transportadores de nutrientes como GLUT1 y promueve la glucólisis (Yin et al., 2019). Sin embargo, Patsoukis y cols., en el 2015, reportaron que las células T CD4+ que expresan PD-1 y son activadas con anticuerpos monoclonales anti-CD3, anti-CD28 y proteína de fusión PD-L1, tienen una menor expresión del transportador de glucosa GLUT1. Por lo tanto, las células T que expresan PD-1 tienen una menor captación de glucosa con respecto a las células que no lo expresan. Este fenómeno fue asociado con la regulación negativa de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR debido a la interacción de PD1 con su ligando (Patsoukis et al., 2015).

Las células T provenientes de líquido pleural de pacientes con cáncer de pulmón expresan niveles más altos de la molécula PD-1, en comparación con las células T provenientes de derrame pleural no maligno (Prado et al., 2017). Aunado a ello, Prado y cols., en el 2019, reportaron que tras la estimulación policlonal con anticuerpo anti-CD3, las células T provenientes de derrame pleural tanto maligno como no maligno, aumentaron la expresión de GLUT1. Sin embargo, los linfocitos T de memoria de derrame pleural no maligno que recibieron la señal de coestimulación a través de CD28, mostraron niveles de expresión de GLUT1 significativamente mayores, en comparación con las células estimuladas únicamente con anti-CD3. Por el contrario, las células T de memoria provenientes de derrame pleural maligno no lograron aumentar la expresión de GLUT1 tras la coestimulación con anti-CD28 (Prado et al., 2019).

Prado y cols., en el 2019, también evaluaron si los niveles de expresión de GLUT1 se correlacionaban con la captación de glucosa, emplearon el análogo fluorescente de glucosa 2-NBDG para cuantificar la incorporación de glucosa en las células T mediante citometría de flujo. Reportaron que las células T de memoria de derrame pleural maligno y no maligno aumentaron la captación de

glucosa tras la estimulación con anti-CD3 y con anti-CD3/CD28 en condiciones de normoxia e hipoxia. En derrame pleural no maligno, el porcentaje de células T de memoria 2-NBDG+ fue mayor en condiciones de hipoxia cuando se estimuló con anti-CD3/CD28. Por el contrario, en derrame pleural maligno el porcentaje células T de memoria 2-NBDG+ fue mayor cuando se estimuló únicamente con anti-CD3. Esto sugiere que cuando los linfocitos T provenientes de derrame pleural maligno se estimulan con anti-CD3/CD28 tienen defectos en la captación de glucosa. Estos defectos en la captación de glucosa podrían estar relacionados con una menor capacidad de los linfocitos T para proliferar, activarse o ejercer sus funciones efectoras (Prado et al., 2019).

Finalmente, Prado y cols., en el 2019, evaluaron la captación de glucosa en células T de memoria provenientes de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón. Reportaron que la captación de glucosa fue mayor cuando las células se estimularon con anti-CD3/CD28 tanto en condiciones de normoxia como hipoxia. Esto sugiere que la captación de glucosa se ve más afectada en las células T que se encuentran dentro del microambiente tumoral (Prado et al., 2019).

Los linfocitos T CD8+ provenientes de líquido pleural de pacientes con cáncer de pulmón muestran funciones efectoras disminuidas, ya que producen bajos niveles de perforinas y granzimas A (Prado et al., 2005). Aunque las células T provenientes de derrame pleural maligno expresan PD-1 y muestran funciones efectoras alteradas, es importante señalar que no presentan un fenotipo exhausto ya que no coexpresan TIM-3 y LAG-3 (Prado et al., 2017). En los linfocitos T el metabolismo glucolítico no es únicamente para producir energía en forma de ATP, también desempeña un papel importante en la proliferación y diferenciación de las células T. De esta manera, la disminución en la captación de glucosa que presentan los linfocitos T provenientes de paciente con cáncer de pulmón podría estar relacionada con la disminución de sus funciones efectoras (Yin et al., 2019).

## **2.2 Los linfocitos T infiltrantes de tumor presentan alteraciones en el metabolismo, dinámica mitocondrial y producción de ROS**

Los linfocitos T en reposo utilizan un metabolismo catabólico y predominantemente oxidativo, sin embargo, tras la activación, las células T regulan positivamente la expresión de transportadores de nutrientes como GLUT1 y aumenta el metabolismo glucolítico. Además, cuando las células T se activan sus mitocondrias se someten a un proceso de fragmentación y las crestas se condensan. De esta manera las mitocondrias siguen teniendo un papel fundamental durante la activación de las células T (Siska et al., 2017). Sin embargo, los linfocitos T que se someten a una estimulación crónica presentan mitocondrias alteradas que pueden relacionarse con la función deficiente de las células. Las células T que se encuentran en el microambiente tumoral pueden presentar deficiencias en el número o función de las mitocondrias (Bekermann et al., 2017).

En el 2016 Scharping y cols., reportaron que en modelo de melanoma murino los linfocitos T CD8+ infiltrantes de tumor presentaron una disminución en la masa mitocondrial y en la captación de glucosa. Aunado a ello, los linfocitos T CD8+ intratumorales también mostraron defectos en el consumo de oxígeno, una disminución en la producción de ROS y despolarización mitocondrial. Esto indicó que además de una disminución en la masa mitocondrial, los TILs también presentan una pérdida de la función mitocondrial y del metabolismo oxidativo. Estas alteraciones mitocondriales fueron asociadas con una menor biogénesis mitocondrial dada por la disminución en la expresión de PGC-1 $\alpha$  (Scharping et al., 2016).

Por otro lado, Siska y colaboradores en el 2017, reportaron que los TILs CD8+ provenientes de pacientes con carcinoma renal de células claras presentaban una alta masa mitocondrial y una expresión normal de PGC-1 $\alpha$ , sin embargo, sus mitocondrias eran pequeñas y fragmentadas. Además, los linfocitos T CD8+ infiltrantes de tumor presentaron mitocondrias hiperpolarizadas y una alta producción de ROS, pero una captación de glucosa deficiente. En conjunto todas estas alteraciones se correlacionaron con la expresión de moléculas cohibitorias

como PD-1, y con una capacidad limitada de las células T CD8+ para activarse y para ejercer su respuesta antitumoral (Siska et al., 2017).

Particularmente en cáncer de pulmón, Sandoval en el 2018, reportó que los linfocitos T CD8+ de memoria provenientes de derrame pleural maligno, mostraron una masa mitocondrial alta y una elevada producción de ROS, pero con mitocondrias despolarizadas. No obstante, cuando las células fueron estimuladas vía TCR (CD3) o coestimulación (CD3/CD28), presentaron una disminución en la masa mitocondrial y en la producción de especies reactivas de oxígeno. Dichos hallazgos sugirieron que las células T provenientes de derrame pleural maligno son insuficientes para mantener el metabolismo oxidativo, lo cual podría afectar el proceso de activación (Sandoval, 2018).

### **3. Justificación**

El metabolismo en las células T es esencial para ejercer sus funciones efectoras durante la respuesta inmunológica antitumoral. Aunque se han caracterizado algunas alteraciones metabólicas en células T de pacientes con cáncer de pulmón, existen pocos informes donde se relacionen estas alteraciones con el potencial efector o la capacidad para proliferar y activarse de las células. Estudiar dichos parámetros es necesario para determinar si las alteraciones metabólicas en las células T de pacientes con cáncer pulmonar están relacionadas con una disminución en su capacidad efectora. Determinar la relación que existe entre los cambios metabólicos y la proliferación, activación y capacidad efectora de los linfocitos T provenientes de pacientes con cáncer de pulmón, podría ayudar encontrar nuevos blancos terapéuticos que permitan desarrollar tratamientos para mejorar la supervivencia y calidad de vida de los pacientes.

#### **4. Pregunta de investigación**

¿Cuál es la relación que existe entre la captación de glucosa, la masa mitocondrial y la producción de ROS con la activación, proliferación y potencial efector de los linfocitos T provenientes de pacientes con cáncer de pulmón?

#### **5. Hipótesis**

Los linfocitos T provenientes de pacientes con cáncer de pulmón al ser estimulados vía TCR (CD3) y coestimulación (CD3/CD28) presentaran una disminución en la captación de glucosa, activación, proliferación, producción de ROS y expresión de CD107a, pero un aumento en la masa mitocondrial en comparación con las células T provenientes de sangre periférica de sujetos sanos y derrame pleural no maligno.

## **6. Objetivos**

### **6.1 Objetivo general**

Analizar los cambios asociados al metabolismo glucolítico y masa mitocondrial en linfocitos T provenientes de sangre periférica y derrame pleural de pacientes con cáncer de pulmón. Determinar la relación que existe entre la masa mitocondrial, la producción de especies reactivas de oxígeno y la captación de glucosa con la activación, proliferación y expresión de CD107a en las células T.

### **6.2 Objetivos particulares**

- Analizar las diferencias en el metabolismo de las células T CD4+ y CD8+ provenientes de sangre periférica y líquido pleural de pacientes con cáncer de pulmón, derrame pleural no maligno y sangre periférica de sujetos sanos.
- Analizar la masa mitocondrial, producción de especies reactivas de oxígeno, activación, proliferación y captación de glucosa, en condiciones sin estímulo, así como estimuladas vía TCR y coestimulación (Anti-CD3/CD28).
- Analizar la expresión de la molécula CD107a en las poblaciones con alta y baja masa mitocondrial en las células T CD4+ y CD8+ provenientes de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón y sujetos sanos.

## **7. Materiales y Métodos**

### **7.1 Población estudiada**

En la población estudiada se incluyeron 12 pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar, 4 mesoteliomas epiteloides y un carcinoma pulmonar; de los cuales se obtuvieron 12 muestras de sangre periférica y 7 de líquido pleural. Como controles se incluyeron 6 muestras de líquido pleural de pacientes con derrame pleural no maligno, de los cuales 5 fueron originados por tuberculosis y uno por hemotórax izquierdo. Además, se incluyeron 9 muestras de sangre periférica proveniente de sujetos sanos, es decir que no tenían diagnóstico de cáncer pulmonar, ni de infecciones crónicas o agudas o procesos inflamatorios al momento de la toma de muestra.

### **7.2 Procesamiento de las muestras biológicas**

Las muestras de sangre periférica y líquido pleural se obtuvieron de pacientes que asistieron a consulta en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” y que dieron su consentimiento para utilizar las muestras biológicas con fines de investigación. El Comité de Bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” aprobó el protocolo para la obtención de estas muestras biológicas con el número B07-13. Las muestras fueron tomadas y criopreservadas previo al año 2020, por lo que los pacientes y donadores fueron negativos a SARSCoV2.

Las muestras de sangre periférica se procesaron mediante un gradiente de Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Axis-Shield, Oslo, Noruega). El procedimiento consistió en colocar Ficoll y sangre en proporción 1:2 y luego centrifugar a 1300 rpm durante 35 minutos. Por otro lado, el líquido pleural se obtuvo por toracocentesis por personal médico adscrito al hospital y se procesó mediante un doble gradiente de ficoll. Las células mononucleares (CMN) se recuperaron de la interfase y posteriormente se centrifugaron con medio RPMI-1640 (Medio Roswell Park



Memorial Institute) (Sigma-Aldrich, St.LouisMo,USA) sin glucosa a 1600 rpm durante 12 minutos. Las células obtenidas fueron criopreservadas con DMSO al 10% (Dimetilsulfóxido)/Suero Bovino Fetal, a una temperatura de -70°C.

### **7.3 Cultivo celular y estimulación de las células mononucleares**

Las CMN se descongelaron a 37°C en baño María, el contenido del criotubo se transfirió a un tubo cónico con 7 mL de medio RPMI- 1640 y se centrifugó a 1600 rpm durante 12 minutos. El paquete celular se resuspendió en medio RPMI-1640, el conteo de células y la evaluación de la viabilidad se realizó en una cámara de Neubauer utilizando el colorante vital azul de tripano.

Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% (HyClone,Utah,USA) y antibióticos (100µg/mL estreptomicina y 100U/mL de penicilina) en placas de 96 pozos (Thermo Scientific) bajo tres condiciones: Sin estimular, estimuladas con anticuerpo anti-CD3 agonista (Anti-Human CD3 Functional Grade Purified, clona UCHT1, eBioscience, USA) o con anticuerpos anti-CD2, anti-CD3 y anti-CD28 adsorbidos a perlas de látex (kit T Cell Activation/Expansion Miltenyi Biotec, CA, USA). Las CMN se incubaron durante 24 o 96 horas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>.

Para la estimulación de las células con anticuerpo anti-CD3, una placa de 96 pozos fue sensibilizada con el anticuerpo durante 90 minutos a 37°C a una concentración de 10 µg/mL, con un volumen final de 50 µL por pozo. Para el cultivo celular se colocaron 200 µL de una suspensión de 1X10<sup>6</sup> células/mL en cada pozo. Mientras que para realizar el estímulo con moléculas de coestimulación adsorbidas a perlas de latex, se colocaron 2.5 µL de perlas en 50 µL de medio RPMI-1640 y se mezcló con una suspensión de 5X10<sup>6</sup> células/mL en un volumen final de 200 µL con medio RPMI-1640.

#### **7.4 Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno en linfocitos T provenientes de sangre periférica y líquido pleural**

Para evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno se empleó el reactivo DCFDA (2',7'-diacetato de diclorofluorescina) (Abcam, USA), una sonda fluorescente que entra a la célula por difusión pasiva. DCFDA es una molécula que se encuentra reducida y que una vez dentro de la célula es oxidada por las especies reactivas de oxígeno, dando lugar a DCF (2', 7'-diclorofluoresceína) la forma oxidada y fluorescente de la molécula.

Después del cultivo celular de 24 horas, se recuperaron las células y se lavaron con PBS (Buffer de fosfatos salino, pH= 7.2), se centrifugó 1600 rpm durante 7 minutos. Las CMN se incubaron con el reactivo DCFDA a una concentración de 2  $\mu$ M en un volumen final de 200  $\mu$ L. Las células se incubaron durante 20 minutos a 37°C en atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>. Se realizó un paso de lavado con PBS para retirar el exceso de reactivo y se realizó la inmunofenotipificación de las células.

Como se muestra en la Tabla 1, para la inmunofenotipificación de las células se identificaron las moléculas CD3, CD4, CD8, CD27 y CD45RA; mientras que CD137 fue empleado como un marcador de activación para las células T. Las células se incubaron con una mezcla de anticuerpos acoplados a diferentes marcas fluorescentes en un volumen final de 200  $\mu$ L, la incubación se realizó durante 20 minutos a temperatura ambiente, protegiendo de la exposición de la luz. Después se realizó un paso de lavado con medio RPMI-1640.

