



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Análisis de la captación de glucosa en linfocitos T
provenientes de pacientes con cáncer pulmonar**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

DANIELA ALEJANDRA CASTRO FLORES

DIRECTOR DE TESIS:

DR. HERIBERTO PRADO GARCÍA

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2022





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Índice

I.	Índice de figuras y tablas	1
II.	Abreviaturas.....	2
III.	Introducción.....	3
III.I.	Cáncer.....	3
III.II.	Derrame pleural.....	3
III.III.	Linfocitos T.....	4
III.IV.	Activación de los linfocitos T.....	5
III.V.	Metabolismo y captación de glucosa en linfocitos T.....	6
III.VI.	Proteína de muerte celular programada (PD-1) y PD-L1.....	9
III.VII.	La hipoxia en la función de los linfocitos T	10
IV.	Antecedentes.....	11
IV.I.	Microambiente tumoral.....	11
IV.II.	Alteraciones en el metabolismo de linfocitos T en cáncer.....	14
IV.III.	Bloqueo de la vía PD-1/PD-L1.....	15
V.	Justificación.....	16
VI.	Hipótesis.....	17
VII.	Objetivos.....	17
VIII.	Materiales y métodos.....	18
IX.	Resultados.....	24
IX.I.	Proporción de linfocitos T CD8+ fue menor en muestras de derrame pleural maligno y no maligno.....	24
IX.II.	Proporción de linfocitos Tmem fue la más representativa en muestras de derrame pleural maligno y no maligno.....	25
IX.III.	El porcentaje de linfocitos Tmem que captó glucosa disminuyó al realizar la coestimulación en condición de hipoxia en los derrames pleurales malignos.....	27
IX.IV.	El porcentaje de células 2NBDG-/PD-1+ aumentó al coestimular en condición de hipoxia en los linfocitos Tmem provenientes de derrames pleurales malignos....	29
IX.V.	Los linfocitos Tmem no aumentaron la captación de glucosa al bloquear a la molécula PD-L1 en los derrames pleurales malignos.....	32
X.	Discusión.....	34
XI.	Conclusión.....	39
XII.	Anexo.....	40
XIII.	Referencias.....	42

I. Índice de figuras y tablas

Figura 1.- Esquema del análisis citométrico para la captación de glucosa.

Figura 2.- Esquema del análisis citométrico para la captación de glucosa al realizar el bloqueo de la molécula PD-L1.

Figura 3.- Porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+.

Figura 4.- Imagen representativa del alto porcentaje de linfocitos T de memoria en derrame pleural maligno.

Figura 5.- Porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+ con fenotipo de memoria, *naïve* o efector.

Figura 6.- Porcentaje de linfocitos Tmem que captan 2NBDG bajo condición de normoxia o hipoxia.

Figura 7.- Imagen representativa del aumento de linfocitos Tmem 2NBDG-/PD-1+ en los derrames pleurales malignos.

Figura 8.- Porcentaje de linfocitos Tmem provenientes de derrame pleural con fenotipo 2NBDG+ o PD-1+ en condición de hipoxia.

Figura 9.- Porcentaje de linfocitos Tmem provenientes de sangre periférica con fenotipo 2NBDG+ o PD-1+ en condición de hipoxia.

Figura 10.- Intensidad media de fluorescencia relativa de PD-L1 de linfocitos Tmem provenientes de pacientes con cáncer pulmonar.

Figura 11.- Porcentaje de linfocitos Tmem provenientes de derrame pleural maligno que captan 2NBDG al bloquear a la molécula PD-L1.

Tabla 1.- Listado de anticuerpos utilizados para la inmunofenotipificación.

Tabla 2.- Porcentaje de linfocitos T CD4+ con fenotipo 2NBDG+/PD-1+.

Tabla 3.- Porcentaje de linfocitos T CD8+ con fenotipo 2NBDG+/PD-1+.

II. Abreviaturas

2NBDG: 2-N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) Amino)-2-Deoxiglucosa)
7AAD: 7-amino-actinomicina D
APC: Célula presentadora de antígeno profesional (Por sus siglas en inglés)
CD: Cluster de diferenciación (Por sus siglas en inglés)
CMN: Células mononucleares
CP: Cáncer de pulmón
CTL: Linfocito T citotóxico (Por sus siglas en inglés)
DAPI: 4',6-Diamidino-2-Fenilindole, Dilactato
DP: Derrame Pleural
DPM: Derrame pleural maligno
DPnM: Derrame pleural no maligno
FAO: Oxidación de ácidos grasos (Por sus siglas en inglés)
FSC: Forward Scatter
Glut1: Transportador de glucosa 1
HIF: Factor de transcripción inducible por hipoxia (Por sus siglas en inglés)
IL: Interleucina
MDSC: Células supresoras derivadas mieloides (Por sus siglas en inglés)
MHC: Complejo principal de histocompatibilidad (Por sus siglas en inglés)
mTOR: *Mammalian Target of Rapamycin*
NSCLC: Cáncer de pulmón de células no pequeñas (Por sus siglas en inglés)
OXPHOS: Fosforilación oxidativa (Por sus siglas en inglés)
PD-1: Proteína de muerte celular programada 1
PD-L1: Ligando de proteína de muerte celular programada 1
rMFI: Intensidad media de fluorescencia relativa
SCLC: Cáncer de pulmón de células pequeñas (Por sus siglas en inglés)
SSC: Side Scatter
SP: Sangre periférica
TAM's: Macrófagos asociados a tumores (Por sus siglas en inglés)
TCA: Ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Por sus siglas en inglés)
TCR: Receptor de linfocito T (Por sus siglas en inglés)
Tefec: Linfocito T efectora
TIL's: Linfocitos infiltrantes de tumores (Por sus siglas en inglés)
Tmem: Linfocitos T de memoria

III. Introducción

III.I Cáncer

El cáncer es una enfermedad genética, que se da por una serie de mutaciones en los genes involucrados en la función, crecimiento y ciclo celular. Se caracteriza por una proliferación ilimitada de células que pueden invadir más allá de los límites normales del tejido y hacer metástasis a órganos distantes^{1,2}.

Una célula normal se puede convertir en célula cancerosa cuando los proto-oncogenes, generalmente involucrados en promover el crecimiento celular, son activados por mutaciones³. La tasa de mutaciones puede aumentar en presencia de sustancias mutagénicas como el humo del tabaco, aflatoxinas producidas por hongos naturalmente o por varias formas de radiación como la luz ultravioleta².

Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en el mundo. En el año 2020 se reportaron 2, 206,771 nuevos casos de este tipo de cáncer a nivel mundial y 7,588 nuevos casos en México. En México, ha afectado a 4,503 hombres y 3,085 mujeres, llevando a un total de 7,100 muertes a causa de este padecimiento en ambos sexos. El cáncer de pulmón se encuentra entre los principales tipos de cáncer que afectan a hombres en México⁴.

El cáncer de pulmón proviene de las células del epitelio respiratorio y puede ser dividido en dos categorías: Cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), que es altamente invasivo y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) que cuenta con mayor incidencia. A su vez, el NSCLC está dividido en 3 subtipos patológicos importantes: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, y carcinoma de células grandes. El subtipo adenocarcinoma ha sido el principal tipo patológico en la población fumadora y no fumadora^{5,6}.

III.II Derrame pleural

El espacio pleural está definido por la pleura visceral que cubre al pulmón y la pleura parietal que cubre la pared del tórax y el diafragma. El espacio pleural contiene una pequeña cantidad de fluido que es secretado y reabsorbido por la pleura parietal para mantener la yuxtaposición durante la respiración. La pleura parietal contiene múltiples estomas linfáticos que reabsorben el fluido pleural^{7,8}.

Los derrames pleurales ocurren cuando hay mucha producción o poca reabsorción de líquido en el espacio pleural, o una combinación de ambos. Los derrames pleurales se dividen en transudados o exudados, el primero es causado por un incremento en la presión hidrostática o por el decremento de la presión oncótica mientras que el segundo es provocado por el aumento en la permeabilidad del drenaje linfático^{8,9}. Los derrames pleurales surgen de problemas cardíacos, procesos inflamatorios como la neumonía, tuberculosis o el cáncer de pulmón.

Derrame pleural maligno

El derrame pleural maligno se define como la acumulación de una cantidad significativa de exudado en el espacio pleural, con presencia de células malignas o tejido de tumor. Los derrames pleurales malignos representan un estadio avanzado y usualmente irreversible del cáncer. El cáncer de pulmón es el principal tumor maligno causante de los derrames pleurales malignos en el mundo, uno de cada 4 pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón lo desarrolla^{10,11}. Los derrames pleurales malignos pueden ser útiles como un modelo para investigar las diferentes poblaciones celulares cercanas al tumor¹².

III.III Linfocitos T

Los linfocitos T son orquestadoras centrales de inmunidad y tolerancia adaptativa específica de antígeno. Los receptores expresados por los linfocitos T (TCR) son resultado de un proceso de reordenamiento aleatorio junto con el empalme de múltiples segmentos de ADN que codifican para áreas de unión a antígeno¹³. El TCR es un complejo conformado por cadenas transmembranales α y β en la mayoría de los linfocitos T, que se acopla con la molécula CD3. Los linfocitos T se identifican en relación al co-receptor expresado en su superficie celular; los linfocitos T citotóxicos expresan al marcador CD8 mientras que los linfocitos T cooperadores expresan la molécula CD4¹⁴.

Linfocitos T CD8+

Los linfocitos T citotóxicos reconocen y eliminan células infectadas con patógenos, células alogénicas y células transformadas. Para que los linfocitos T CD8+ reconozcan estas células anormales, las células presentadoras de antígeno profesionales (APC) presentan péptidos antigénicos al TCR en el contexto de moléculas del MHC de clase I.

Los linfocitos T citotóxicos (CTL's) activados al reconocer a su célula blanco liberan gránulos líticos con granzima y perforina, induciendo así la apoptosis de la célula dañada¹⁵.

Linfocitos T CD4+

Los linfocitos T cooperadoras tienen un papel importante en la respuesta inmune celular y humoral por la producción de múltiples citocinas. Una vez que las APC's presentan el péptido antigénico al TCR por moléculas del MHC de clase II expresado en los linfocitos T CD4+, éstas proliferan y se diferencian en diferentes subtipos celulares. Los subtipos Th1, Th2, Th3, Th17, Treg entre otros, secretan diferentes perfiles de citocinas que impulsan a una respuesta inmune específica. Por la generación de estos subtipos celulares, el sistema inmune puede protegerse a sí mismo y protegerse contra una activación inapropiada^{16,17}.

III.IV Activación de los linfocitos T

El reconocimiento antigénico por parte de los linfocitos T inicia su activación. No obstante, además del reconocimiento antigénico, los linfocitos T requieren de señales secundarias dadas por moléculas de co-estimulación para activarse adecuadamente. CD28 induce señales co-estimuladoras uniéndose a una de dos moléculas presentes en las APC's, CD80 o CD86. Esta unión amplifica las señales del TCR al activar moléculas de señalización adicionales^{17,18}. La señal de activación dada por el TCR y por la molécula CD28 activa la vía PI3K/Akt/mTOR la cual está involucrada en la regulación del ciclo celular, síntesis de proteínas, crecimiento celular y metabolismo glucolítico (Imagen 1).

Los motivos citoplasmáticos de CD28 son necesarios para reclutar a la enzima fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) que fosforila a PIP2 para producir fosfatidilinositol 3, 4, 5 trifosfato (PIP3), la cual se une y activa a la serina-treonina cinasa (Akt). Akt fosforila importantes sustratos, activando a mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*) e induciendo la translocación de Glut1, principal transportador de glucosa en los linfocitos T a la membrana plasmática, promoviendo así el metabolismo glucolítico. mTOR interactúa con otras proteínas promoviendo la síntesis de RNA ribosomal y de nucleoproteínas induciendo la proliferación, señales de supervivencia y crecimiento^{19,20}.

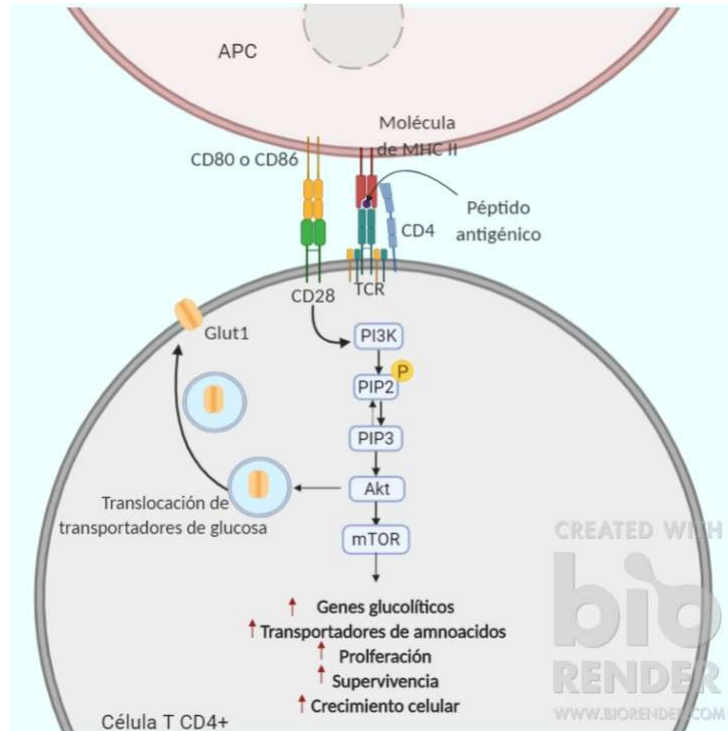


Imagen 1. Activación de los linfocitos T mediada por la presentación antigénica. Creado en biorender.com

III.V Metabolismo y captación de glucosa en linfocitos T

Los linfocitos T adoptan diferentes perfiles funcionales (citotóxicos, pro-inflamatorios, anti-inflamatorios, etc.) dependiendo del ambiente y de las señales recibidas de otras células inmunes. Esta diversidad de estados funcionales requiere de una plasticidad del metabolismo energético debido a que la regulación de la captación de nutrientes es de alta importancia para la homeostasis, diferenciación y actividad inmune de los linfocitos T.

Durante la activación, los linfocitos T deben proliferar rápidamente y ejercer sus funciones efectoras incrementando dramáticamente la biosíntesis de constituyentes intracelulares incluyendo membranas lipídicas, proteínas y ácidos nucleicos. Por esta razón los linfocitos T pasan de la oxidación de lípidos hacia la glucólisis, donde se producen metabolitos intermediarios para el crecimiento celular. La inadecuada captación de nutrientes o alteraciones en el metabolismo puede disminuir la proliferación y activación de los linfocitos T llevando a la anergia o a la muerte celular²¹.

Metabolismo de linfocitos Tmem y *naïve*

Antes del encuentro con el antígeno, los linfocitos T *naïve* se mantienen en un estado quiescente con una baja actividad metabólica y transcripcional. Los linfocitos T *naïve* captan bajos niveles de glucosa y aminoácidos realizando preferentemente fosforilación oxidativa y oxidación de ácidos grasos para mantener los niveles necesarios de ATP. Estas células permanecen circulando a través de la sangre y los órganos linfoides por un periodo de tiempo extenso, por lo que el metabolismo se mantiene en niveles basales²². Cuando los linfocitos T *naïve* entran en contacto con su antígeno pasan de un estado quiescente a un estado activo, diferenciándose a linfocitos T efectoras.

Después de la eliminación de los patógenos, la mayoría de los linfocitos T efectoras mueren por apoptosis y algunas se diferencian en linfocitos Tmem²³. Estas linfocitos Tmem son una población heterogénea de células de larga vida que ya han sido expuestas a un antígeno. Se auto-renuevan y se someten a una rápida expansión clonal así como a una rápida obtención de las funciones efectoras, una vez que son reestimuladas o expuestas al mismo antígeno²⁴. Los linfocitos Tmem por lo tanto, son importantes para una rápida respuesta inmune, por lo que permanecen en los órganos linfoides o en circulación en la sangre como células quiescentes²⁵. Dentro de la población de linfocitos Tmem se han reconocido diferentes subtipos celulares que basan su metabolismo en la OXPHOS o en FAO como los linfocitos Tmem central o bien, que no dependen metabólicamente de la OXPHOS como los linfocitos Tmem efectora, las cuales necesitan la glucólisis para su activación temprana^{26,27}.

Se pueden diferenciar las diferentes subpoblaciones de linfocitos T mediante la expresión de diferentes marcadores en su superficie celular. Los linfocitos T *naïve* mantienen un fenotipo CD45RA+/CD27+ mientras que los linfocitos Tmem pasan a expresar los marcadores CD45RO+/CD27+

Metabolismo de linfocitos T efectores

La activación del linfocito T y la diferenciación a linfocito T efectora se caracteriza por el cambio de OXPHOS a glucólisis aeróbica.

En la glucólisis ocurren una serie de reacciones enzimáticas donde se forma piruvato a partir de la glucosa. Una vez que la glucólisis se lleva a cabo, el piruvato se oxida en la mitocondria formando acetil-CoA necesaria para el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) en donde se forman los intermediarios usados por rutas metabólicas biosintéticas. Además, en la mitocondria también se genera NADH y FADH utilizadas para formar ATP a través de la cadena transportadora de electrones (ETC). De esta forma, a partir de la glucólisis, se proporciona la energía así como la síntesis de material necesario para soportar una rápida proliferación²⁸.

Durante la glucólisis la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es usada para llevar a cabo la absorción de la glucosa y es restaurada nuevamente en la ETC. En condiciones hipóxicas el piruvato es transformado a lactato en donde se regenera el NAD⁺ debido a la baja actividad de la ETC bajo estas condiciones (Imagen 2). Los linfocitos T efectores transforman el piruvato a lactato aún bajo condiciones aeróbicas, este fenómeno se conoce como efecto Warburg y es usado para soportar la rápida proliferación y crecimiento celular.