Para discriminar a las células que se encontraban en proceso de apoptosis, las CMN se resuspendieron en una mezcla de buffer HEPES/Anexina V (Biolegend, CA, USA) y se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente, protegiendo de la exposición a la luz. Luego se agregaron 100  $\mu$ L de una solución de DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) (Biolegend, CA, USA) en buffer HEPES a una concentración 1  $\mu$ M. DAPI es una sonda fluorescente que permite evaluar la viabilidad ya que se une al DNA de las células que tienen la integridad de la membrana celular comprometida. Las células fueron adquiridas en el citómetro FACSAria II (BD Biosciences, USA) con el programa FACS Diva. Los

experimentos, así como la adquisición de los datos fue realizada por nuestro grupo de trabajo.

Tabla 1. Anticuerpos empleados en la inmunofenotipificación para determinar la producción de ROS en células T

Anticuerpo	Marca fluorescente	Clona	Casa comercial	Dilución
Anti-CD3	PE eFluor 610	UCHT1	eBioscience	1:100
Anti-CD4	Alexa 700	OKT4	BioLegend	1:100
Anti-CD8	APC Cy7	Sk1	BioLegend	1:100
Anti-CD27	Brian Violet 510	M-T271	BioLegend	1:100
Anti-CD45RA	PE Cy7	HI100	BioLegend	1:200
Anti-CD137	PE	4B4-1	BioLegend	1:100

APC: Alofococianina, APC Cy7: Fluorocromos en tándem de APC y cianina 7, PE: Ficoeritrina, PE Cy7: Fluorocromos en tándem de PE y cianina 7.

## **7.5 Análisis de la proliferación, masa mitocondrial y captación de glucosa en linfocitos T provenientes de sangre periférica**

### **7.5.1 Evaluación de la proliferación de linfocitos T provenientes de sangre periférica**

Como marcador de proliferación se utilizó el reactivo Cell Trace Violet (CTV) (Invitrogen, USA), una sonda fluorescente que entra al citoplasma de las células por difusión pasiva, donde se une de forma covalente al grupo amino de las proteínas. La proliferación se observa como una disminución en escala logarítmica de la fluorescencia.

Previo a colocar el estímulo en las células, la suspensión celular se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL con PBS. Las CMN se incubaron con CTV a una concentración de  $0.5 \mu\text{M}$ , por 10 minutos a  $37^\circ$ ; para detener la reacción y eliminar el reactivo en exceso, se agregaron 4 mL de medio RPMI-1640 suplementado a  $4^\circ\text{C}$  y se incubó en hielo durante 5 minutos, luego, como paso de lavado se centrifugó a 1600 rpm durante 7 minutos. El paquete celular se

resuspendió con medio RPMI-1640 para tener una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL. Se cultivaron células en condiciones sin estímulo y estimuladas con perlas de activación (anticuerpo anti-CD2, anti-CD3 y anti-CD28) y se incubaron durante 96 horas a  $37^\circ\text{C}$  en atmósfera húmeda con  $5\% \text{CO}_2$ .

### **7.5.2 Evaluación de la masa mitocondrial en linfocitos T provenientes de sangre periférica**

El contenido de masa mitocondrial se determinó utilizando el reactivo MitoTracker Red (Invitrogen, USA), una sonda fluorescente que entra a la célula por difusión pasiva, se oxida y se acumula en la matriz mitocondrial al interactuar con el grupo tiol de las proteínas.

Posterior al cultivo celular, se recuperaron las células y se lavaron con PBS pH 7.2, se centrifugó 1600 rpm durante 7 minutos. Las CMN a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL, se incubaron con el reactivo MitoTracker Red a una concentración de 50 nM, por 20 minutos a  $37^\circ\text{C}$  en atmósfera húmeda con  $5\% \text{CO}_2$ . Se realizó un paso de lavado con PBS para retirar el exceso de reactivo y se realizó la tinción para evaluar la captación de glucosa.

### **7.5.3 Evaluación de la captación de glucosa en linfocitos T provenientes de sangre periféricas**

La captación de glucosa se evaluó utilizando el reactivo 2-NBDG (2-desoxi-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il) amino]-D-glucosa) (Cayman chemical, USA), un análogo fluorescente de la glucosa. Una suspensión de  $1 \times 10^6$  células/mL en medio RPMI-1640 libre de glucosa, se incubó con el reactivo 2-NBDG a una concentración de  $50 \mu\text{M}$  durante 45 minutos a  $37^\circ\text{C}$  en atmósfera húmeda con  $5\% \text{CO}_2$ . Para detener la reacción y eliminar el exceso de reactivo las células se lavaron con PBS/BSA 1% (Albúmina sérica bovina), 0.1% w/v azida de sodio

(NaN<sub>3</sub>). Finalmente, las CMN se resuspendieron en 200 µL de una mezcla de anticuerpos para realizar la inmunofenotipificación.

Como se muestra en la Tabla 2, para la inmunofenotipificación de las células se identificaron las moléculas CD3, CD4, CD8, CD27 y CD45RA, para ello se empleó una mezcla de anticuerpos acoplados a diferentes marcas fluorescentes. Las células se incubaron con la mezcla de tinción en un volumen final de 200 µL, la incubación se realizó durante 20 minutos a temperatura ambiente, protegiendo de la exposición de la luz. Después se realizó un paso de lavado con PBS/BSA 1% NaN<sub>3</sub> y las células se resuspendieron en 200 µL de una dilución (1:50) de 7-AAD (7-amino actinomicina D) (Biolegend, CA, USA) un marcador de viabilidad que se intercala con el DNA y que permean sólo en células que tienen la integridad de la membrana celular comprometida. Las células fueron adquiridas en el citómetro FACSAria II (BD Biosciences, US) con el programa FACS Diva. Los experimentos, así como la adquisición de los datos fue realizada por nuestro grupo de trabajo.

Tabla 2. Anticuerpos empleados en la inmunofenotipificación para determinar la proliferación, masa mitocondrial, captación de glucosa y degranulación de las células T

Anticuerpo	Marca fluorescente	Clona	Casa comercial	Dilución
Anti-CD3	PE eFluor 610	UCHT1	eBioscience	1:400
Anti-CD4	Alexa 700	OKT4	BioLegend	1:200
Anti-CD8	APC/Fire 750	Sk1	BioLegend	1:200
Anti-CD27	PE	M-T271	BioLegend	1:200
Anti-CD45RA	PE Cy7	HI100	BioLegend	1:1000

APC: Alociocianina, PE: Ficoeritrina, PE-Cy7: fluorocromo en tándem de ficoeritrina y cianina 7

### **7.6 Evaluación de la degranulación y masa mitocondrial en linfocitos T provenientes de sangre**

Las CMN, se descongelaron a 37°C en baño María, el contenido del criotubo se transfirió a un tubo cónico con medio RPMI- 1640 y se realizó un paso de lavado, se centrifugó a 1600 rpm durante 12 minutos. El paquete celular se resuspendió

en medio RPMI- 1640, el conteo de células y la evaluación de la viabilidad se realizó en una cámara de Neubauer utilizando el colorante vital azul de tripano.

La suspensión de CMN se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL con medio RPMI-1640 suplementado y se colocaron 150  $\mu$ L de esta suspensión en cada pozo. Las células se incubaron en placas de 96 pozos bajo dos condiciones: Sin estímulo y estimuladas con CytoStim (MACS Miltenyi Biotec, Alemania) a una concentración de 20  $\mu$ L/mL. CytoStim es un estímulo rápido que actúa de manera similar a un super antígeno, activa a las células T vía TCR y provoca la secreción de citocinas efectoras en pocas horas. Para evaluar la degranulación de los linfocitos T, las CMN se incubaron junto con 2.5  $\mu$ L de anticuerpo Anti-CD107a (APC) (H4A3, BioLegend) por pozo. Las células se incubaron durante 4 horas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>.

Posterior a la incubación, se recuperaron las células y se lavaron con PBS pH 7.2. Para evaluar la masa mitocondrial las CMN se incubaron con el reactivo MitoTracker Green a una concentración de 0.2  $\mu$ M, por 20 minutos a 37°C en atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>. Se realizó un paso de lavado con PBS/BSA 1% para retirar el exceso de reactivo y finalmente, las CMN se resuspendieron en 200  $\mu$ L de una mezcla de anticuerpos para realizar la inmunofenotipificación.

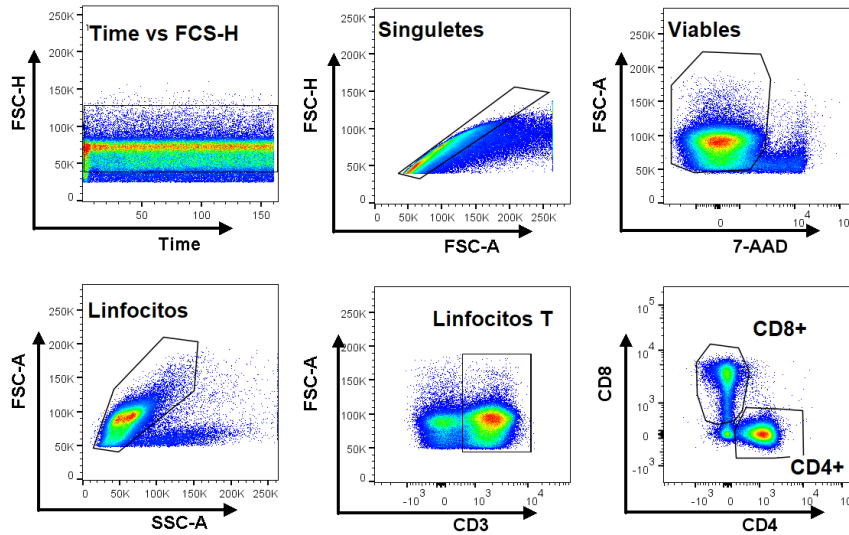
De acuerdo con lo que se muestra en la Tabla 2, para la inmunofenotipificación de las células se identificaron las moléculas CD3, CD4, CD8, CD27 y CD45RA, para ello se empleó una mezcla de anticuerpos acoplados a diferentes marcas fluorescentes. Las células se incubaron con la mezcla de tinción en un volumen final de 200  $\mu$ L, la incubación se realizó durante 20 minutos a temperatura ambiente, protegiendo de la exposición de la luz. Después se realizó un paso de lavado con de PBS/BSA 1% NaN<sub>3</sub>; para evaluar la viabilidad las células se resuspendieron en 200  $\mu$ L de una dilución (1:50) de 7-AAD. Las células fueron adquiridas en el citómetro FACS Aria II (BD Biosciences, US) con el programa FACS Diva. Los experimentos, así como la adquisición de los datos fue realizada por nuestro grupo de trabajo.

## **7.7 Análisis de resultados**

Los datos obtenidos mediante los ensayos de citometría de flujo fueron analizados en el programa FlowJo™ v10.7.1. El análisis de la proliferación, masa mitocondrial y captación de glucosa se realizó mediante un análisis supervisado. Los datos de producción de ROS y del marcador de activación CD137, así como la evaluación de la degranulación y de la masa mitocondrial en células T se analizaron mediante un análisis no supervisado.

### **7.7.1 Análisis supervisado**

El análisis citométrico que se siguió para los ensayos de proliferación, masa mitocondrial y captación de glucosa, se ilustra en la Figura 2. Primero se seleccionaron a las células que se adquirieron de manera uniforme en el citómetro, para ello se realizó el gráfico de tiempo contra el parámetro de tamaño en altura (Time vs FSC-H). De esta región, se seleccionaron las células individuales o singuletes en la gráfica de tamaño en área contras altura (FSC-A vs FSC-H). A partir de la región resultante, las células viables (7-AAD-) fueron seleccionadas con el gráfico 7-AAD vs FSC-A. Luego, se seleccionó la región de linfocitos de acuerdo con los parámetros de tamaño (FSC-A) y granularidad (SSC-A). De esta última región se seleccionaron a los linfocitos T (CD3+) en la gráfica CD3 vs FSC-A; finalmente de esta región se analizaron las poblaciones de interés que correspondió a linfocitos T CD4+ y CD8+.

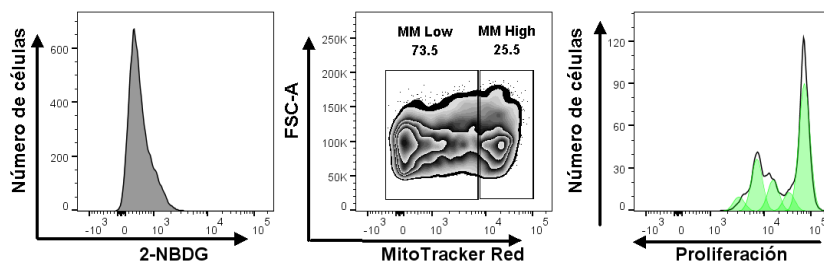


**Figura 2. Análisis citométrico para determinar las regiones de linfocitos T CD4+ y CD8+.** Gráficos representativos de los datos de proliferación, masa mitocondrial y captación de glucosa en linfocitos T provenientes de sangre periférica.

Como se muestra en la Figura 3, de las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ totales, se analizó el contenido de masa mitocondrial mediante los valores de intensidad media de fluorescencia (MFI) para MitoTracker Red, también se determinó el porcentaje de las poblaciones con alta (MM<sup>High</sup>) y baja masa mitocondrial (MM<sup>Low</sup>). La captación de glucosa se analizó mediante los valores de MFI para 2-NBDG en las células T CD4+ y CD8+ proliferando y sin proliferar. Para el análisis de proliferación se utilizó la herramienta que proporciona el programa FlowJo™ v10.7.1, y para evaluar la proliferación de las células T, se analizaron los valores de índice de proliferación y porcentaje de células divididas que brinda el modelo de proliferación.

El análisis estadístico de los datos se realizó en el software GraphPad Prism 9.1.1. Se realizó una prueba de Shapiro-Wilk para contrastar la normalidad de los datos, los cuales resultaron tener una distribución normal  $p > 0.05$ . Para determinar si existía diferencia significativa entre los grupos de datos se realizó una prueba t de Student, considerando un valor de  $p < 0.05$  estadísticamente significativo.