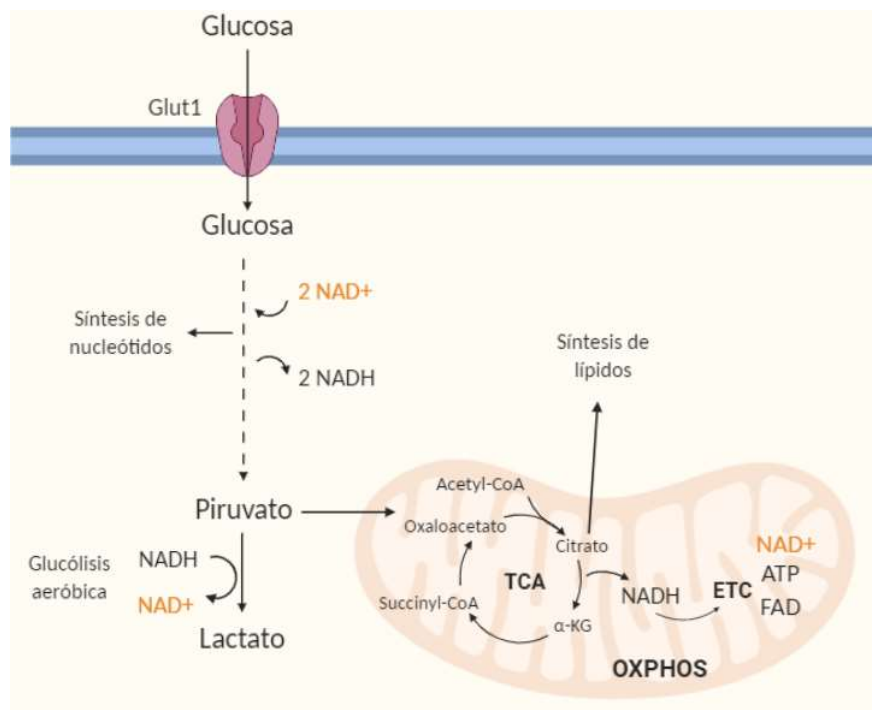


Imagen 2. Metabolismo de los linfocitos T activados. La glucosa es transformada en piruvato, generando precursores para la biosíntesis de nucleótidos, lípidos, aminoácidos, entre otros. El NAD⁺ necesario para llevar a cabo la glucólisis es regenerado a partir de la conversión de piruvato a lactato aún bajo condiciones aeróbicas (Efecto Warburg). Creado en biorender.com

III.VI Proteína de muerte celular programada (PD-1) y PD-L1

El linfocito T regula su activación para mantener la tolerancia y la homeostasis inmune, evitando el daño a tejidos por una respuesta inmune excesiva. El receptor inhibitorio de muerte celular programada 1 (PD-1) es un mediador central de la tolerancia central y periférica. PD-1 es miembro de la familia de las inmunoglobulinas (Ig), se expresa en varias células inmunes, incluyendo a los linfocitos T activados. La ligación del TCR con moléculas de activación puede regular positivamente la expresión de PD-1^{29,30}.

PD-1 se une a uno de sus dos ligandos PD-L1 o PD-L2. PD-L1 se expresa constitutivamente en células supresoras derivadas de mieloides, APC's y células no hematopoyéticas³¹.

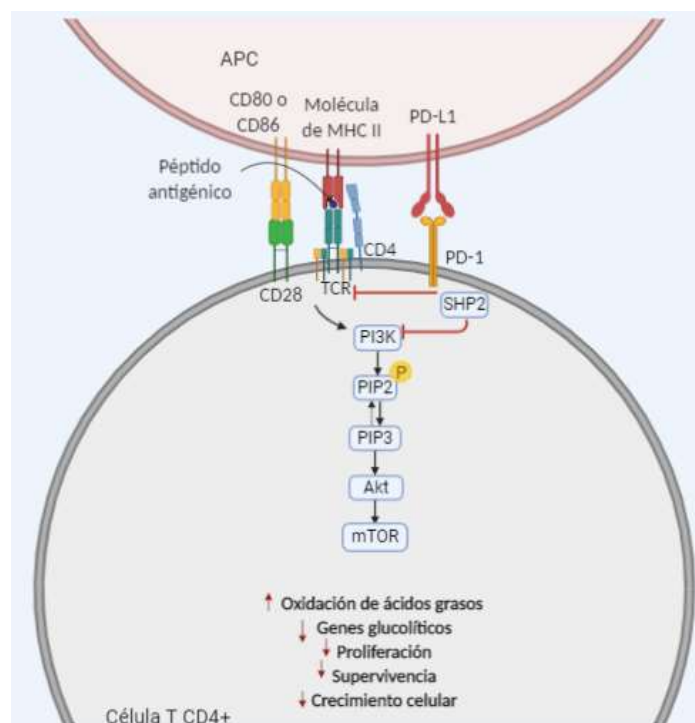


Imagen 3. Inhibición de la activación de los linfocitos T por la vía PD-1/PD-L1. Se disminuye la expresión de genes glucolíticos, así como la captación de glucosa al inhibir la vía PI3K/Akt/mTOR. Creado en biorender.com

Cuando PD-1 se une a su ligando puede activar señales intracelulares que reclutan a la tirosina fosfatasa SHP-2, que a su vez desfosforila las señales de activación del TCR, inhibiendo la actividad de PI3K y por lo tanto de la vía PI3K/Akt/mTOR (Imagen 3).

PD-1 también activa PTEN, un gen que inhibe a PI3K y además puede disminuir la activación de Akt. Esto refleja que PD-1 puede ejercer sus efectos en la diferenciación y supervivencia celular por la inhibición de los eventos tempranos de activación que son regulados positivamente por CD28^{29,31}.

III.VII La hipoxia en la función de los linfocitos T

La concentración de oxígeno es un factor crucial en la proliferación y supervivencia celular. Las células inmunes son reclutadas desde el sistema circulatorio rico en oxígeno, hacia zonas fisiológicamente hipóxicas (ejem. 3.9% O₂ en mucosa rectal) o hacia zonas patológicamente hipóxicas (~2.2% O₂ en cáncer de pulmón). La oxigenación de los tejidos en condiciones normales varía ampliamente. En un ambiente fisiológicamente hipóxico se mantiene la homeostasis celular mediante mecanismos que regulan la expresión de genes involucrados en la producción de metabolitos y proteínas endógenas que regulan diferentes rutas metabólicas³². Factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIFs) coordinan la respuesta celular a la hipoxia. Dentro de esta familia de factores de transcripción, el factor de transcripción inducible por hipoxia 1 alfa (HIF-1 α) promueve la adaptación de las células a la hipoxia por el bajo consumo de oxígeno a través del incremento de expresión de enzimas glucolíticas que ayudan a la degradación del piruvato a lactato³³. Por lo tanto HIF-1 α ayuda a mantener la glucólisis durante la respuesta de los linfocitos T.

IV. Antecedentes

IV.I Microambiente tumoral

El microambiente tumoral es un sistema complejo en donde la interacción entre diferentes poblaciones celulares con el tumor determina la respuesta antitumoral o bien, el desarrollo y progresión del cáncer³⁴. Dentro del microambiente tumoral se pueden encontrar varios tipos celulares, incluyendo linfocitos, macrófagos, células NK, células supresoras mieloides, fibroblastos, entre otras³⁵.

Un factor importante que favorece la actividad antitumoral, es la capacidad que tienen los linfocitos para infiltrar tumores. Se conoce que la actividad de los linfocitos infiltrantes de tumores está asociada a una mayor supervivencia de los pacientes con diferentes tipos de cáncer³⁶.

Sin embargo, se ha demostrado que la actividad del tumor altera el fenotipo y la función de las células inmunes. De esta forma, se promueve la supresión o tolerancia inmunológica³⁷. Entre los mecanismos utilizados por el tumor para su progresión y supervivencia es el remodelamiento de su ambiente circundante³⁴.

Hipoxia

La angiogénesis, es decir, la creación de vasos sanguíneos a partir de otros existentes es uno de los *hallmarks* del cáncer. La angiogénesis es necesaria para la obtención de oxígeno y nutrientes para soportar una rápida proliferación tumoral. La formación de nuevos vasos sanguíneos y un crecimiento tumoral rápido, resulta en una vascularización atrofiada que genera zonas hipóxicas³⁸.

La generación de un ambiente hipóxico es una característica común de los tumores sólidos provocado por la vascularización atrofiada y a las anormalidades metabólicas asociadas a un rápido crecimiento tumoral³⁹. La angiogénesis atrofiada dificulta la infiltración de linfocitos T efectores hacia los tejidos tumorales, ya que a menudo, los vasos sanguíneos no expresan los receptores necesarios para la extravasación⁴⁰.

El ambiente hipóxico promueve la apoptosis en células no malignas, y puede afectar la producción de citocinas como IL-2 que disminuye la proliferación en los linfocitos T⁴¹. La

hipoxia también induce la liberación de IL-10 y de factores de crecimiento que promueve la diferenciación de macrófagos asociados a tumores (TAM) que presentan funciones inmunosupresivas⁴².

Los HIF's permiten al tumor adaptarse al microambiente hipóxico, promoviendo así su progresión y la evasión de la actividad antitumoral de células inmunes circundantes. Por ejemplo, HIF1 α promueve, entre otras cosas, la expresión de PD-L1 en las células tumorales, promoviendo de esta forma la vía PD-1/PD-L1⁴³.

Reclutamiento de células del sistema inmune supresoras

Los macrófagos son un componente primario de la respuesta inmune innata. Esta población celular puede adoptar dos perfiles principales dependiendo de los estímulos recibidos en el microambiente en que se encuentren. El perfil M1 efectúa una respuesta pro-inflamatoria contra patógenos o células tumorales, mientras que el perfil M2 ejerce un fenotipo anti-inflamatorio, favoreciendo el reparamiento de los tejidos y la progresión del tumor⁴⁴.

Por lo tanto, los macrófagos presentes en el microambiente tumoral, mejor conocidos como macrófagos asociados a tumores, pueden ayudar o suprimir la respuesta inmune antitumoral. En diferentes tipos de cáncer, incluyendo el cáncer colorrectal, los TAM's mantienen un fenotipo M2⁴⁵. Así mismo, altos infiltrados de TAM's en el tumor están correlacionados a una baja supervivencia en pacientes con cáncer de mama, ovario y cáncer de pulmón⁴⁶.

Se ha registrado que los TAM's inhiben la citotoxicidad mediada por los linfocitos T. Los TAM's disminuyen los niveles de L-arginina necesarios para la re-expresión de la cadena CD3 ζ , inhibiendo la respuesta antigénica al suprimir la activación de los linfocitos T⁴⁷. De igual forma, los TAM's pueden inhibir la activación de los linfocitos T al expresar moléculas inhibitorias como PD-L1 o CTLA-4.

Expresión de moléculas coinhibitorias

Las células tumorales evaden la actividad antitumoral, aprovechando mecanismos de regulación de las mismas células inmunes⁴⁸. Entre estos mecanismos, el uso de la vía PD-1/PD-L1 ha sido el más estudiado en los últimos años. Las células tumorales, así como algunas células inmunes supresoras, incrementan la expresión de PD-L1, que al unirse a su receptor PD-1 bloquean las señales de activación dadas a través del TCR, impidiendo que el linfocito T realice su rearrreglo metabólico hacia la glucólisis⁴⁹.