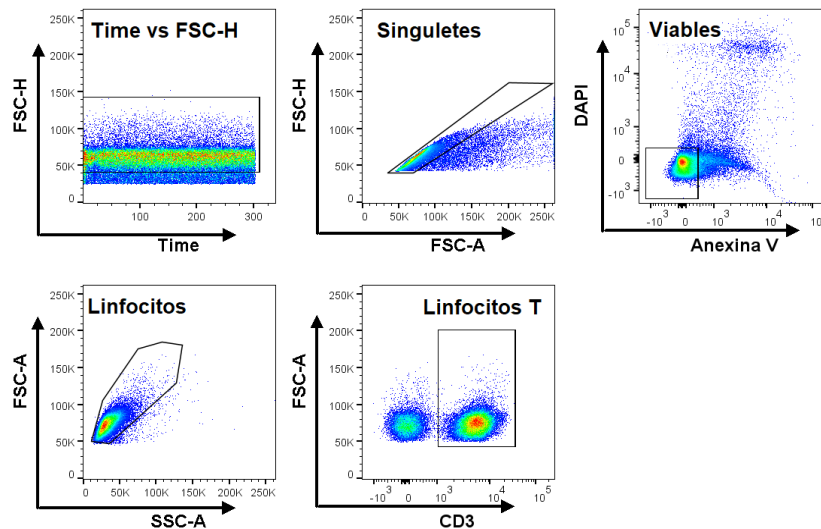
**Figura 3. Análisis de la proliferación, masa mitocondrial y captación de glucosa en linfocitos T CD4+ y CD8+ provenientes de sangre periférica.** Linfocitos T CD8+ estimulados con perlas de coactivación durante 96h.

### 7.7.2 Análisis no supervisado

Los datos de producción de ROS y del marcador de activación CD137, así como la evaluación de la degranulación y de la masa mitocondrial en células T se analizaron mediante un análisis no supervisado. Se empleó una técnica de reducción dimensional no lineal UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection, por sus siglas en inglés). El UMAP permite representar los datos originales en dos dimensiones mediante el uso de una combinación lineal de vectores, que son generados a partir de las características originales de los datos (Palit et al., 2019 & Filipovic et al., 2019). Para realizar este tipo de análisis las muestras deben haber sido teñidas con el mismo panel de anticuerpos y sondas fluorescentes y, además, haber sido adquiridas preferentemente en el mismo citómetro y con la misma configuración del equipo.

Esta estrategia de análisis incluyó una etapa de preanálisis, en la cual se seleccionó la población de linfocitos T CD3+. En la Figura 4 se ilustra la estrategia de preanálisis. Primero se realizó el gráfico Time vs FSC-H para seleccionar a las células adquiridas de manera uniforme en el citómetro; luego, en la gráfica FSC-A vs FSC-H se seleccionaron los singuletes. A partir de la región resultante se seleccionaron las células viables, para el análisis de degranulación y masa mitocondrial se empleó el gráfico 7-AAD vs FSC-A; mientras que para el análisis de producción de ROS y CD137 se utilizó el gráfico Anexina V vs DAPI. Después se elaboró la región de linfocitos en la gráfica de tamaño y granularidad (SSC-A vs

FSC-A). De esta última región se seleccionaron a los linfocitos T CD3+ en la gráfica CD3 vs FSC-A.



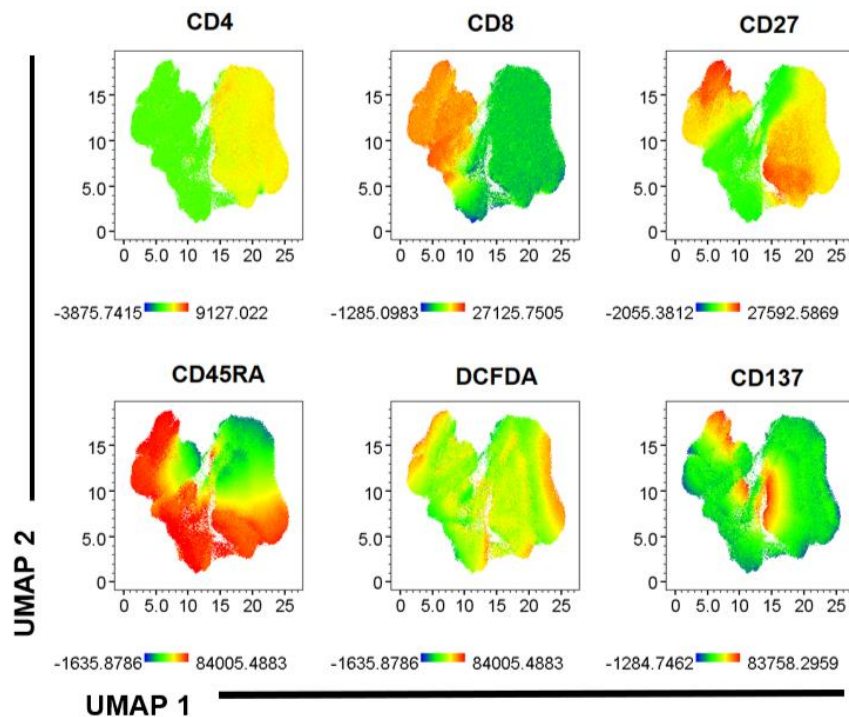
**Figura 4. Preanálisis de datos para seleccionar a la región de linfocitos T.** Gráficos representativos del análisis de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y del marcador de activación CD137 en células T provenientes de sangre periférica.

Para realizar el análisis no supervisado se emplearon los *plugins* de FlowJo™ v10.7.1. (Descargados de <https://www.flowjo.com/exchange/#/>). Se uniformó el número de eventos en las muestras utilizando el *plugin* llamado DownSample (v3.3) y luego se concatenaron las muestras. El análisis de los datos se ejecutó utilizando el *plugin* UMAP (v3.1).

Para el análisis de producción de ROS y CD137 se concatenaron diez mil eventos de la región de linfocitos T CD3+ por cada muestra en las diferentes condiciones. El análisis se realizó en dos grupos, el grupo de sangre periférica incluyó 2 muestras de sujetos sanos y 5 provenientes de pacientes con cáncer de pulmón; mientras que el grupo de derrame pleural incluyó 7 muestras de derrame pleural maligno y 6 de derrame pleural no maligno. Cada muestra se incluyó en condiciones sin estímulo y estimuladas con anti-CD3 o con perlas de coestimulación.

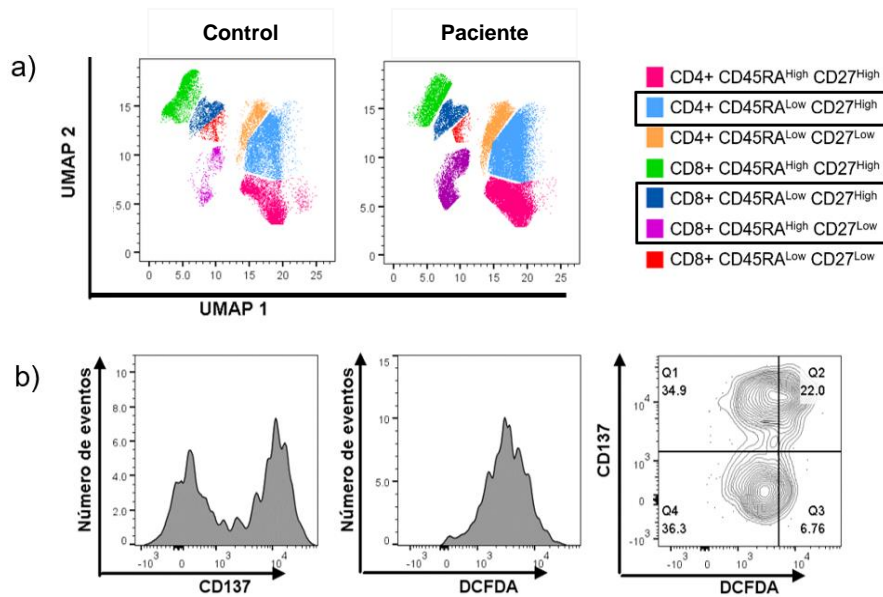
El cálculo de UMAP se ejecutó sobre los grupos concatenados y tal como se muestra en la Figura 5, se generaron proyecciones del análisis UMAP. En estos

gráficos los eventos se encuentran agrupados en *clusters* de acuerdo con sus características, en este caso, la expresión de ciertos marcadores o la incorporación de las sondas fluorescentes.



**Figura 5. Análisis de reducción dimensional UMAP para el conjunto de datos de producción de ROS y expresión de CD137.** Gráficos UMAP para el grupo concatenado de sangre periférica, el nivel de expresión de cada uno de los marcadores se indica en la escala inferior de cada gráfico.

Tal como se muestra en la Figura 6, el análisis de los gráficos UMAP se realizó por grupo de muestras, es decir para el conjunto de muestra provenientes de los controles (Sujetos sanos y derrame pleural no maligno) o pacientes con cáncer de pulmón en las diferentes condiciones (Sin estímulo y estimuladas con anti-CD3 o con perlas de coestimulación). De acuerdo con la expresión de los marcadores CD27 y CD45RA, se seleccionaron las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ de memoria central (CD45RA<sup>Low</sup>, CD27<sup>High</sup>) en líquido pleural y sangre periférica, y linfocitos T CD8+ efectores (CD45RA<sup>High</sup>, CD27<sup>Low</sup>) únicamente en sangre periférica. A partir de estos *clusters* se analizó la producción ROS y la expresión de CD137 mediante los valores de MFI para DCFDA y para el marcador CD137.



**Figura 6. Proyecciones UMAP de los datos de producción de ROS y expresión de CD137 mostrando grupo Control y Paciente.** a) Grupo de sangre periférica: Gráficos UMAP para los grupos Control y Paciente en condiciones de estímulo por 24h con anti-CD3, los *clusters* fueron asignados de manera manual. b) Análisis de la producción de ROS y de la expresión de CD137 para el *cluster* CD8+ CD45RA<sup>High</sup> CD27<sup>Low</sup> del grupo control en condiciones de estímulo.

Para el análisis de degranulación y masa mitocondrial se concatenaron treinta mil eventos de la región de linfocitos T CD3+ por cada muestra en las diferentes condiciones. El análisis se realizó en dos grupos (Sin estímulo y CytoStim), cada grupo incluyó 7 muestras de sangre periférica de sujetos sanos y 6 provenientes de pacientes con cáncer de pulmón. El cálculo de UMAP se ejecutó sobre los grupos concatenados y tal como se muestra en la Figura 7, se generaron las proyecciones del análisis UMAP.

Como se presenta en la Figura 8, el análisis de los gráficos UMAP se realizó para los grupos de Paciente y Control. De acuerdo con la expresión de los marcadores CD27 y CD45RA, se seleccionaron las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ de memoria central (CD45RA<sup>Low</sup>, CD27<sup>High</sup>) y linfocitos T CD8+ efectores (CD45RA<sup>High</sup>, CD27<sup>Low</sup>). A partir de estos *clusters* se analizó el contenido de masa mitocondrial y la expresión de CD107a mediante los valores de MFI para MitoTracker Green y para el marcador CD107a.

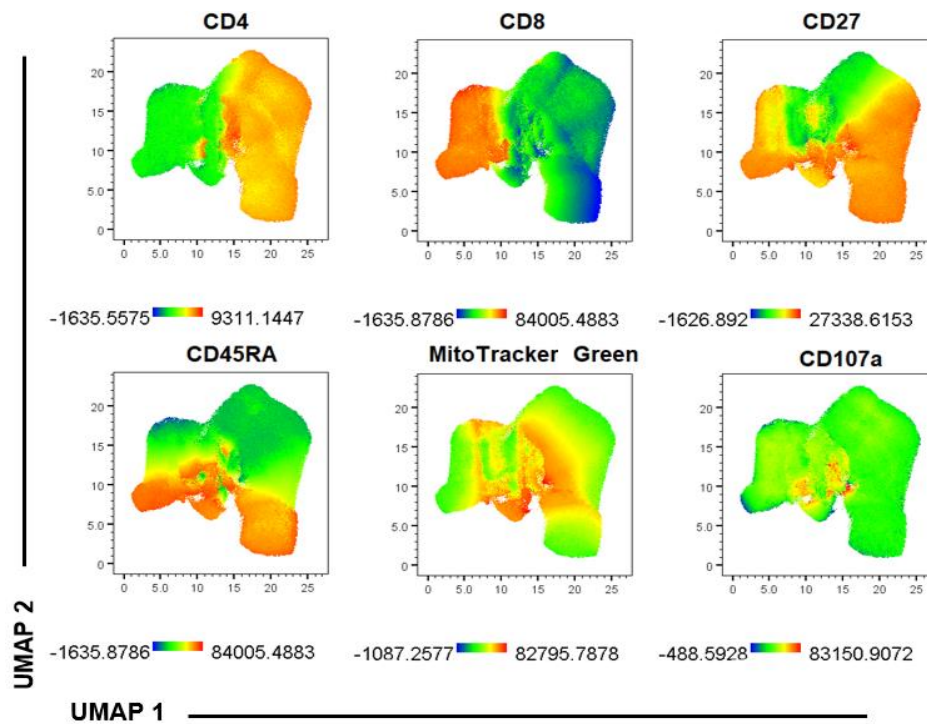


Figura 7. Análisis de reducción dimensional UMAP para conjuntos de datos de masa mitocondrial y expresión de CD107a, en linfocitos T provenientes de sangre periférica. Gráficos UMAP para el grupo sin estímulo, el nivel de expresión de cada uno de los marcadores se indica a la escala inferior de cada gráfico.

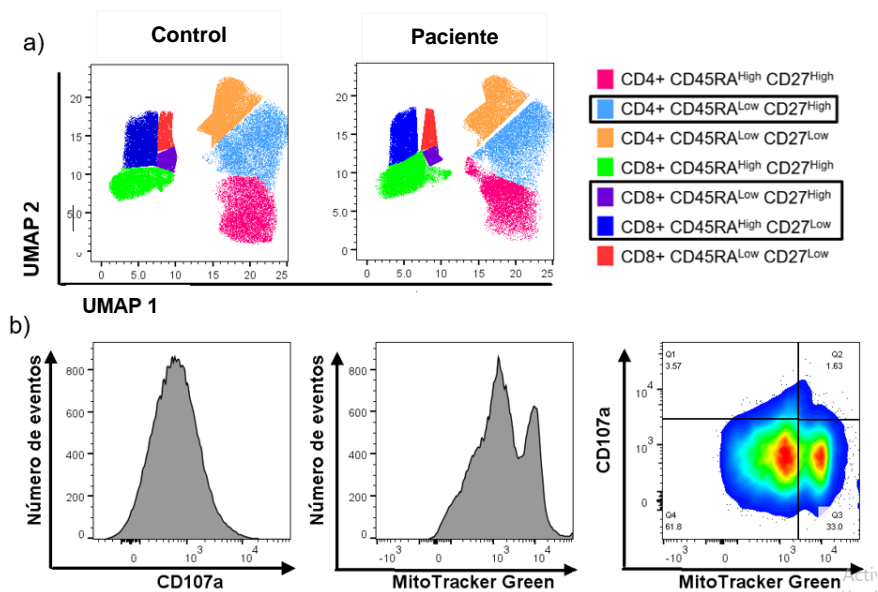


Figura 8. Proyecciones UMAP de los datos de masa mitocondrial y expresión de CD107a mostrando grupo Control y Paciente. a) Grupo sin estímulo: Gráficos UMAP para los subgrupos Control y Paciente, los *clusters* fueron asignados de manera manual. b) Análisis de la masa mitocondrial y de la expresión de CD107a para el *cluster* CD4+ CD45RA<sup>Low</sup> CD27<sup>High</sup> del subgrupo Control en condiciones sin estímulo.

## 8. Resultados

### 8.1 Características de la población

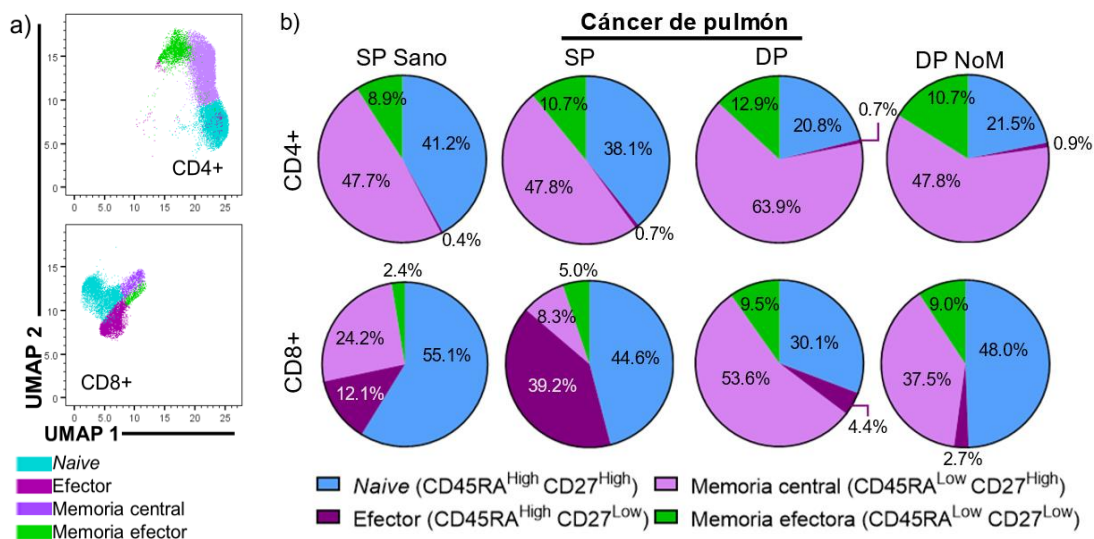
Se analizaron muestras de líquido pleural y sangre periférica provenientes de 17 pacientes con diagnóstico de cáncer de pulmón. Se obtuvieron 12 muestras de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón, de las cuales 10 fueron pacientes masculinos y 2 femeninos; la edad promedio de los pacientes fue de  $60 \pm 13$  años. Como controles se emplearon 9 muestras de sangre periférica de sujetos sanos, de los cuales 5 personas fueron del género masculino y 4 del género femenino; el promedio de edad fue de  $48 \pm 16$  años.

Se obtuvieron 7 muestras de derrame pleural maligno proveniente de pacientes con cáncer de pulmón, de las cuales 6 fueron de pacientes masculinos y una de paciente femenina; el promedio de edad fue de  $57 \pm 14$  años. Como control se emplearon 6 muestras de derrame pleural no maligno proveniente de pacientes con tuberculosis y hemotórax izquierdo, de los cuales 5 fueron de pacientes masculinos y una paciente femenina; la edad promedio de los pacientes fue de  $38 \pm 24$  años.

Se realizó una prueba de Shapiro-Wilk para contrastar la normalidad de los datos, los cuales resultaron tener una distribución normal  $p > 0.05$ . Para determinar si existía diferencia significativa entre la edad promedio de los grupos de análisis y los grupos control se realizó una prueba t de Student no pareada, considerando un valor de  $p < 0.05$  estadísticamente significativo. La diferencia de edad entre los grupos de estudio y control resultó ser no significativa. Por otro lado, la distribución entre en género masculino y femenino fue similar entre los grupos. De esta manera, el género y la edad no son variables que pudieran influir en los resultados de los experimentos.

## 8.2 Los pacientes con cáncer de pulmón presentaron un alto porcentaje de linfocitos T CD8+ efectoras en sangre periférica.

A partir de las proyecciones del análisis UMAP y de acuerdo con la expresión de los marcadores CD45RA y CD27, se seleccionaron los *clusters* de eventos correspondientes a las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ en condiciones sin estímulo. Como se muestra en la Figura 9, el fenotipo de linfocitos T CD4+ de memoria central (CD45RA<sup>Low</sup>, CD27<sup>High</sup>) predominó en sangre periférica de sujetos sanos y derrame pleural no maligno, así como en sangre periférica y derrame pleural de pacientes con cáncer de pulmón. Por otro lado, los pacientes con cáncer de pulmón presentaron un alto porcentaje de células T CD8+ efectoras (CD45RA<sup>High</sup>, CD27<sup>Low</sup>) en sangre periférica, pero no en derrame pleural. En derrame pleural de pacientes con cáncer predominó el fenotipo T CD8+ de memoria central; de igual manera, en sangre periférica de sujetos sanos y derrame pleural no maligno la subpoblación CD8+ de memoria central se encontró en un alto porcentaje. Estos resultados concuerdan con lo previamente reportado empleando un análisis supervisado (Prado et al.,2005)



**Figura 9. Porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ en sangre periférica y derrame pleural.** a) Figura representativa de los *clusters* correspondientes a las subpoblaciones *naive* (CD45RA<sup>High</sup> CD27<sup>High</sup>), *efectora* (CD45RA<sup>High</sup>, CD27<sup>Low</sup>), *memoria central* (CD45RA<sup>Low</sup>, CD27<sup>High</sup>) y *memoria efectora* (CD45RA<sup>Low</sup> CD27<sup>Low</sup>) de linfocitos T CD4+ y CD8+,

*clusters* provenientes de la proyección UMAP del grupo de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón del análisis de producción de ROS. b) Distribución de las subpoblaciones en linfocitos T CD4+ y CD8+ provenientes de sangre periférica de sujetos sanos (SP sano, n=5), sangre periférica (SP, n=5) y derrame pleural (DP, n=7) de pacientes con cáncer pulmonar y derrame pleural no maligno (DP NoM, n=6), en condiciones sin estímulo.

### **8.3 Los linfocitos T CD4+ y CD8+ de memoria central provenientes de pacientes con cáncer de pulmón, disminuyen su producción de ROS cuando se activan**

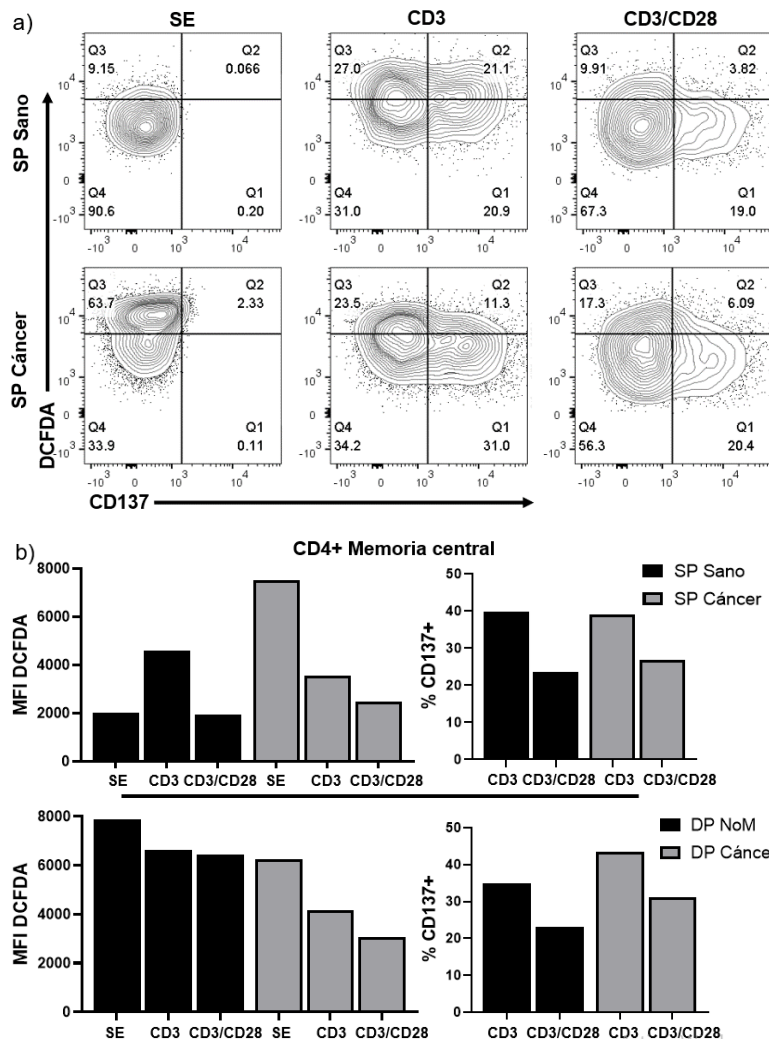
La subpoblación de memoria central de linfocitos T CD4+ y CD8+ predominó en las muestras analizadas, por ello se evaluó la producción de ROS y la expresión del marcador de activación CD137 en estos *clusters*. Las especies reactivas de oxígeno se generan en la ETC durante la fosforilación oxidativa, por lo que su producción puede fungir como un parámetro para evaluar la función mitocondrial (Sandoval, 2018). De esta manera, la producción de ROS se determinó a través de los valores de MFI para DCFDA. Por otra parte, CD137 es una molécula de coestimulación que se expresa en los linfocitos T activados, para evaluar este parámetro se midió el porcentaje de células CD137+.

Como se observa en la Figura 10, las células T CD4+ de memoria central de sangre periférica de pacientes con cáncer pulmonar, mostraron una alta producción de ROS en condiciones sin estimular. Sin embargo, cuando las células se estimularon vía TCR (CD3) o coestimulación (CD3/CD28) disminuyó su producción de ROS, esto a pesar de que los estímulos aumentaron el porcentaje de células activadas. En el caso de las células de sangre periférica de sujetos sanos, la producción de ROS aumentó cuando las células fueron estimuladas vía TCR, pero mantuvo sus niveles basales cuando el tratamiento incluyó coestimulación.

Las células T CD4+ de memoria central de derrame pleural no maligno presentaron una mayor producción de ROS en comparación con el derrame pleural maligno. En ambos casos la producción de ROS decreció después de estimular a las células. No obstante, en el caso de pacientes con cáncer de



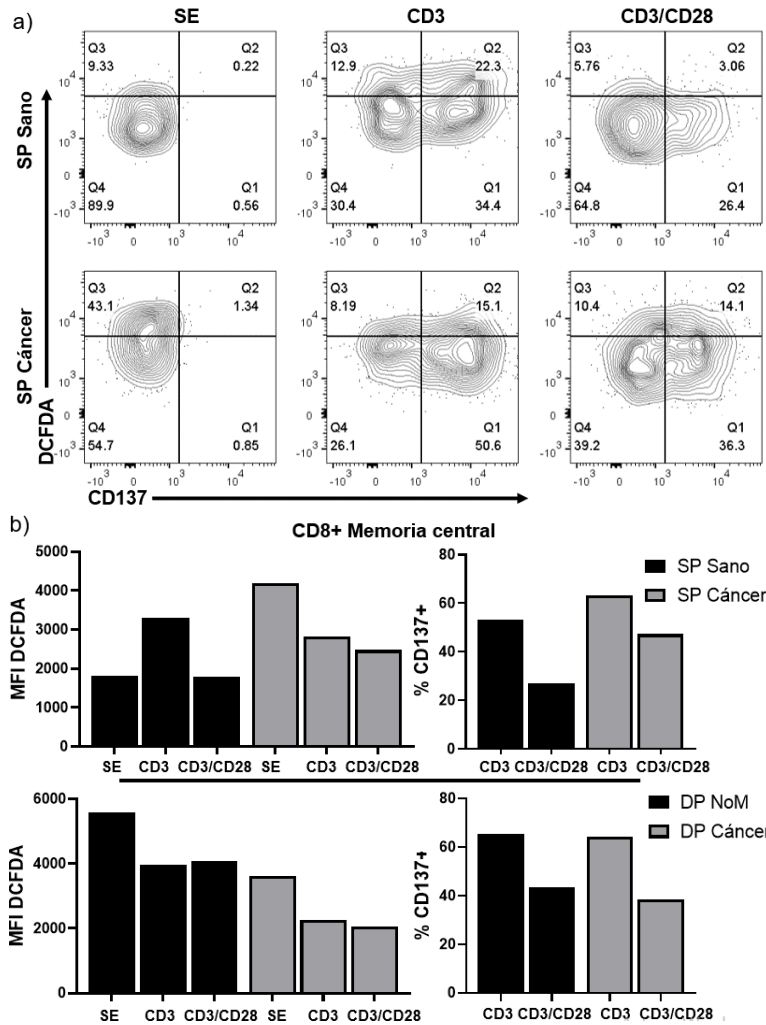
pulmón la disminución de los valores de MFI para DCFDA fue mayor, a pesar de que en derrame pleural maligno el porcentaje de células CD137+ fue más alto.



**Figura 10. Las células T CD4+ de memoria central provenientes de paciente con cáncer de pulmón disminuyen su producción de ROS cuando son activadas.** La producción de ROS y expresión de CD137 se analizó en condiciones sin estímulo (SE) y estimuladas con Anti-CD3 o perlas de coestimulación (CD3/CD28) durante 24h. a) Producción de ROS (DCFDA) y expresión de la molécula CD137 en linfocitos T CD4+ de memoria central (CD45RA<sup>Low</sup>, CD27<sup>High</sup>) provenientes de sangre periférica. Los gráficos de contorno provienen de la proyección UMAP de la Figura 5, para la asignación de los cuadrantes se tomó como referencia a la población T CD4+ *naive* (CD45RA<sup>High</sup>, CD27<sup>High</sup>) proveniente de sujetos sanos en condiciones SE. b) Valores de MFI para DCFDA y porcentaje de células CD137+ en linfocitos T CD4+ de memoria central, los valores fueron obtenidos de la proyección UMAP de la Figura 5. En condiciones SE el porcentaje de células CD137+ fue cercano a cero. Sangre periférica de sujetos sanos (SP sano, n=2) y pacientes (SP cáncer, n=5) en la fila superior, derrame pleural no maligno (DP NoM, n=6) y de paciente con cáncer pulmonar (DP cáncer, n=7) en la fila inferior.