En varios tipos de cáncer, incluyendo las células de adenocarcinoma pancreático y adenocarcinoma renal se ha registrado la sobreexpresión de la molécula PD-L1. Esta anomalía se ha asociado a un bajo pronóstico en la esperanza de vida de los pacientes, lo cual sugiere que la vía PD-1/PD-L1 ha ayudado a la supervivencia del tumor^{50,51}. Como se mencionó anteriormente, en condiciones de hipoxia se promueve la expresión de PD-L1. Se conoce que HIF1 α está involucrada en el incremento de la expresión de PD-L1 en células de carcinoma renal, melanoma murino, cáncer de mama, próstata y pulmón^{50,52,53}.

De igual manera, se ha reconocido que las células inmunes presentes en el microentorno del tumor también incrementan la expresión de PD-L1. Se ha sugerido que en cáncer de mama, las células tumorales inducen la expresión de PD-L1 en TAM's, que a su vez pueden ocasionar la inhibición de linfocitos T⁵⁴. Así mismo, Kuang y colaboradores demostraron que los TAM's con alta expresión de PD-L1 inducen la supresión de la actividad de los linfocitos T específicos de tumor⁵⁵.

Las células supresoras derivadas mieloides (MDSC), son células inmunes que mantienen el potencial para diferenciarse a granulocitos, monocitos o células dendríticas. Estas células son abundantes durante alguna infección crónica o el cáncer. Las MDSC también aumentan la expresión de PD-L1 e interactúan con los linfocitos T exhaustos que expresan la molécula PD-1 dentro del microentorno del tumor⁵⁶.

En trabajos anteriores se ha demostrado el receptor inhibitorio PD-1 se encuentra sobreexpresado en linfocitos T infiltrantes de tumores y presentes en el estroma peritumoral de pacientes con NSCLC y carcinoma hepatocelular avanzado^{55,57}. Esta anomalía también se ha descrito en linfocitos de sangre periférica de pacientes con leucemia linfocítica crónica⁵⁸.

Por lo tanto, un ambiente hipóxico, la sobreexpresión de moléculas de inhibición en células tumorales, así como el reclutamiento de otras células inmunes supresoras, son algunos de los factores que alteran la función y metabolismo de los linfocitos T en el microambiente tumoral.

IV.II Alteraciones en el metabolismo de linfocitos T en cáncer

La correcta captación de nutrientes por parte de los linfocitos T es un punto clave para su diferenciación y actividad inmune. Los linfocitos T al activarse y someterse al reprogramamiento metabólico hacia la glucólisis deben, entre otras cosas, aumentar la expresión de transportadores de glucosa en su membrana celular, así como incrementar la expresión de enzimas involucradas en el metabolismo glucolítico⁵⁹.

Glut1 es una proteína de membrana responsable de facilitar la difusión de la glucosa a través de la membrana, y además es el principal transportador de glucosa en los linfocitos T⁶⁰. El aumento de los niveles de Glut1 y la captación de glucosa se correlacionan con un aumento del crecimiento y la proliferación celular⁶¹. En linfocitos T quiescentes, Glut1 tiene niveles bajos de expresión en la membrana celular, manteniéndose en vesículas intracelulares en donde es degradada. Posterior a la activación a través de la vía PI3K/Akt, Glut1 es translocado a la superficie celular aumentando la captación de glucosa y la glucólisis aeróbica en los linfocitos T activas^{20,62}. Deficiencias en la expresión de Glut1 y la disminución de la captación de glucosa puede disminuir la supervivencia y proliferación de los linfocitos T.

Se ha reportado que los linfocitos T infiltrantes de tumores renales muestran alteraciones en la captación de glucosa, así como baja activación del transportador de glucosa Glut1 posterior a la estimulación con anti-CD3⁶³. Además, se conoce que la interacción de PD-1 con su receptor PD-L1 afecta la expresión de Glut1, disminuyendo la captación de glucosa, provocando así, la disminución en la producción de IFN- γ en linfocitos T activados⁶⁴.

Por otro lado, la GAPDH (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) es una importante enzima que participa en la degradación de la glucosa para la obtención de moléculas de energía. GAPDH es regulada negativamente en linfocitos infiltrantes de tumores en carcinoma de células renales disminuyendo la captación de glucosa⁶³

Con anterioridad, nuestro equipo de trabajo reportó que los linfocitos T provenientes de derrames pleurales de pacientes con cáncer pulmonar no aumentaron la expresión del transportador de glucosa Glut1 posterior a la estimulación con anticuerpos anti-CD3/CD28. Esta anomalía fue observada bajo condición de hipoxia⁶⁵.

IV.III Bloqueo de la vía PD-1/PD-L1

El bloqueo de la vía PD-1/PD-L1 con anticuerpos anti-PD-L1 ha sido utilizada como un tratamiento en varios tipos de cáncer, mostrando una eficacia clínica en pacientes con melanoma, cáncer colorrectal, NSCLC, y linfoma de Hodgkin^{66,67}

La competencia por los nutrientes entre las células tumorales con los linfocitos adyacentes de tumor en el microambiente tumoral, han provocado la disminución de la capacidad efectora de los linfocitos T. En modelos de ratón, el bloqueo con anticuerpos anti-PD-L1 ha restaurado la capacidad glucolítica de linfocitos T infiltrantes de tumores, mejorando de esta forma la función efectora⁶⁸.

El bloqueo de la vía PD-1/PD-L1 también ha ayudado a mejorar la actividad citotóxica de linfocitos T CD8+ provenientes de derrames pleurales malignos, al restaurar la secreción de granzima B y perforina⁶⁹.

Se ha registrado que en los linfocitos T CD8+ que presentan altos niveles de expresión de la molécula PD-1 en pacientes con NSCLC presentan una mayor capacidad de restauración de la función efectora al bloquear a PD-1⁷⁰. Sin embargo, a pesar de que las terapias utilizadas para bloquear la interacción PD-1/PD-L1 han sido exitosas para mejorar la actividad antitumoral en algunos tipos de cáncer, la eficacia del tratamiento en pacientes con cáncer avanzado suele ser baja.

V. Justificación

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en el mundo. En México, esta enfermedad se encuentra entre los principales tipos de cáncer que afectan a hombres, teniendo como consecuencia una tasa de mortalidad alta. Estudiar el papel que juegan las células inmunes para la eliminación o mantenimiento de este tipo de cáncer es de suma importancia.

Entre las principales células inmunes involucradas en la actividad antitumoral se encuentran los linfocitos T. Se conoce que la baja captación de glucosa afecta la función efectora de los linfocitos T, lo cual puede impedir una respuesta eficaz contra el desarrollo del tumor. Sin embargo, poco se sabe acerca la actividad metabólica en los linfocitos T infiltrantes de derrames pleurales provenientes de pacientes con cáncer de pulmón.

Con anterioridad, nuestro equipo de trabajo reportó que los linfocitos T provenientes de derrames pleurales de pacientes con cáncer pulmonar no aumentan la expresión del transportador de glucosa Glut1 posterior a la estimulación con anticuerpos anti-CD3/CD28. Esta anomalía fue observada en condición de hipoxia.

Por lo tanto, estudiar la captación de glucosa, así como el vínculo que éste puede tener con moléculas de supresión como el receptor PD-1 podría ampliar nuestro entendimiento sobre las posibles alteraciones presentes en los linfocitos adyacentes en los tumores.

VI. Hipótesis

Los linfocitos T de pacientes con cáncer alteran su metabolismo y la expresión de moléculas de co-inhibición en respuesta al microambiente tumoral. Por lo tanto, al estimular la vía CD3 y a la molécula CD28 de linfocitos T de pacientes con cáncer de pulmón en condición de hipoxia, habrá menos captación de glucosa y una mayor expresión de la molécula PD-1 que los linfocitos T provenientes de pacientes con otras patologías. Así mismo, al bloquear la interacción de PD-1 con su ligando PD-L1 la captación de glucosa aumentará en los linfocitos T de pacientes con cáncer pulmonar.

VII. Objetivo general

Analizar la captación de glucosa y su vínculo con la expresión de la molécula PD-1 en los linfocitos Tmem de pacientes con cáncer de pulmón en condición de normoxia e hipoxia.

Objetivos particulares

- * Identificar la expresión de PD-1 y la captación del análogo de la glucosa 2NBDG en los linfocitos T de derrames pleurales malignos, no malignos y sangre periférica de pacientes con cáncer y sujetos sanos realizando estímulos bajo condiciones de normoxia o hipoxia.
- * Comparar la captación de glucosa de los linfocitos Tmem provenientes de derrames pleurales malignos y no malignos, así como de sangre periférica de pacientes con cáncer y sujetos sanos.
- * Analizar la expresión de PD-1 y la captación de glucosa de los linfocitos Tmem de derrames pleurales malignos en condiciones de normoxia o hipoxia al bloquear la interacción PD-1/PD-L1.

VIII. Materiales y métodos

Población estudiada

Las muestras del derrame pleural no maligno se obtuvieron de nueve pacientes (ocho hombres y una mujer) con una edad promedio de 43 años (en un rango de 19 a 82 años) con distintas patologías: Cinco con tuberculosis, dos con neumonía, uno con empiema y uno con hemotórax. Los derrames pleurales malignos, así como la sangre periférica de esta misma población se obtuvo de 23 pacientes con cáncer de pulmón entre ellos 16 hombres y siete mujeres con un promedio de edad de 56 años (en un rango de 18 a 82 años) con diferente diagnóstico: 15 con adenocarcinoma, cuatro con carcinoma pulmonar, tres con mesotelioma, y uno con cáncer pulmonar de células pequeñas. Se trataron muestras de sangre periférica de 11 sujetos sanos, entre ellos cinco hombres y seis mujeres, con un promedio de edad de 42 años (en un intervalo de 22 a 60 años). Las muestras de derrame pleural y sangre periférica de los pacientes y sujetos sanos se obtuvieron con permiso previo y aceptación de participación a través de la carta de consentimiento informado. El comité de Ciencia y Bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” aprobó el protocolo para la obtención de muestras biológicas con el número B07-13.

Separación de células mononucleares

El derrame pleural se obtuvo por toracocentesis por el personal médico perteneciente al hospital. El derrame se centrifugó a 1500 rpm durante 12 minutos, posteriormente el paquete celular se resuspendió en medio RPMI 1640. Las células mononucleares (CMN) y las células tumorales de los derrames pleurales se separaron al centrifugar a 1500 rpm durante 30 minutos en un gradiente discontinuo de Ficoll-Hypaque como se ha reportado anteriormente⁷¹. La sangre periférica se obtuvo por venopunción y se colocó en un gradiente de Ficoll-Hypaque, posteriormente se centrifugó a 1300 rpm durante 30 minutos. Las CMN de los derrames pleurales y de la sangre periférica fueron recolectadas de la interfase, se lavaron con medio RPMI-1640 y se preservaron en tanques de nitrógeno líquido hasta su uso.

Estimulación y cultivo de linfocitos T

Los viales de CMN fueron descongelados a 37°C en baño María y colocados en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% y 100U/mL de penicilina para su posterior centrifugación. El paquete celular se resuspendió en medio RPMI para realizar el conteo celular y la estimación de la viabilidad de cada muestra.

Las CMN se cultivaron en pozos con el anticuerpo agonista anti-CD3 (Anti-Human CD3 Functional Grade Purified, clona UCHT1, eBioscience, San Diego, CA, USA) previamente adsorbido a la placa a una concentración de 10µg/mL; o con los anticuerpos anti-CD3/CD28 acoplados a perlas (Kit T cell Activation/Expansion Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) a una relación de 5µL de perlas por cada 1x10⁶ de células. Los tratamientos sin estímulo se llevaron a cabo como control.

Las CMN fueron cultivadas en placas de 96 pozos a una concentración de 1x10⁶ cél/mL en 100µL de RPMI-1640 suplementado para los tratamientos sin estímulo y con anticuerpo anti-CD3; y a una concentración de 5x10⁶ cél/mL en 200µL de RPMI-1640 suplementado para el tratamiento con perlas de activación.

Todos los ensayos se mantuvieron en incubación a 37°C en atmósfera húmeda en condición de normoxia (21% O₂ y 5% CO₂) y en condición de hipoxia (2% O₂, 5% CO₂ y 93% N₂) dentro de una cámara de hipoxia (Billups-Rothenberg, San Diego, CA, USA) durante 48 horas.

Bloqueo de la molécula PD-L1

Las células mononucleares se estimularon con anticuerpos anti-CD3/CD28/CD2 acoplados a perlas como se describió anteriormente. Se añadió el anticuerpo antagonista anti-PD-L1 (Anti-Human PD-L1 clona 29E.2A3 BioLegend, San Diego, CA, USA) o el control de isotipo IgG a una concentración de 10µg/mL. Las células se cultivaron en placas de 96 pozos a una concentración de 5x10⁶ cél/mL en 200µL de RPMI-1640 suplementado y se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda en condiciones de normoxia o hipoxia por 48 horas.

Ensayo de captación de glucosa mediante el uso del compuesto 2NBDG

Las CMN se recuperaron y lavaron con medio RPMI-1640 sin glucosa. Posteriormente se incubaron a 37°C durante 1 hora en una disolución del compuesto 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-Deoxyglucose (2NBDG) (ThermoFisher, Invitrogen, Cambridge, MA, USA) a una concentración de 20µM en 100µL de medio RPMI-1640 sin glucosa. 2NBDG es un análogo de la glucosa, el cual tiene acoplado un compuesto fluorescente que permite monitorear la captación de glucosa en células vivas.

Inmunofenotipificación

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para distinguir subpoblaciones celulares para el análisis de la captación de glucosa, expresión de PD-1 y bloqueo de PD-L1.

Anticuerpo	Marcador fluorescente	Clona	Casa comercial
Anti-CD3	PE efluor 610	UCHT1	eBioscience
Anti-CD4	Alexa Fluor 700	OKT4	BioLegend
Anti-CD8	APC Cy7	SK1	BioLegend
Anti-CD45RA	PE Cy7	HI100	BioLegend
Anti-CD27	PE o Brilliant Violet 510	M-T271	BioLegend
Anti-PD1	Alexa Fluor 647	NAT105	BioLegend
Anti-PD-L1	PE	29E.2A3	BioLegend

PE: Ficoeritrina; APC: Alociocianina; Cy7: Cianina 7.

Ensayo de captación de glucosa y expresión de PD-1

Posterior al tratamiento con 2NBDG, se lavó con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) suplementado con albúmina sérica bovina 1% (BSA) y azida de sodio 0.1% (NaN₃), se resuspendió en una mezcla de anticuerpos (Tabla 1) durante 20 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. De esta forma se identificaron las moléculas CD3, CD4, CD8, CD27-PE, CD45RA y la expresión de PD-1. Pasado el tiempo de incubación, las células se lavaron y resuspendieron en 100µL de PBS/BSA 1%/NaN₃ 0.1%, finalmente se realizó la tinción con 7AAD (7-amino-actinomicina D) (BioLegend, San Diego, CA, USA) para analizar la viabilidad celular. 7AAD es un intercalante del DNA, por lo que se une a él sólo si la membrana celular está dañada.

Análisis por citometría de flujo

Las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo FACS Canto II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) en el programa FACSDiva. Se realizó la gráfica FSC-H vs. FSC-A para discriminar agregados celulares, a partir de esta región se identificaron a las células viables (7AAD-) mediante la gráfica de FSC-A vs. 7AAD. De las células viables se realizó la gráfica FSC-A vs SSC-A para identificar a los linfocitos, para posteriormente reconocer a los linfocitos T CD3+ mediante la gráfica de SSC-A vs anti-CD3. Se identificaron las dos subpoblaciones de linfocitos T: Citotóxicas (CD3+/CD8+) y cooperadoras (CD3+/CD4+) con la gráfica CD8 vs. CD4. Para todos los tratamientos se adquirieron 10,000 eventos de los linfocitos T CD8+. De cada subpoblación se obtuvieron las poblaciones con fenotipo *naïve* (CD45RA+/CD27+), de memoria (CD45RA-/CD27+) y efectora (CD45RA+/CD27-) donde se obtuvo el porcentaje de los linfocitos T 2NBDG+/PD-1+ o 2NBDG-/PD-1+ para cada tratamiento (Figura 1).

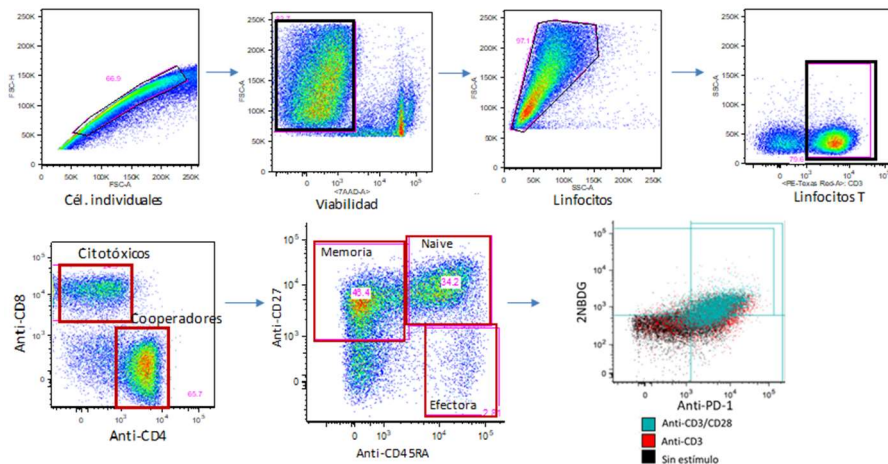


Figura 1. Esquema de análisis citométrico para análisis de captación de glucosa. Obteniendo los linfocitos T de fenotipo *naïve* (CD45RA+/CD27+) de memoria (CD45RA-/CD27+) o efectora (CD45RA+/CD27-).

Ensayo de captación de glucosa y bloqueo de PD-L1

Posterior a la incubación con el compuesto 2NBDG, las células se lavaron con PBS/BSA 1%/NaN₃ 0.1%, y se resuspendieron en una mezcla de anticuerpos (Tabla 1) durante 20 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. Se identificaron las moléculas CD3, CD4, CD8, CD27, CD45RA, PD-1 y PD-L1. Pasado el tiempo de incubación, las células se lavaron y resuspendieron en 100µL de PBS/BSA 1%/NaN₃ 0.1% con 4',6-Diamidino-2-Fenilindole, Dilactato (DAPI, BioLegend, San Diego, CA, USA) 1µM para analizar la viabilidad celular. DAPI

se une al DNA de doble cadena, por lo que tiñe a los ácidos nucleicos sólo si la membrana celular se encuentra comprometida.