El comportamiento de las células T CD8+ de memoria central fue similar al de las células T CD4+. Como se muestra en la Figura 11, las células T CD8+ de memoria central, provenientes de sangre periférica de pacientes con cáncer pulmonar, exhibieron una alta producción de ROS en todas las condiciones. Aun así, cuando las células se estimularon vía TCR o coestimulación disminuyó su producción de ROS, a pesar de presentar un porcentaje mayor de células activadas en comparación con la sangre periférica de sujetos sanos. Al igual que en los linfocitos T CD4+, en células T CD8+ de memoria central de sujetos sanos la producción de ROS aumentó cuando las células fueron estimuladas vía TCR, pero mantuvo sus niveles basales cuando el tratamiento incluyó coestimulación.

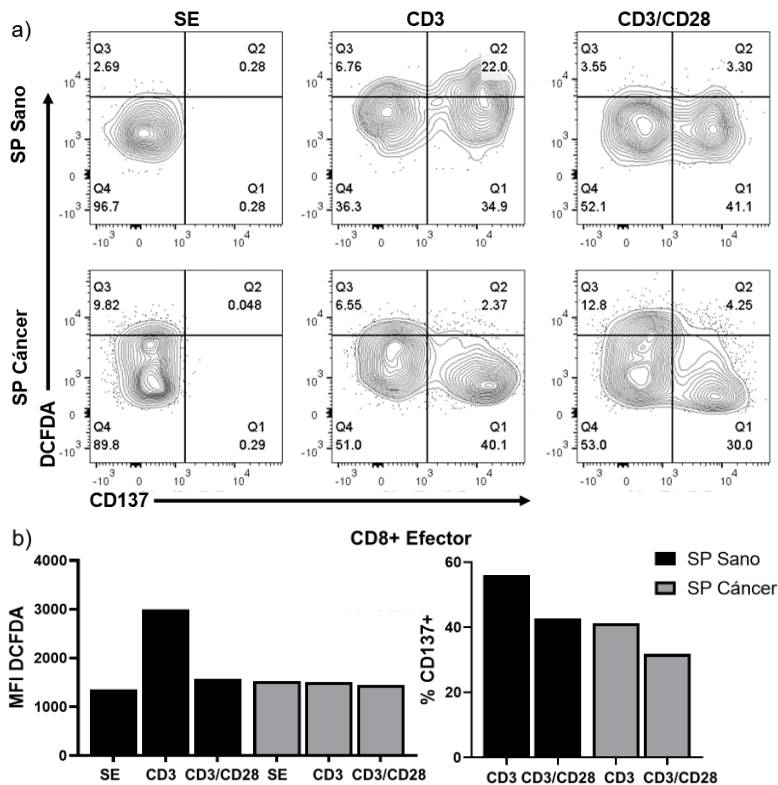
En derrame pleural, los linfocitos T CD8+ de memoria central de pacientes con cáncer presentaron una baja producción de ROS en todas las condiciones. El porcentaje de células CD137+ fue similar en derrame maligno y no maligno. Al igual que en las células T CD4+ (Ver Figura 10), las células T CD8+ de memoria central de líquido pleural maligno y no maligno disminuyeron su producción de ROS después de la estimulación. Estos resultados sugieren que tras la estimulación los linfocitos T CD4+ y CD8+ de pacientes con cáncer de pulmón podrían presentar ineficiencias en la ETC, a pesar de expresar marcadores de activación.



**Figura 11. Las células T CD8+ de memoria central provenientes de pacientes con cáncer de pulmón disminuyen su producción de ROS cuando son activadas.** La producción de ROS y expresión de CD137 se analizó en condiciones sin estímulo (SE) y estimuladas con Anti-CD3 o perlas de coestimulación (CD3/CD28) durante 24h. a) Producción de ROS (DCFDA) y expresión de la molécula CD137 en linfocitos T CD8+ de memoria central (CD45RA<sup>Low</sup>, CD27<sup>High</sup>) provenientes de sangre periférica. Los gráficos de contorno provenientes de la proyección UMAP de la Figura 5, para la asignación de los cuadrantes se tomó como referencia a la población T CD8+ *naive* (CD45RA<sup>High</sup>, CD27<sup>High</sup>) de sujetos sanos en condiciones SE. b) Valores de MFI para DCFDA y porcentaje de células CD137+ en linfocitos T CD8+ de memoria central, los valores fueron obtenidos de la proyección UMAP de la Figura 5. En condiciones SE el porcentaje de células CD137+ fue cercano a cero. Sangre periférica de sujetos sanos (SP sano, n=2) y pacientes (SP cáncer, n=5) en la fila superior, derrame pleural no maligno (DP NoM, n=6) y de paciente con cáncer pulmonar (DP cáncer, n=7) en la fila inferior.

## 8.4 Las células T CD8+ efectoras provenientes de pacientes con cáncer de pulmón se activan, pero no modifican su producción de ROS

Los pacientes con cáncer de pulmón presentaron un alto porcentaje de células T CD8+ efectoras en sangre periférica, debido a esto, también se evaluó la producción de ROS y expresión de CD137 en esta subpoblación. Como se muestra en la Figura 12, los pacientes con cáncer de pulmón presentaron un porcentaje menor de células T CD8+ efectoras CD137+. Además, las células T CD8+ de los pacientes con cáncer presentaron una baja producción de ROS; adicionalmente, cuando estas células se estimularon vía TCR o coestimulación no se modificó la producción de ROS. Esto indica que también los linfocitos T CD8+ efectores de pacientes con cáncer de pulmón podría presentar deficiencias en la ETC como signo de disfunción mitocondrial.

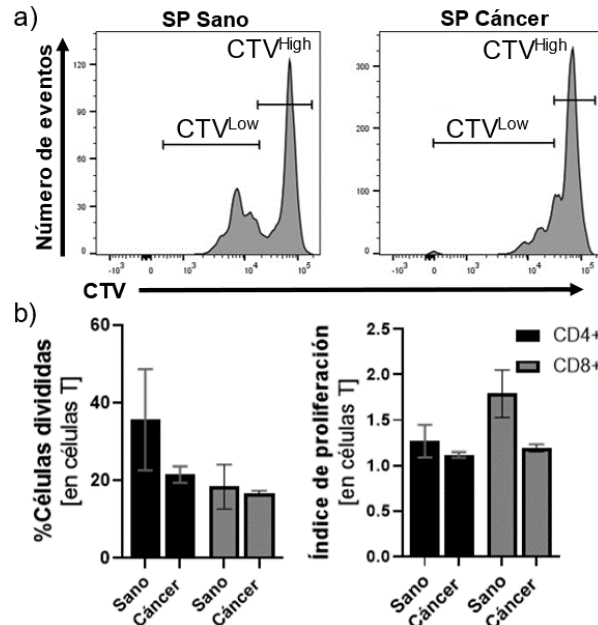


**Figura 12. Las células T CD8+ efectoras provenientes de pacientes con cáncer de pulmón se activan, pero no modifican su producción de ROS.** La producción de ROS y expresión de CD137 se analizó en condiciones sin estímulo (SE) y estimuladas con Anti-CD3 o perlas de coestimulación (CD3/CD28) durante 24h. a) Producción de ROS (DCFDA) y expresión de la molécula CD137 en linfocitos T CD8+ efectores (CD45RA<sup>High</sup>, CD27<sup>Low</sup>) provenientes de sangre periférica. Los gráficos de contorno provienen de la proyección UMAP de la Figura 5 y para la

asignación de los cuadrantes se tomó como referencia a la población T CD8+ *naive* (CD45RA<sup>High</sup>, CD27<sup>High</sup>) proveniente de sujetos sanos en condiciones SE. b) Valores de MFI para DCFDA y porcentaje de células CD137+ en linfocitos T CD8+ efectores, los valores fueron obtenidos de la proyección UMAP de la Figura 5. En condiciones SE el porcentaje de células CD137+ fue cercano a cero. Sangre periférica de sujetos sanos (SP sano, n=2) y pacientes con cáncer de pulmón (SP cáncer, n=5).

### 8.5 Los linfocitos T provenientes de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón mostraron una tendencia a proliferar menos.

Las especies reactivas de oxígeno son importantes durante la proliferación de los linfocitos T, ya que actúan como segundo mensajero indicando cuando existen las condiciones necesarias para proliferar (Jones & Thompson, 2007). Los linfocitos T provenientes de pacientes con cáncer de pulmón presentaron alteraciones en la producción de ROS, por ello se evaluó la proliferación en linfocitos T CD4+ y CD8+ totales provenientes de sangre periférica de sujetos sanos y pacientes con cáncer de pulmón.



**Figura 13. Los linfocitos T CD4+ y CD8+ totales de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón mostraron una tendencia a proliferar menos.** Para evaluar la proliferación las células se tiñeron con el marcador Cell Trace Violet (CTV) y se estimularon durante 96h con perlas de coestimulación (CD3/CD28). a) Figura representativa de la proliferación de células T CD8+

provenientes de sangre periférica. La población CTV<sup>High</sup> corresponde a las células sin proliferar, mientras que la población CTV<sup>Low</sup> corresponde a las células que proliferaron tras la estimulación. b) Porcentaje de células divididas e índice de proliferación en linfocitos T CD4+ y CD8+ provenientes de sangre periférica de sujetos sanos (n=3) y de pacientes con cáncer de pulmón (n=3); las barras representan la media  $\pm$  error estándar (SEM). Las diferencias entre el porcentaje de células divididas e índice de proliferación entre sujetos sanos y pacientes con cáncer fueron no significativas en linfocitos T CD4+ y CD8+ utilizando prueba t de Student no pareada.

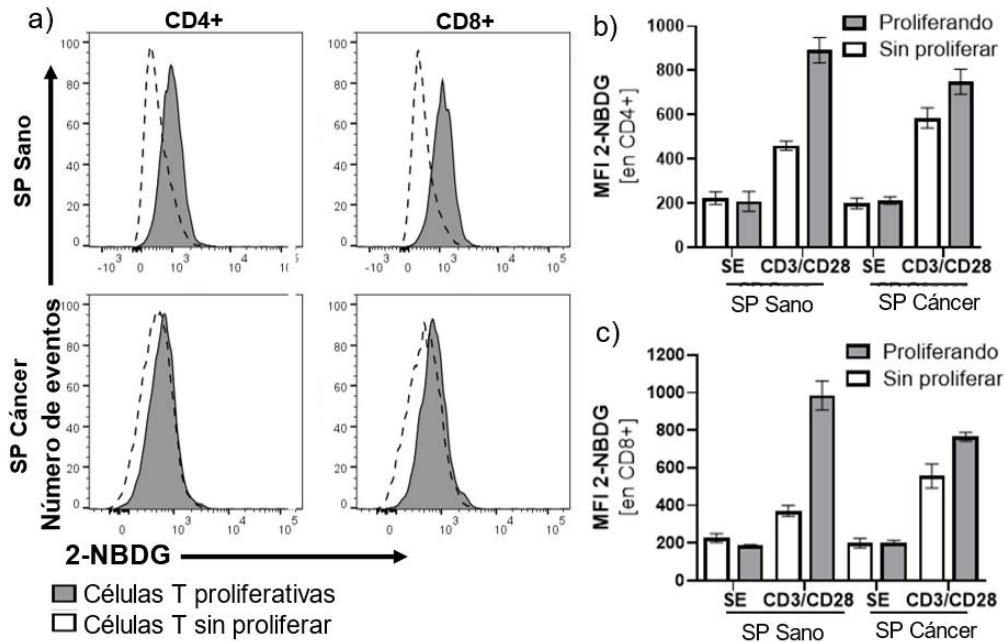
La proliferación de las células se evaluó con el porcentaje de células divididas y el índice de proliferación. El índice de proliferación representa el número total de divisiones entre el número de células que se dividieron, es decir refleja únicamente a la fracción de células que respondieron al estímulo (CD3/CD28) (FlowJo, 2021). Como se observa en la Figura 13, los linfocitos T CD4+ y CD8+ de pacientes con cáncer tuvieron un menor porcentaje de células divididas e índice de proliferación. Esto indica que las células T de paciente con cáncer exhiben una tendencia a proliferar menos que las células T de los sujetos sanos.

### **8.6 Los linfocitos T proliferativos de sangre periférica de pacientes con cáncer pulmonar presentaron una menor captación de glucosa**

El metabolismo glucolítico brinda los precursores biosintéticos necesarios para la activación y proliferación de las células T (O'Sullivan & Pearce, 2015). Los linfocitos T CD4+ y CD8+ totales de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón, mostraron una disminución en la proliferación. Por ello, la captación de glucosa se evaluó en células T CD4+ y CD8+ proliferando (CTV<sup>Low</sup>) y sin proliferar (CTV<sup>High</sup>) a través del análisis de los valores de MFI para 2-NBDG.

Tal como se expone en la Figura 14, cuando las células T se estimularon (CD3/CD28) aumentaron su captación de glucosa tanto en sujetos sanos como en pacientes con cáncer. Las células T (CD4+ y CD8+) provenientes de sangre periférica de sujetos sanos mostraron una tendencia a captar más glucosa cuando se encontraban proliferando, sin embargo, esta tendencia no fue tan marcada en pacientes con cáncer. Adicionalmente, las células T proliferativas de sangre

periférica de pacientes con cáncer, captaron menos glucosa que las células T proliferativas de sujetos sanos.