Análisis por citometría de flujo

Las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo FACS Aria II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) en el programa FACSDiva. Se realizó la gráfica FSC-H vs. FSC-A para discriminar agregados celulares, a partir de esta región se identificaron a las células viables (DAPI-negativo) mediante la gráfica de FSC-H vs. DAPI. De las células viables se realizó la gráfica FSC-A vs SSC-A para identificar a los linfocitos, para posteriormente reconocer a los linfocitos T CD3+ mediante la gráfica de SSC-A vs anti-CD3. Se identificaron las dos subpoblaciones de linfocitos T: Citotóxicos (CD3+/CD8+) y cooperadores (CD3+/CD4+) con la gráfica CD8 vs. CD4. Para todos los tratamientos se adquirieron 10,000 eventos de los linfocitos T CD8+. De cada subpoblación se obtuvieron las poblaciones con fenotipo *naïve* (CD45RA+/CD27+) y de memoria (CD45RA-CD27+) donde se obtuvo el porcentaje de los linfocitos T 2NBDG+ o PD-L1+ para cada tratamiento (Figura 2).

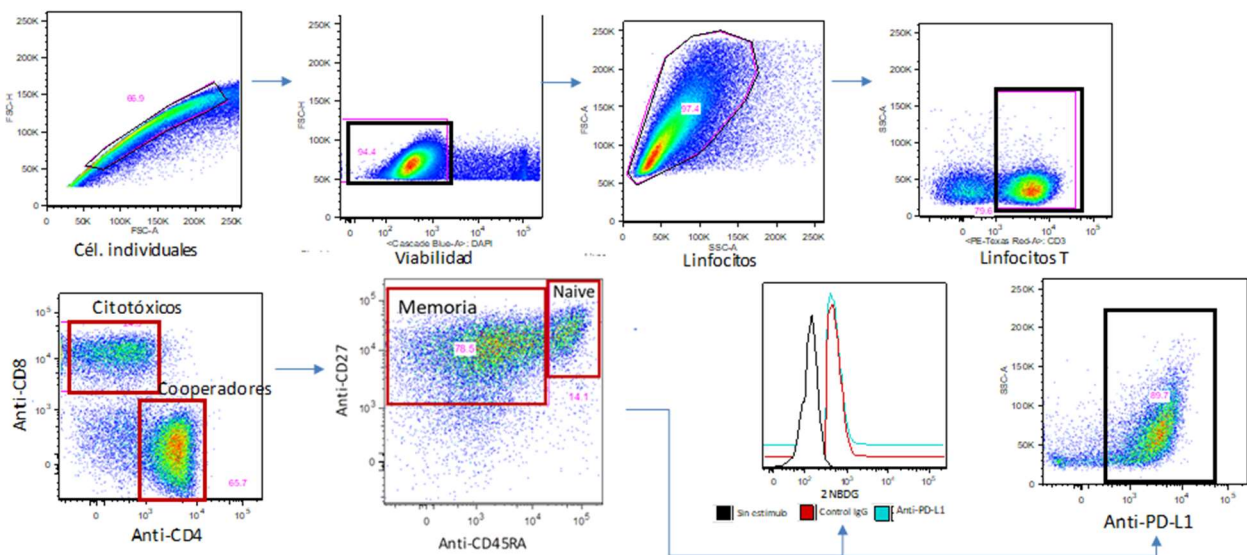


Figura 2. Esquema de análisis citométrico para análisis de captación de glucosa. Obteniendo los linfocitos T de fenotipo *naïve* (CD45RA+/CD27+) o de memoria (CD45RA-/CD27+).

Todos los análisis fueron realizados en el programa FlowJo versión 9.9.6, en donde se realizaron las gráficas para comparar el porcentaje de células 2NBDG+ bajo las condiciones de normoxia e hipoxia para cada ensayo. Posteriormente los datos se organizaron con el

programa Pestle y por medio del software SPICE (Simplified Presentation of Incredibly Complex Evaluations) versión 6.0, descargado de <http://exon.niaid.nih.gov>, se organizaron y se resumieron los datos obtenidos del análisis de la captación de glucosa, expresión de PD-1 y bloqueo de PD-L1 en las distintas condiciones de trabajo. La intensidad media de fluorescencia relativa (rMFI) de PD-L1 se obtuvo del producto de la división entre la intensidad media de fluorescencia de PD-L1 obtenida de los tratamientos con los estímulos con anticuerpo anti-CD3 o con anticuerpos anti-CD3/CD28 y la intensidad media de fluorescencia obtenida del tratamiento sin estímulo (Fórmula 1).

$$\text{rMFI de PD-L1} = \frac{\text{MFI de PD-L1 de los tratamientos con estímulo}}{\text{MFI de PD-L1 del tratamiento sin estímulo}}$$

Fórmula 1. Método para la obtención de la rMFI de PD-L1

Análisis estadístico

Se usó como medida de tendencia central la media, de la cual se muestra el error o la desviación estándar debido a que los datos mostraron una distribución normal. Se realizaron pruebas de t-student para conocer si existían diferencias significativas entre la condición de normoxia e hipoxia y diferencias entre los estímulos con anti-CD3 y anti-CD3/-CD28. Valores menores a 0.05 fueron considerados como significativos.

IX. Resultados

VIII.I La proporción de linfocitos T CD8+ fue menor en muestras de derrame pleural

Se realizó la comparación del porcentaje de linfocitos T CD8+ y CD4+ presentes en los derrames pleurales (DP's) malignos (DPM's) y no malignos (DPnM's), así como en sangre periférica (SP) de sujetos sanos (SP sanos) y de pacientes con cáncer pulmonar (SP CP). Tanto en los DP's como en sangre periférica hubo un mayor porcentaje de linfocitos T CD4+ que CD8+ como se ha observado previamente^{72,73}. El porcentaje de linfocitos T CD8+ fue menor en los DPM's que en los DPnM's. Así mismo, el porcentaje de linfocitos T CD8+ fue significativamente menor en los DPM's en comparación con el porcentaje presente en sangre periférica del mismo grupo de pacientes con cáncer pulmonar (SP CP). Por otro lado, el porcentaje de linfocitos T CD4+ fue significativamente mayor en los DPM's comparados con los observados en sangre periférica (Figura 3 A,B).

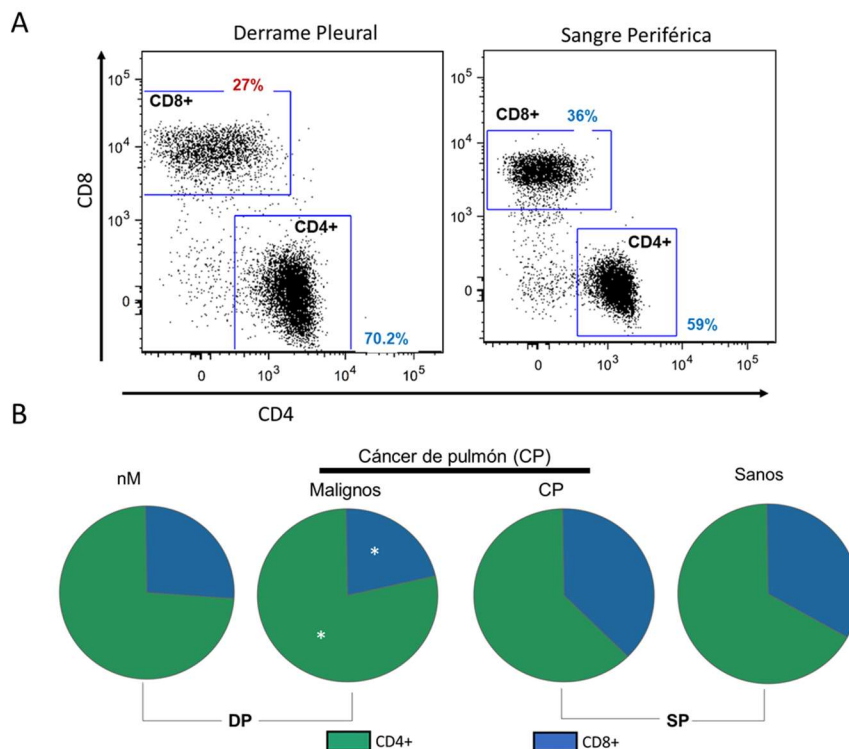


Figura 3. Porcentaje de linfocitos T CD8+ y CD4+. **A.** Figura representativa de una muestra de derrame pleural maligno y de sangre periférica de un paciente con cáncer pulmonar. **B.** En verde se representa la media del porcentaje de linfocitos T CD4+, mientras que en azul el porcentaje de linfocitos T CD8+. DP: Derrame pleural, SP: Sangre periférica, CP: Cáncer pulmonar, nM: No maligno. * $p < 0.05$ respecto a la sangre periférica de los pacientes con cáncer. SP sanos $n = 11$; SP CP $n = 9$; DP Maligno $n = 14$; DPnM $n = 9$.

VIII.II La proporción de linfocitos Tmem fue la más representativa en muestras de derrame pleural maligno y no maligno

Una vez que se identificaron las subpoblaciones de linfocitos T, se analizaron los linfocitos T CD4+ y CD8+ de memoria (CD45RA-/CD27+), *naïve* (CD45RA+/CD27+) o efectora (CD45RA+/CD27-) de los DP's y de sangre periférica de los grupos de estudio. Las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ provenientes de los DP's malignos y no malignos carecieron de células efectoras y se observó un mayor porcentaje de linfocitos T con fenotipo de memoria (Tmem) en comparación con el fenotipo *naïve* (Figura 4).