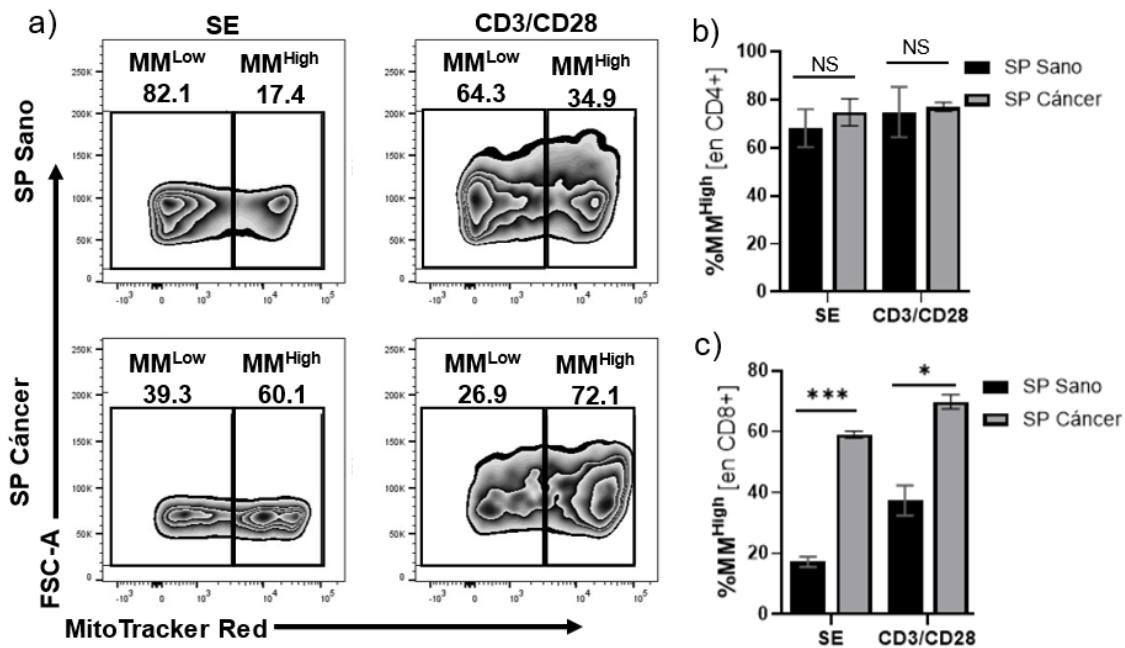
**Figura 14. Los linfocitos T CD4+ y CD8+ totales provenientes de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón muestra una tendencia a captar menos glucosa.** La captación de glucosa se evaluó con el reactivo 2-NBDG en condiciones sin estímulo (SE) y estimulación de 96h con perlas de coestimulación (CD3/CD28), en células que se encontraban proliferando y sin proliferar. a) Figura representativa de la captación de glucosa en células T CD4+ y CD8+ estimuladas durante 96h. Captación de glucosa evaluada con MFI 2-NBDG en células T CD4+ (b) y CD8+ (c) en sangre periférica de sujetos sanos (n=3) y de pacientes con cáncer de pulmón (n=3); las barras representan la media  $\pm$  SEM. La diferencia entre la captación de glucosa de las células proliferando y sin proliferar fue no significativa en todos los grupos y condiciones utilizando prueba t de Student pareada.

### 8.7 Los pacientes con cáncer de pulmón presentaron un mayor porcentaje de linfocitos T CD8+ MM<sup>High</sup> en sangre periférica

Los linfocitos T de sangre periférica de pacientes con cáncer pulmonar mostraron una baja proliferación y captación de glucosa. Además, exhibieron alteraciones en la producción de ROS un proceso llevado a cabo en la mitocondria. De esta manera, también se evaluó la masa mitocondrial para determinar si podrían existir

alteraciones en la dinámica mitocondrial de las células T. Para medir la masa mitocondrial de las células se empleó el reactivo MitoTracker Red.

Como se observa en la Figura 15a, de acuerdo con el contenido de masa mitocondrial se encontraron dos poblaciones; células con masa mitocondrial baja ( $MM^{Low}$ ) y células con masa mitocondrial alta ( $MM^{High}$ ). Se analizó el porcentaje de células de estas subpoblaciones ( $MM^{Low}$  y  $MM^{High}$ ) en linfocitos T  $CD4+$  y  $CD8+$  de sangre periférica de sujetos sanos y pacientes con cáncer de pulmón.



**Figura 15.** En sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón hay un mayor porcentaje de células T  $CD8+$   $MM^{High}$ . La masa mitocondrial se evaluó con el reactivo MitoTracker Red en condiciones sin estímulo (SE) y estimuladas con perlas de coestimulación (CD3/CD28). a) Figura representativa de las poblaciones  $MM^{Low}$  y  $MM^{High}$  en linfocitos T  $CD8+$ . Porcentaje de células T  $CD4+$  (b) y  $CD8+$  (c)  $MM^{High}$  en sangre periférica de sujetos sanos (n=3) y de pacientes con cáncer de pulmón (n=2); las barras representan la media  $\pm$  SEM. NS: No significativo, \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  con prueba t de Student no pareada.

Los linfocitos T  $CD4+$  de sangre periférica de sujetos sanos y de pacientes con cáncer de pulmón no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de células  $MM^{High}$ . Además, se mantuvo el porcentaje de linfocitos T  $CD4+$   $MM^{High}$



aún después de la estimulación (Ver Figura 15b). En contraste, la población de células T CD8+ MM<sup>High</sup> predominó de manera significativa en sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón, este evento se presentó tanto en condiciones de estímulo como sin estímulo (Ver Figura 15c). De manera general cuando los linfocitos T CD8+ se estimularon vía coestimulación (CD3/CD28), aumentó el porcentaje de células MM<sup>High</sup>. Estos resultados sugieren que los linfocitos T CD8+ de los pacientes con cáncer pulmonar podrían presentar un aumento en su masa mitocondrial para compensar las deficiencias en la captación de glucosa.

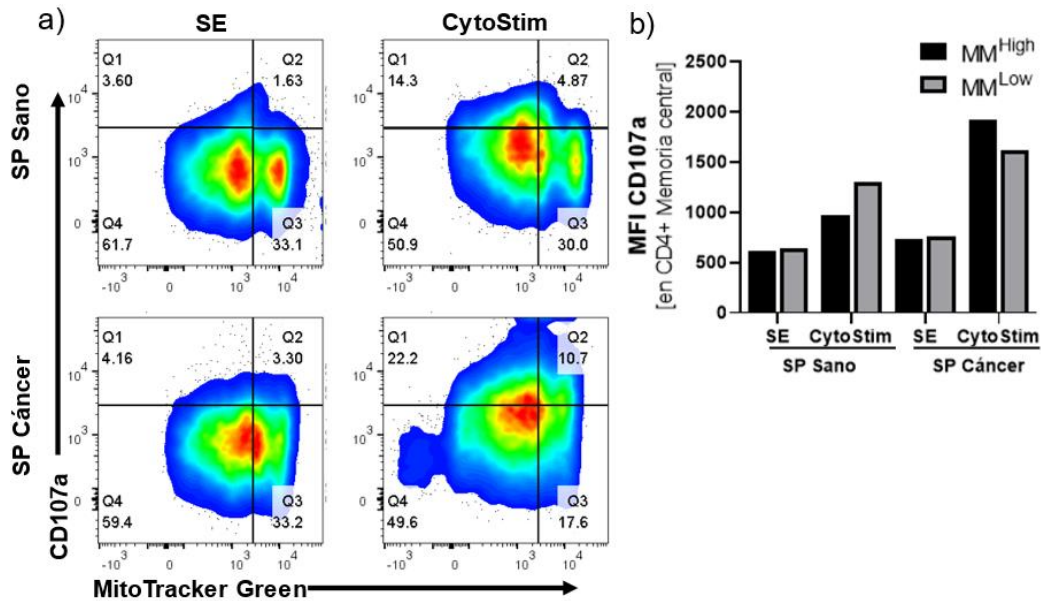
### **8.8 Las células T CD4+ de memoria central de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón presentan una mayor degranulación después de la estimulación**

La subpoblación de linfocitos T CD4+ de memoria central presentó una disminución en la producción de ROS a pesar de expresar el marcador de activación CD137. Sin embargo, los pacientes con cáncer pulmonar no presentaron alteraciones en los porcentajes de células MM<sup>Low</sup> y MM<sup>High</sup> en linfocitos T CD4+ totales de sangre periférica. Debido a esto se decidió evaluar si la masa mitocondrial tenía alguna relación con el potencial efector de las células T CD4+ de memoria central.

CD107a es un marcador que se expresa en las células que se encuentran degranulando, por ello la MFI CD107a es un parámetro que se puede asociar con el potencial efector de las células (Betts & Koup, 2004). Para provocar la degranulación de las células, se empleó un estímulo policlonal que actúa de manera similar a un super antígeno (CytoStim). Para identificar a las células MM<sup>Low</sup> y MM<sup>High</sup> se empleó el reactivo MitoTracker Green.

Tal como se observa en a Figura 16, después de la estimulación aumentó la degranulación de las células T. Sin embargo, las células T CD4+ de memoria central de pacientes con cáncer de pulmón, presentaron una mayor degranulación en comparación con las células de sujetos sanos. Además, las células T CD4+ MM<sup>High</sup> de memoria central de pacientes con cáncer presentaron mayor

degranulación; por el contrario, en los sujetos sanos fue la subpoblación  $MM^{Low}$  la que presentó un valor mayor de MFI para CD107a. De esta manera, los resultados sugieren que las células T CD4+ de memoria central de pacientes con cáncer de pulmón presentan un mayor degranulación y por ende un mayor potencial efector.



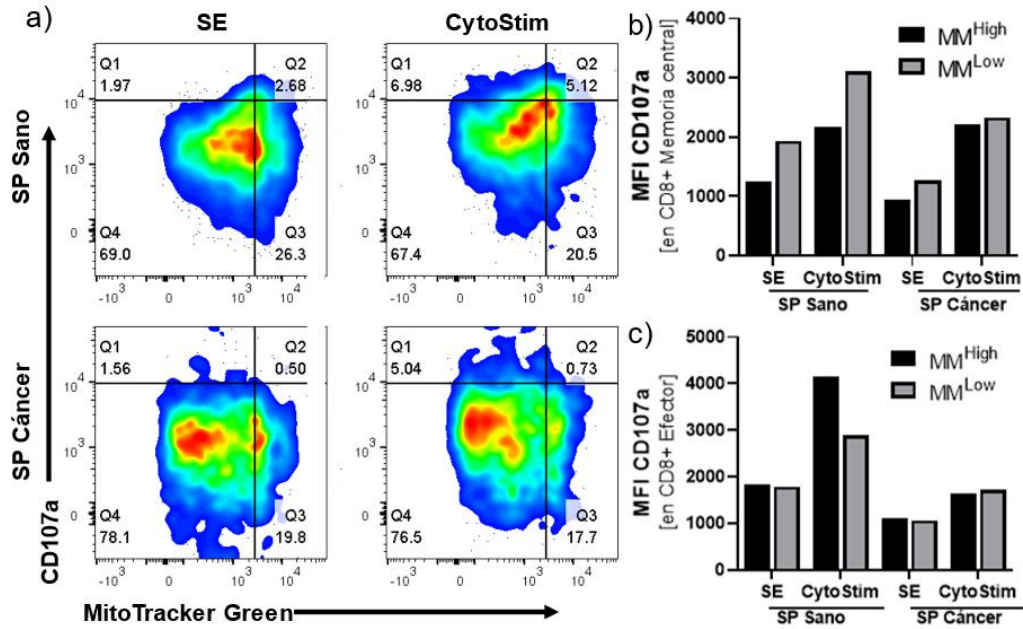
**Figura 16.** Las células T CD4+ de memoria central de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón presentan una mayor degranulación tras la estimulación. La masa mitocondrial se evaluó con el reactivo MitoTracker Green y la degranulación se evaluó con la expresión de CD107a. Los parámetros se evaluaron en condiciones sin estímulo (SE) y estimulado con CytoStim por 4h. Los cuadrantes se establecieron tomando como referencia a la población CD4+ naive ( $CD45RA^{High}$ ,  $CD27^{High}$ ) proveniente de sujetos sanos en condiciones SE. a) Masa mitocondrial y expresión de la molécula CD107a en células T CD4+ de memoria central ( $CD45RA^{Low}$ ,  $CD27^{High}$ ) de sangre periférica, gráficos provenientes del análisis UMAP de la Figura 7. b) Valores de MFI para CD107a en células T CD4+ de memoria central  $MM^{Low}$  y  $MM^{High}$ , los valores fueron obtenidos del análisis UMAP de la Figura 7. Sangre periférica de sujetos sanos (n=7) y pacientes con cáncer de pulmón (n=7).

### **8.9 Las células T CD8+ de memoria central y efectoras de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón presentan una baja degranulación**

Los pacientes con cáncer pulmonar presentaron un mayor porcentaje de células MM<sup>High</sup> en linfocitos T CD8+ totales de sangre periférica. Además, las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ efectoras y de memoria central presentaron alteraciones en la producción de ROS a pesar de expresar el marcador de activación CD137. Por ello se evaluó la degranulación en los *clusters* correspondientes a estas subpoblaciones de células T CD8+.

Como se muestra en la Figura 17, los linfocitos T CD8+ de memoria central provenientes de sangre periférica de pacientes con cáncer presentaron un valor menor de MFI para CD107a y por lo tanto una menor degranulación. Esto se observó en condiciones de estímulo y sin estímulo en ambas subpoblaciones de masa mitocondrial (MM<sup>Low</sup> y MM<sup>High</sup>).

Los linfocitos T CD8+ efectoras de sangre periférica de pacientes con cáncer presentaron una baja degranulación en ambas subpoblaciones de masa mitocondrial, este fenómeno fue más evidente después de estimular. Por otro lado, las células T CD8+ efectoras MM<sup>High</sup> de sujetos sanos presentaron una mayor degranulación que el fenotipo MM<sup>Low</sup> posterior al estímulo con CytoStim. Estos resultados indican que los linfocitos T CD8+ efectoras de pacientes con cáncer pulmonar presentan un menor potencial efector, lo cual se podría relacionar con una menor actividad antitumoral.



**Figura 17. Las células T CD8+ de memoria central y efectoras de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón presentan una baja degranulación.** La masa mitocondrial se evaluó con el reactivo MitoTracker Green y la degranulación se evaluó con la expresión de CD107a. Los parámetros se evaluaron en condiciones sin estímulo (SE) y estimulado con CytoStim por 4h. Los cuadrantes se establecieron tomando como referencia a la población CD8+ *naive* (CD45RA<sup>High</sup>, CD27<sup>High</sup>) proveniente de sujetos sanos en condiciones SE. a) Masa mitocondrial y expresión de la molécula CD107a en células T CD8+ efectoras de sangre periférica, gráficos provenientes del análisis UMAP de la Figura 7. Valores MFI para CD107a en poblaciones MM<sup>Low</sup> y MM<sup>High</sup> de linfocitos T CD8+ de memoria central (CD45RA<sup>Low</sup>, CD27<sup>High</sup>) (b) y efectoras (CD45RA<sup>High</sup>, CD27<sup>Low</sup>) (c), los valores fueron obtenidos del análisis UMAP de la Figura 7. Sangre periférica de sujetos sanos (n=7) y pacientes con cáncer de pulmón (n=7).

## 9. Discusión

Las células T CD4+ y CD8+ de pacientes con cáncer de pulmón presentaron una baja proliferación y captación de glucosa, pero únicamente la población T CD8+ mostró un mayor porcentaje de células MM<sup>High</sup>. Las subpoblaciones T CD4+ y CD8+ de memoria central presentaron una disminución en la producción de ROS después de la estimulación, mientras que la subpoblación CD8+ efectora no modificó la producción de ROS aun después de la estimulación. Contrario a lo que se planteó en la hipótesis, las células T de pacientes con cáncer pulmonar no parecen mostrar defectos en la activación. Por otro lado, los linfocitos T CD8+ de memoria central y efectores mostraron un potencial efector reducido, pero no así la población CD4+ de memoria central.

De esta manera, la hipótesis planteada se cumple parcialmente ya que se esperaba que los linfocitos T de pacientes con cáncer de pulmón mostraran un menor porcentaje de células activadas. Además, únicamente los linfocitos T CD8+ presentaron un aumento en el porcentaje de células MM<sup>High</sup> y una menor degranulación.

Los pacientes con cáncer de pulmón presentaron un alto porcentaje de linfocitos T CD8+ efectores (CD27<sup>High</sup>, CD45RA<sup>Low</sup>) en sangre periférica, pero en derrame pleural predominó la subpoblación CD8+ de memoria central (CD27<sup>Low</sup>, CD45RA<sup>High</sup>). Esto podría asociarse con la presencia de factores quimiotácticos que favorecen la presencia de células T CD8+ de memoria central; pero también podría ser atribuido al bloqueo del proceso de diferenciación en células T CD8+. Dentro del microambiente tumoral por carcinoma de pulmón hay factores inmunosupresores como IL-10 y TGF- $\beta$  (Factor de crecimientos transformante beta), estos factores solubles inhiben la funcionalidad de los linfocitos T CD8+ (Prado et al., 2005).

Acorde a la información anterior, Prado y colaboradores en el 2012, reportaron que las células T CD8+ efectoras de derrame pleural de pacientes con cáncer de pulmón, presentan susceptibilidad a sufrir muerte celular inducida por activación

(AICD). Los antígenos tumorales liberados por las células cancerosas inducen la constante activación de las células T. La estimulación crónica podría sensibilizar a las células T CD8+ efectoras a sufrir AICD, de esta manera también se podría explicar la disminución de la subpoblación CD8+ efectora en derrame pleural maligno (Prado et al., 2012).

Los linfocitos T CD4+ y CD8+ de memoria central provenientes de pacientes con cáncer pulmonar, presentaron una alta producción de ROS en condiciones sin estímulo. Esto puede ser asociado a la estimulación crónica que sufren las células T debido a la presencia de antígenos tumorales. Cuando los linfocitos T se estimulan de manera sostenida aumentan la producción de ROS debido a la saturación de la cadena transportadora de electrones (Jones & Thompson, 2007).

Las células T activadas requieren un aumento en la producción de ROS, ya que actúan como segundo mensajero indicando que existen las condiciones energéticas necesarias para proliferar (Jones & Thompson, 2007). Sin embargo, los linfocitos T CD4+ y CD8+ de memoria central de pacientes con cáncer pulmonar redujeron su producción de ROS tras la estimulación vía TCR y coestimulación (CD3/CD28), esto a pesar de aumentar el porcentaje de células activadas (CD137+). Los niveles excesivos de ROS intracelulares pueden ser perjudiciales y desencadenar estrés oxidativo, por lo que la disminución de ROS podría tratarse de un mecanismo compensatorio para evitar el daño y la muerte de las células T. En el 2017 Siska y cols., reportaron que los TILs CD8+ de pacientes con carcinoma renal de células claras, presentaban un aumento en la captación de cistina y en la producción de glutatión para neutralizar el exceso de ROS (Siska et.al, 2017).

Las muestras de derrame pleural no maligno provenían en su mayoría de pacientes con tuberculosis, por lo que al igual que el derrame pleural maligno, se trata de un derrame pleural exudativo producto de procesos inflamatorios. Los linfocitos T CD4+ y CD8+ de memoria central provenientes tanto de derrame pleural maligno como no maligno, presentaron altos niveles de ROS en condiciones sin estímulo. Sin embargo, la producción de ROS disminuyó tras la estimulación. Este comportamiento podría ser asociado a la estimulación crónica

producida por los procesos inflamatorios asociados a ambas patologías. No obstante, en el caso de derrame pleural maligno la disminución en la producción de ROS es mayor, lo cual podría ser atribuido al proceso de malignidad. De esta manera, la baja producción de ROS también podría indicar que los linfocitos T de memoria central de derrame pleural maligno presentan ineficiencias en la ETC después de la estimulación (Sandoval, 2018).

Los linfocitos T CD8+ efectores provenientes de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón, no modificaron su producción de ROS después de la estimulación a pesar de aumentar el porcentaje de células CD137+. Las ROS se producen principalmente en las mitocondrias, particularmente en los complejos I y III de la ETC (Ježek et al., 2018). Por lo que las dificultades que tiene los linfocitos T CD8+ efectores de sangre periférica de pacientes con cáncer para producir ROS tras la activación podrían deberse a una deficiencia en la cadena transportadora de electrones, lo cual también podría indicar disfunción mitocondrial.

CD137 es una molécula de coestimulación que promueve la proliferación y supervivencia de las células T activadas (Wölfl et al., 2008). A pesar de que las células T de pacientes con cáncer de pulmón presentan alteraciones en la producción de ROS, aumenta el porcentaje de células T CD137+ después de la estimulación vía TCR o coestimulación (CD3/CD28). Esto indica que los linfocitos T de paciente con cáncer de pulmón podrían presentar alteraciones metabólicas o en su capacidad efectora, aun cuando expresan la molécula CD137.

En las células T provenientes de sangre periférica de sujetos sanos, la producción de ROS aumenta cuando las células son estimuladas vía TCR; pero se mantiene los niveles basales de ROS cuando el tratamiento incluye coestimulación. Esto podría deberse a que la señal de coestimulación regula positivamente la expresión del transportador de glucosa GLUT1 lo que provoca un aumento de la glucólisis (Dimeloe et al., 2017). De esta manera, las células que reciben la señal de coestimulación podrían presentar una menor dependencia del metabolismo oxidativo y tardar más tiempo en presentar un aumento en la producción de ROS.

Como se ha mencionado, las especies reactivas de oxígeno juegan un papel en la proliferación de las células T. Los linfocitos T provenientes de pacientes con

cáncer de pulmón presentaron alteraciones en la producción de ROS, por ello, también se evaluó la proliferación en linfocitos T CD4+ y CD8+ provenientes de sangre periférica de sujetos sanos y de pacientes con cáncer de pulmón.

Las células T CD4+ y CD8+ de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón presentaron una tendencia a proliferar menos que las células T de sujetos sanos. El índice de proliferación indica el número de células que se encuentran proliferando por ciclo de división. Los linfocitos T CD4+ y CD8+ de pacientes con cáncer, presentaron un menor índice de proliferación y un menor porcentaje de células divididas con respecto a los sujetos sanos. Estos eventos podrían tener relación con la baja producción de ROS encontrada en las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ de pacientes con cáncer de pulmón. Aunado a ello, la tendencia a proliferar menos también se podría relacionar con defectos en la captación de glucosa en las células T de pacientes con cáncer.

Por otra parte, se evaluó la captación de glucosa en linfocitos T CD4+ y CD8+ proliferativos en células provenientes de sangre periférica de sujetos sanos y de pacientes con cáncer de pulmón. Tal como se esperaba, las células T aumentaron su captación de glucosa después de ser estimuladas (CD3/CD28). Sin embargo, los linfocitos T CD4+ y CD8+ proliferativos de pacientes con cáncer pulmonar, mostraron una tendencia a captar menos glucosa que en sujetos sanos. El metabolismo glucolítico proporciona precursores biosintéticos para la síntesis de biomoléculas que son necesarias para que las células T proliferen y ganen su función efectora (O'Sullivan & Pearce, 2015). Por lo que la baja captación de glucosa podría relacionarse con la disminución de la proliferación de las células T provenientes de pacientes con cáncer de pulmón.

Por otro lado, la disminución en la captación de glucosa en las células T de pacientes con cáncer pulmonar podría ser atribuida a defectos en la expresión de GLUT 1. En el 2019 Prado y cols., reportaron que las células T de memoria provenientes de derrame pleural maligno no lograron aumentar la expresión de GLUT1 tras la coestimulación con anti-CD28 (Prado et al., 2019).

Debido a disminución en la producción de ROS y en la captación de glucosa en los linfocitos T de pacientes con cáncer de pulmón, se evaluó la masa mitocondrial



para determinar si podrían existir alteraciones en la dinámica mitocondrial de las células T. Los pacientes con cáncer pulmonar presentaron un porcentaje significativamente mayor de linfocitos T CD8+ totales MM<sup>High</sup> en sangre periférica. Esto se podría deber a que desde el punto de vista bioenergético las mitocondrias pueden proporcionar energía de manera más eficiente a partir del piruvato, por lo que el aumento en la masa mitocondrial intenta compensar la glucólisis deficiente de los linfocitos T CD8+ (Siska et.al, 2017).

Sin embargo, el hecho de que las células T CD8+ presenten una alta masa mitocondrial no implica que sus mitocondrias sean completamente funcionales. De hecho, la baja producción de ROS exhibida por las subpoblaciones de linfocitos T de pacientes con cáncer, podría indicar que existen alteraciones en el metabolismo y función mitocondrial. Siska y cols., reportaron que las TIL CD8+ de carcinoma renal de células claras presentaban una alta masa mitocondrial, acompañada de una expresión normal de PGC-1 $\alpha$  el principal regulador de la biogénesis mitocondrial. Por otro lado, estas células se encontraban fisionadas y disfuncionales (Siska et.al, 2017). De esta manera, un fenómeno similar podría estar sucediendo en los linfocitos T CD8+ provenientes de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón.

Las células T requieren una reprogramación metabólica y un aumento en la glucólisis para ganar su función efectora (Siska et.al, 2017); pero la regulación de la función y dinámica mitocondrial también es necesaria para mantener la respuesta efectora de las células T (Scharping et al., 2016). Por ello se analizó la degranulación en las poblaciones MM<sup>High</sup> y MM<sup>Low</sup> en células T CD4+ y CD8+ provenientes de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón.

Después de la estimulación aumentó la expresión de CD107a en las células T CD4+. Sin embargo, la subpoblación CD4+ de memoria central de pacientes con cáncer de pulmón, presentaron una mayor expresión de CD107a con respecto a los controles. Puesto que CD107a es un marcador de degranulación, esto podría indicar que las células T CD4+ de memoria central de pacientes con cáncer de pulmón presentan un mayor potencial efector. Aunque esto no garantiza que las

células estén produciendo una mayor cantidad de citocinas efectoras como IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$ , ni tampoco garantiza que las citocinas lleguen a la célula blanco.

Las células T CD4<sup>+</sup> de memoria central MM<sup>High</sup> de pacientes con cáncer presentaron una mayor expresión de CD107a, lo cual se podría asociar con una mayor degranulación de las células. Esto podría deberse a que las células T CD4<sup>+</sup> de pacientes con cáncer tratan de compensar sus deficiencias metabólicas o mitocondriales con un aumento de la masa mitocondrial, y por ello el fenotipo MM<sup>High</sup> tiene mayor éxito en el proceso de degranulación.

Al igual que en los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, la expresión de CD107a aumentó en las células T CD8<sup>+</sup> después de la estimulación. Sin embargo, la subpoblación CD8<sup>+</sup> de memoria central, así como la efectora presentaron una menor degranulación en comparación con los donadores sanos. Particularmente, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> efectores producen citocinas y moléculas involucradas con la citólisis de la célula blanco (Prado & Sadoval, 2020); sin embargo, esta subpoblación fue la que menor potencial efector mostró en los pacientes con cáncer de pulmón.

Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> efectores de pacientes con cáncer presentaron una expresión similar de CD107a tanto en el fenotipo MM<sup>High</sup> como MM<sup>Low</sup>. Pero las células T de los controles presentaron una mayor degranulación en el fenotipo con alta masa mitocondrial. Esto puede deberse a que los linfocitos T efectores activados presentan un aumento de su masa mitocondrial para obtener la energía necesaria para sostener sus funciones efectoras (Angajala et al., 2018).

Para que los linfocitos T puedan activarse, proliferar y ejercer sus funciones efectoras deben someterse a un proceso de reprogramación metabólica. En este proceso se inducen altas tasas de glucólisis aerobia, pero la mitocondria continúa teniendo un papel en la producción de ATP y de ROS para llevar a cabo la activación de las células. De esta manera, cuando alguna de estas vías metabólicas se encuentra deficiente o disfuncional podría prevenir la activación, proliferación y función efectora de las células T, disminuyendo así su actividad antitumoral (Siska et al., 2017). Este podría ser el caso de los linfocitos T provenientes de pacientes con cáncer de pulmón.

## **10. Conclusiones**

Los resultados indican que las células T de pacientes con cáncer pulmonar podrían tener un amplio conjunto de defectos en la captación de glucosa y dinámica y función mitocondrial. Estos defectos podrían contribuir a la capacidad limitada de proliferar y ejercer su función efectora. Todo parece indicar que la población de linfocitos T CD8+ se ve más afectada por estas alteraciones metabólicas.