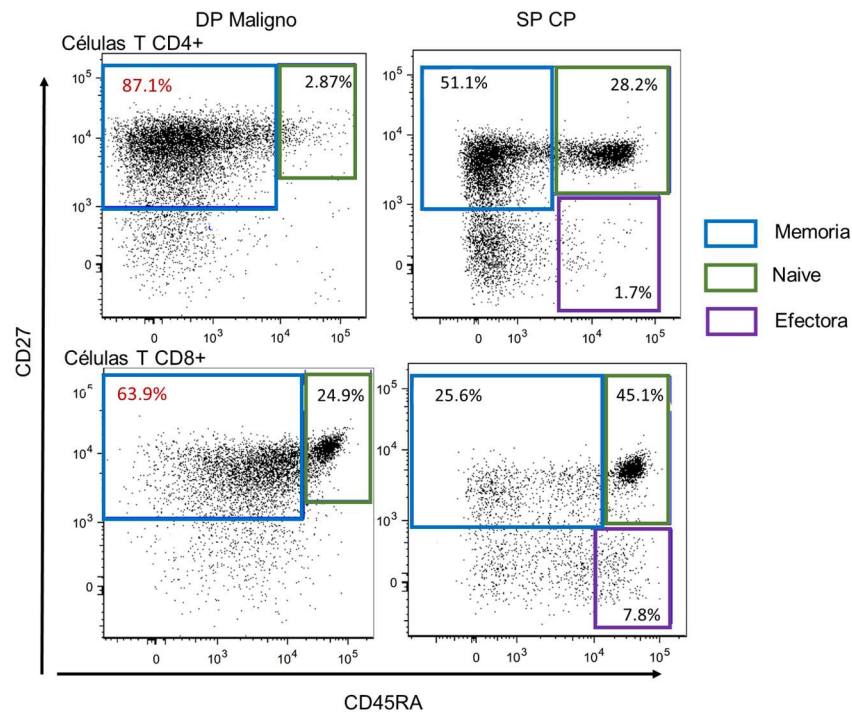


Figura 4. Imagen representativa del alto porcentaje de linfocitos T de memoria en derrame pleural maligno en comparación con los linfocitos T presentes en sangre periférica proveniente de paciente con cáncer pulmonar. Linfocitos T cultivados bajo la condición de normoxia sin estimular.

El porcentaje de linfocitos Tmem provenientes de los DPM's fue significativamente mayor en comparación con los linfocitos Tmem presentes en sangre periférica de los pacientes con cáncer. En las muestras de SP de pacientes con cáncer pulmonar así como de sujetos sanos, la subpoblación de linfocitos T CD4+ mostró una baja proporción de linfocitos T efectoras y un porcentaje similar entre los fenotipos de memoria y *naïve*. En la subpoblación de linfocitos T

CD8+ de SP de pacientes y sujetos sanos se observó un porcentaje similar entre los linfocitos T con fenotipo de memoria, *naïve* y efector. (Figura 5).

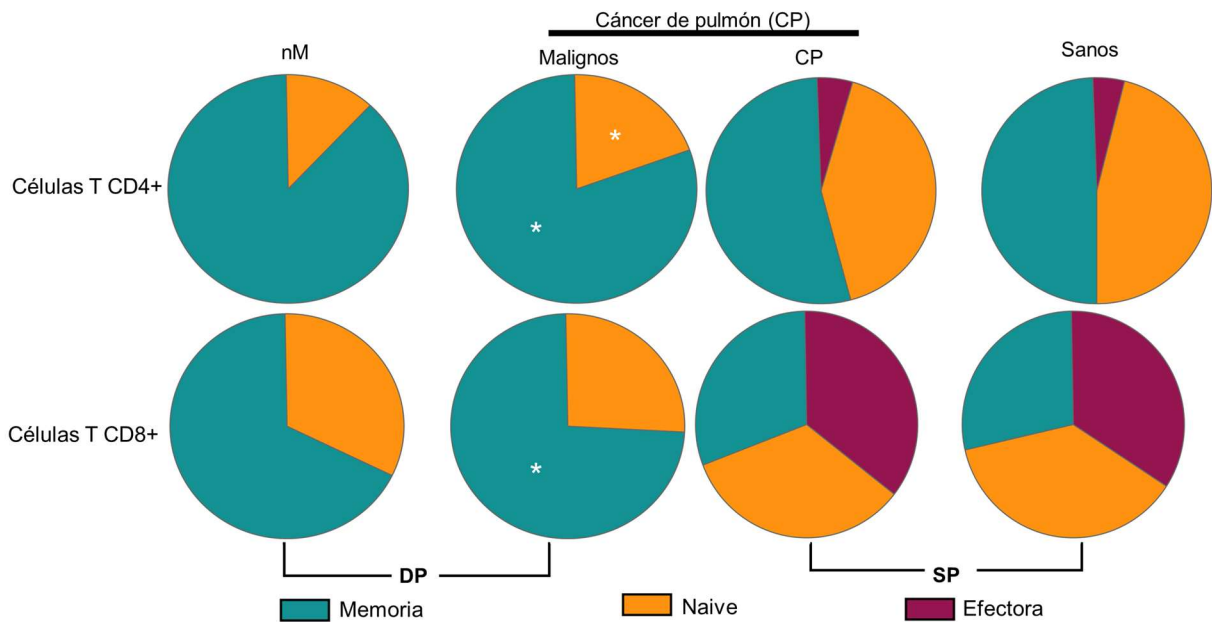


Figura 5. Porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+ con fenotipo de memoria, *naïve* y efector. SP: Sangre periférica, DP: Derrame pleural. * $p < 0.05$ respecto a la sangre periférica de los pacientes con cáncer. SP sanos $n=11$; SP CP $n=9$; DP Maligno $n=14$; DPnM $n=9$. Linfocitos T cultivadas bajo condición de normoxia sin estimular.

Considerando los bajos porcentajes de linfocitos T efectoras provenientes de los DPM's y los DPnM's, sólo se pudo llevar a cabo el análisis de captación de glucosa en los linfocitos T de memoria y *naïve* en los grupos de estudio.

VIII.III El porcentaje de linfocitos Tmem que captó glucosa disminuyó al realizar la coestimulación en condición de hipoxia en los derrames pleurales malignos.

Se analizó la capacidad de captar glucosa empleando un análogo de la glucosa (2NBDG). Este análisis se realizó en las subpoblaciones de linfocitos Tmem (Tmem) y T *naïve* al estimular con anticuerpos anti-CD3 o anticuerpos anti-CD3/CD28 en condiciones de normoxia e hipoxia. El porcentaje de linfocitos T *naïve* provenientes de los derrames pleurales o de sangre periférica que captó glucosa aumentó al estimular con los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD3/CD28. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la captación de glucosa entre los diferentes grupos de estudio o entre las condiciones de normoxia e hipoxia (datos no mostrados).

Se observó que el porcentaje de linfocitos Tmem que captó glucosa aumentó significativamente después de la estimulación en las muestras de derrames pleurales así como en las muestras de sangre periférica.

El porcentaje de linfocitos Tmem que captaron 2NBDG (tanto CD4+ como CD8+) tendió a disminuir al estimular con anticuerpos anti-CD3/CD28 en comparación con el estímulo con el anticuerpo anti-CD3 en las muestras de DPM's. La hipoxia fue un factor importante en la captación de glucosa en los linfocitos Tmem provenientes de los DPM's. En la condición de hipoxia, el porcentaje de linfocitos Tmem CD4+ provenientes de los DPM's que captaron glucosa fue significativamente menor que en condición de normoxia al estimular con anticuerpos anti-CD3/CD28 (Figura 6).

Por el contrario, en las muestras provenientes de los DPnM's, el porcentaje de linfocitos Tmem que captó glucosa tendió a aumentar al estimular con anticuerpos anti-CD3/CD28 en comparación con el estímulo con el anticuerpo anti-CD3. De igual manera, el porcentaje de linfocitos Tmem provenientes de SP (Sanos y CP) que incorporó 2NBDG fue significativamente mayor al estimular con anticuerpos anti-CD3/CD28 comparado con el anticuerpo anti-CD3. El aumento del porcentaje de linfocitos Tmem 2NBDG+ provenientes de los DPnM's y de SP al estimular con anticuerpos anti-CD3/CD28 fue observado en las condiciones de normoxia e hipoxia (Figura 6).

Estos resultados sugieren que los linfocitos Tmem provenientes de pacientes con cáncer de pulmón disminuyen la captación de glucosa en un ambiente hipóxico debido a alteraciones en la vía controlada por CD28.