## 11. Referencias bibliográficas

1. Alarcón-Aguilar, A., Maycotte-González, P., Cortés-Hernández, P., López-Diazguerrero, N. E., & Königsberg, M. (2019). Dinámica mitocondrial en las enfermedades neurodegenerativas. *Gaceta Medica de México*, *155*(3), 276–283. <https://doi.org/10.24875/GMM.18004337>.
2. Allison, K. E., Coomber, B. L., & Bridle, B. W. (2017). Metabolic reprogramming in the tumour microenvironment: a hallmark shared by cancer cells and T lymphocytes. *Immunology*, *152*(2), 175–184. <https://doi.org/10.1111/imm.12777>.
3. Angajala, A., Lim, S., Phillips, J. B., Kim, J. H., Yates, C., You, Z., & Tan, M. (2018). Diverse roles of Mitochondria in immune responses: Novel Insights Into Immuno-Metabolism. *Frontiers in Immunology*, *9*, 1605. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01605>.
4. Beckermann, K. E., Dudzinski, S. O., & Rathmell, J. C. (2017). Dysfunctional T cell metabolism in the tumor microenvironment. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *35*, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2017.04.003>.
5. Berman, S. B., Pineda, F. J., & Hardwick, J. M. (2008). Mitochondrial fission and fusion dynamics: the long and short of it. *Cell Death & Differentiation*, *15*, 1147–1152. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.57>.
6. Betts, M. R., & Koup, R. A. (2004). Detection of T-cell degranulation: CD107a and b. *Methods in Cell Biology*, *75*, 497–512. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(04\)75020-7](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(04)75020-7).
7. Buck, M. D., Sullivan, D. O., Geltink, R. I. K., Huber, T. B., Rambold, A. S., Pearce, E. L., Buck, M. D., Sullivan, D. O., Geltink, R. I. K., Curtis, J. D., Chang, C., Sanin, D. E., Qiu, J., Kretz, O., Braas, D., Windt, G. J. W. Van Der, Chen, Q., & Huang, S. C. (2016). Mitochondrial dynamics controls T cell Fate through Article Mitochondrial Dynamics Controls T Cell Fate through Metabolic Programming. *Cell*, *166*(1), 63–76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.035>.
8. Cherry, A. D., & Piantadosi, C. A. (2015). Regulation of mitochondrial

- biogenesis and its intersection with inflammatory responses. *Antioxidants & Redox Signaling*, 22(12), 965–976. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6200>.
9. Curtsinger, J. M., & Mescher, M. F. (2010). Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Current opinion in immunology*, 22(3), 333–340. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.02.013>.
  10. D'Agostino, H. P., & Edens, M. A. (2020). *Physiology, Pleural Fluid BT - StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.unboundmedicine.com/medline/citation/30020725/StatPearls>.
  11. Dimeloe, S., Burgener, A. V., Grählert, J., & Hess, C. (2017). T-cell metabolism governing activation, proliferation and differentiation; a modular view. *Immunology*, 150(1), 35–44. <https://doi.org/10.1111/imm.12655>.
  12. Dorn, G. W., 2nd, Vega, R. B., & Kelly, D. P. (2015). Mitochondrial biogenesis and dynamics in the developing and diseased heart. *Genes & Development*, 29(19), 1981–1991. <https://doi.org/10.1101/gad.269894.115>.
  13. D'Souza, A. D., Parikh, N., Kaech, S. M., & Shadel, G. S. (2007). Convergence of multiple signaling pathways is required to coordinately up-regulate mtDNA and mitochondrial biogenesis during T cell activation. *Mitochondrion*, 7(6), 374–385. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2007.08.001>.
  14. Dustin M. L. (2014). The immunological synapse. *Cancer Immunology Research*, 2(11), 1023–1033. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0161>.
  15. Esensten, J. H., Helou, Y. A., Chopra, G., Weiss, A., & Bluestone, J. A. (2016). CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity*, 44(5), 973–988. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.04.020>.
  16. Filipovic, I., Sönnernborg, I., Strunz, B., Friberg, D., Cornillet, M., Hertwig, L., Ivarsson, M. A., & Björkström, N. K. (2019). 29-Color Flow Cytometry: Unraveling Human Liver NK Cell Repertoire Diversity. *Frontiers in Immunology*, 10, 2692. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02692>
  17. Finley, D. J., & Rusch, V. W. (2011). Anatomy of the Pleura. *Thoracic Surgery Clinics*, 21(2), 157–163.

- <https://doi.org/10.1016/j.thorsurg.2010.12.001>.
18. Giacomello, M., Pyakurel, A., Glytsou, C., & Scorrano, L. (2020). The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 21(4), 204–224. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0210-7>.
  19. Globocan. (2018). Estimated number of deaths in 2020, worldwide , all cancers , males , all ages. *Global Scan 2018*, 947, 202018. <https://gco.iarc.fr/today/home>
  20. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
  21. Herbert, R. A., Janardhan, K. S., Pandiri, A. R., Cesta, M. F., Chen, V., & Miller, R. A. (2018). Lung, Pleura, and Mediastinum. In *Boorman's Pathology of the Rat*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
  22. Inamura K. (2017). Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. *Frontiers in Oncology*, 7, 193. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00193>.
  23. Ingelfinger, J. R., Feller-Kopman, D., & Light, R. (2018). Pleural disease. *New England Journal of Medicine*, 378(8), 740–751. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1403503>.
  24. Instituto Nacional de Salud Pública. (2021). Consultado el 7 de Julio de 2021 en <https://www.insp.mx/avisos/mexico-frente-al-cancer-de-pulmon>.
  25. Ježek, J., Cooper, K. F., & Strich, R. (2018). Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Dynamics: The Yin and Yang of Mitochondrial Dysfunction and Cancer Progression. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 7(1), 13. <https://doi.org/10.3390/antiox7010013>
  26. Jones RG, Thompson CB. Revving the engine: signal transduction fuels T cell activation. *Immunity*. 2007 Aug;27(2):173-8. doi: 10.1016/j.immuni.2007.07.008. PMID: 17723208.
  27. Jones, N., Cronin, J. G., Dolton, G., Panetti, S., Schauenburg, A. J., Galloway, S. A. E., Sewell, A. K., Cole, D. K., Thornton, C. A., & Francis, N. J. (2017). Metabolic adaptation of human CD4+ and CD8+ T-cells to T-cell receptor-mediated stimulation. *Frontiers in Immunology*, 8(NOV).

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01516>.

28. Jornayvaz, F. R., & Shulman, G. I. (2010). Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays in Biochemistry*, *47*, 69–84. <https://doi.org/10.1042/bse0470069>.
29. Karkhanis, V. S., & Joshi, J. M. (2012). Pleural effusion: diagnosis, treatment, and management. *Open Access Emergency Medicine: OAEM*, *4*, 31–52. <https://doi.org/10.2147/OAEM.S29942>.
30. Lemjabbar-Alaoui, H., Hassan, O. U., Yang, Y. W., & Buchanan, P. (2015). Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochimica et Biophysica acta*, *1856*(2), 189–210. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.08.002>.
31. MacIver, N. J., Michalek, R. D., & Rathmell, J. C. (2013). Metabolic regulation of T lymphocytes. *Annual Review of Immunology*, *31*, 259–283. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095956>.
32. Murthy, P., Ekeke, C. N., Russell, K. L., Butler, S. C., Wang, Y., Luketich, J. D., Soloff, A. C., Dhupar, R., & Lotze, M. T. (2019). Making cold malignant pleural effusions hot: driving novel immunotherapies. *OncolImmunology*, *8*(4), 1–24. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1554969>.
33. Organización Mundial de la Salud (1 de abril de 2021). *Cáncer*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
34. O'Sullivan, D., & Pearce, E. L. (2015). Targeting T cell metabolism for therapy. *Trends in Immunology*, *36*(2), 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.12.004>.
35. Palit, S., Heuser, C., de Almeida, G. P., Theis, F. J., & Zielinski, C. E. (2019). Meeting the Challenges of High-Dimensional Single-Cell Data Analysis in Immunology. *Frontiers In Immunology*, *10*, 1515. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01515>.
36. Patsoukis, N., Bardhan, K., Chatterjee, P., Sari, D., Liu, B., Bell, L. N., Karoly, E. D., Freeman, G. J., Petkova, V., Seth, P., Li, L., & Boussiotis, V. A. (2015). PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nature Communications*, *6*, 6692. <https://doi.org/10.1038/ncomms7692>.

37. Pearce, E. L., Poffenberger, M. C., Chang, C. H., & Jones, R. G. (2013). Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6155), 1242454. <https://doi.org/10.1126/science.1242454>.
38. Porcel, J. M. (2013). Diagnosis of Pleural Effusions. *Hospital Medicine Clinics*, 2(3), 337–357. <https://doi.org/10.1016/j.ehmc.2013.02.001>.
39. Porcel, J. M., & Light, R. W. (2006). Diagnostic approach to pleural effusion in adults. *American Family Physician*, 73(7), 1211–1220.
40. Prado, H., & Romero, S. (2020). The Role of Exhaustion in Tumor-Induced T-Cell Dysfunction in Cancer. In N. Rezaei, *Cancer Immunology: A Translational Medicine Context* (2nd ed., pp. 117-132). Suiza: Springer.
41. Prado, H., & Sandoval, R. (2020). T-Cell Metabolism and Its Dysfunction Induced by Cancer. In N. Rezaei, *Cancer Immunology: A Translational Medicine Context* (2nd ed., pp. 107-116). Suiza: Springer.
42. Prado-Garcia, H., Aguilar-Cazares, D., Flores-Vergara, H., Mandoki, J. J., & Lopez-Gonzalez, J. S. (2005). Effector, memory and naïve CD8+ T cells in peripheral blood and pleural effusion from lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 47(3), 361–371. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2004.07.046>.
43. Prado-Garcia, H., Romero-Garcia, S., Castro-Flores, D. A., & Rumbo-Nava, U. (2019). Deficient glucose uptake is linked to impaired Glut1 expression upon CD3/CD28 stimulation in memory T cells from pleural effusions secondary to lung cancer. *Scandinavian Journal of Immunology*, 90(3), e12802. <https://doi.org/10.1111/sji.12802>.
44. Prado-Garcia, H., Romero-Garcia, S., Morales-Fuentes, J. *et al.* Activation-induced cell death of memory CD8+ T cells from pleural effusion of lung cancer patients is mediated by the type II Fas-induced apoptotic pathway. *Cancer immunology, Immunotherapy*: 61, 1065–1080 (2012). <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/s00262-011-1165-5>
45. Prado-Garcia, H., Romero-Garcia, S., Puerto-Aquino, A., & Rumbo-Nava, U. (2017). The PD-L1/PD-1 pathway promotes dysfunction, but not



- "exhaustion", in tumor-responding T cells from pleural effusions in lung cancer patients. *Cancer immunology, Immunotherapy : CII*, 66(6), 765–776. <https://doi.org/10.1007/s00262-017-1979-x>.
46. Proliferation | FlowJo Documentation for FlowJo, SeqGeq, and FlowJo Portal. (2021). Consultado el 10 Junio 2021, en <https://docs.flowjo.com/flowjo/experiment-based-platforms/proliferation/>
47. Redza-Dutordoir, M., & Averill-Bates, D. A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica acta*, 1863(12), 2977–2992. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>.
48. Romero-Garcia, S., Lopez-Gonzalez, J. S., B´ez-Viveros, J. L., Aguilar-Cazares, D., & Prado-Garcia, H. (2011). Tumor cell metabolism. *Cancer Biology & Therapy*, 12(11), 939–948. <https://doi.org/10.4161/cbt.12.11.18140>.
49. Sahn S. A. (1993). Pleural effusion in lung cancer. *Clinics in Chest Medicine*, 14(1), 189–200.
50. Sandoval, R. (2018). *Análisis de la masa y el potencial de membrana mitocondrial en linfocitos T CD8+ de pacientes con cáncer de pulmón* (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional.
51. Sauls, R. S., & Taylor, B. N. (2019). Histology, T-Cell Lymphocyte. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30571054>.
52. Scharping, N. E., Menk, A. V., Moreci, R. S., Whetstone, R. D., Dadey, R. E., Watkins, S. C., Ferris, R. L., & Delgoffe, G. M. (2016). The Tumor Microenvironment Represses T Cell Mitochondrial Biogenesis to Drive Intratumoral T Cell Metabolic Insufficiency and Dysfunction. *Immunity*, 45(2), 374–388. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.07.009>.
53. Sckisel, G. D., Bouchlaka, M. N., Monjazebe, A. M., Crittenden, M., Curti, B. D., Wilkins, D. E., Alderson, K. A., Sungur, C. M., Ames, E., Mirsoian, A., Reddy, A., Alexander, W., Soulika, A., Blazar, B. R., Longo, D. L., Wiltrout, R. H., & Murphy, W. J. (2015). Out-of-Sequence Signal 3 Paralyzes Primary

- CD4(+) T-Cell-Dependent Immunity. *Immunity*, 43(2), 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.023>.
54. Scott, I., & Youle, R. J. (2010). Mitochondrial fission and fusion. *Essays in biochemistry*, 47, 85–98. <https://doi.org/10.1042/bse0470085> Scott, I., & Youle, R. J. (2010). Mitochondrial fission and fusion. *Essays in Biochemistry*, 47, 85–98. <https://doi.org/10.1042/BSE0470085>.
55. Shao, T., Shi, W., Zheng, J. Y., Xu, X. X., Lin, A. F., Xiang, L. X., & Shao, J. Z. (2018). Costimulatory function of Cd58/Cd2 interaction in adaptive humoral immunity in a zebrafish model. *Frontiers in Immunology*, 9(MAY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01204>.
56. Sheridan, C., & Martin, S. J. (2010). Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis. *Mitochondrion*, 10(6), 640–648. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.08.005>.
57. Siddiqui, F., & Siddiqui, A. H. (2019). *Cancer, Lung*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). <http://europepmc.org/books/NBK482357>.
58. Siska, P. J., Beckermann, K. E., Mason, F. M., Andrejeva, G., Greenplate, A. R., Sendor, A. B., Chiang, Y. J., Corona, A. L., Gemta, L. F., Vincent, B. G., Wang, R. C., Kim, B., Hong, J., Chen, C. L., Bullock, T. N., Irish, J. M., Rathmell, W. K., & Rathmell, J. C. (2017). Mitochondrial dysregulation and glycolytic insufficiency functionally impair CD8 T cells infiltrating human renal cell carcinoma. *JCI Insight*, 2(12), e93411. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.93411>.
59. Skok, K., Hladnik, G., Grm, A., & Crnjac, A. (2019). Malignant Pleural Effusion and Its Current Management: A Review. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 55(8), 490. <https://doi.org/10.3390/medicina55080490>.
60. Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V., & Prudent, J. (2018). Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays in Biochemistry*, 62(3), 341–360.
61. Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), 87–108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>.

62. van der Windt, G. J. W., Everts, B., Chang, C. H., Curtis, J. D., Freitas, T. C., Amiel, E., Pearce, E. J., & Pearce, E. L. (2012). Mitochondrial Respiratory Capacity Is a Critical Regulator of CD8 + T Cell Memory Development. *Immunity*, 36(1), 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.12.007>.
63. Wölfel, M., Kuball, J., Eyrich, M., Schlegel, P. G., & Greenberg, P. D. (2008). Use of CD137 to study the full repertoire of CD8+ T cells without the need to know epitope specificities. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 73(11), 1043–1049. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20594>
64. Yalcin, N. G., Choong, C. K., & Eizenberg, N. (2013). Anatomy and pathophysiology of the pleura and pleural space. *Thoracic surgery Clinics*, 23(1), 1–v. <https://doi.org/10.1016/j.thorsurg.2012.10.008>.
65. Yin, Z., Bai, L., Li, W., Zeng, T., Tian, H., & Cui, J. (2019). Targeting T cell metabolism in the tumor microenvironment: an anti-cancer therapeutic strategy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 38(1), 403.