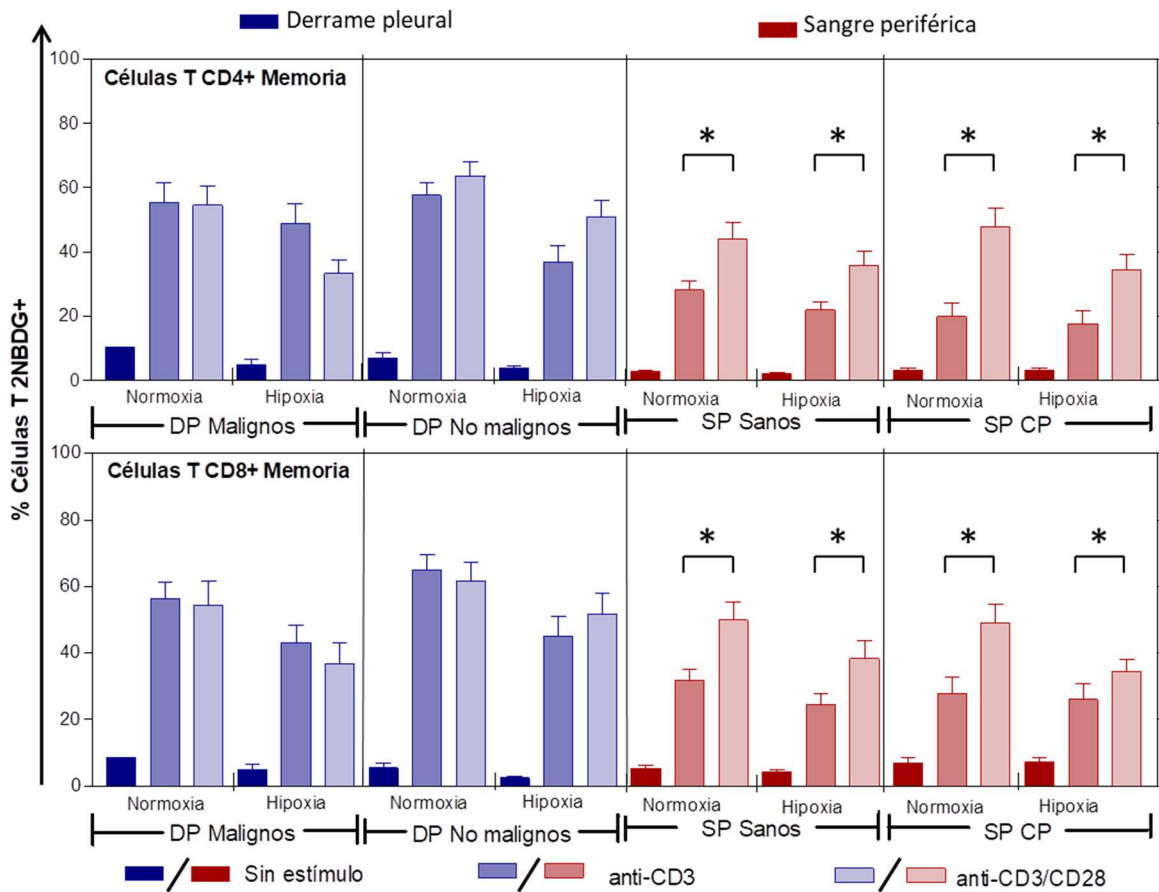


Figura 6. Porcentaje de linfocitos Tmem de los DP's y SP que captaron glucosa al estimular con anti-CD3 o anti-CD3/CD28 en normoxia e hipoxia. * $p < 0.05$ respecto al tratamiento con anti-CD3. Se muestra el error estándar. SP sanos $n=11$; SP CP $n=9$; DP Malignos $n=14$; DP No malignos $n=9$.

VIII.IV El porcentaje de células 2NBDG-/PD-1+ aumentó al coestimular en condición de hipoxia en los linfocitos Tmem provenientes de los derrames pleurales malignos.

Para identificar si la baja captación de glucosa de los linfocitos T provenientes de los DPM's se relacionaba con la interacción de la molécula de co-inhibición PD-1, se identificó la expresión de este receptor en los linfocitos T. Para lo cual se analizaron los linfocitos Tmem provenientes de los DP's que no incorporaron al compuesto 2NBDG y expresaron al receptor PD-1 (2NBDG-/PD-1+).

En condición de normoxia no hubo cambios significativos en el porcentaje de linfocitos Tmem que captaron glucosa y expresaron PD-1 entre los estímulos con anticuerpo anti-CD3 o con anticuerpos anti-CD3/CD28 en ambos grupos de DP's (Datos no mostrados).

En condición de hipoxia, el porcentaje de linfocitos Tmem provenientes de los DPM's con fenotipo 2NBDG-/PD-1+ tendió a aumentar al estimular con anticuerpos anti-CD3/CD28 en comparación con el estímulo con el anticuerpo anti-CD3. En la población de linfocitos T CD4+ este aumento fue significativo (Figura 7 y 8).

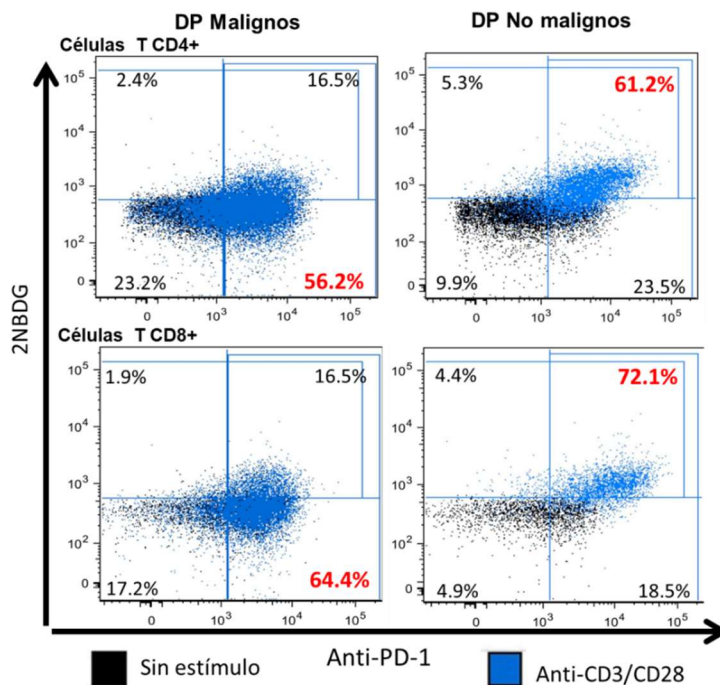


Figura 7. Imagen representativa del aumento de linfocitos Tmem 2NBDG-/PD-1+ provenientes de derrame pleural maligno. Se puede observar un alto porcentaje de linfocitos Tmem 2NBDG+/PD-1+ (dobles positivas) provenientes de derrame pleural no maligno. Los aumentos se observan en rojo. Linfocitos Tmem sin estimular o estimuladas con anti-CD3/CD28 bajo condición de hipoxia.

Por el contrario, el porcentaje de linfocitos Tmem con fenotipo 2NBDG-/PD-1+ proveniente de los DPnM's tendió a disminuir al estimular con anti-CD3/CD28 en comparación con el estímulo con anti-CD3.

En la condición de hipoxia también se observaron diferencias en el porcentaje de linfocitos Tmem derivados de los DP's que captaron glucosa y a su vez expresaron al receptor PD-1 (2NBDG+/PD-1+). En las muestras de DPM's el porcentaje de linfocitos Tmem con fenotipo 2NBDG+/PD-1+ tendió a disminuir al estimular con los anticuerpos anti-CD3/CD28 en comparación con el estímulo con el anticuerpo anti-CD3. Por el contrario, en los DPnM's el porcentaje de linfocitos Tmem con fenotipo 2NBDG+/PD-1+ aumentó al estimular con los anticuerpos anti-CD3/CD28 en comparación con el estímulo con el anticuerpo anti-CD3.

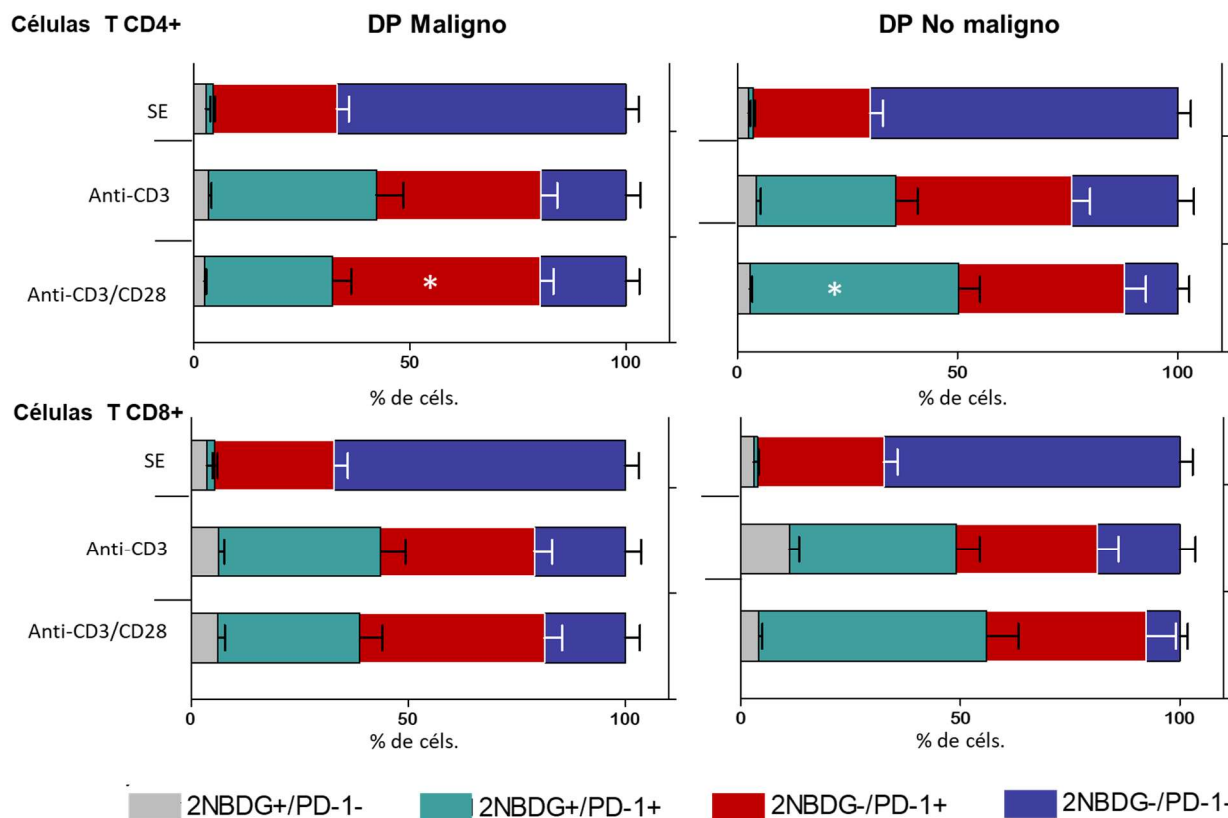


Figura 8. Media del porcentaje de linfocitos Tmem con fenotipos 2NBDG+ o PD-1+ en condición de hipoxia en los derrames pleurales. Linfocitos Tmem sin estímulo, activadas con el anticuerpo anti-CD3 o estimuladas con los anticuerpos anti-CD3/CD28. * $p < 0.05$ respecto al tratamiento con anti-CD3. DP Malignos $n=14$; DP No malignos $n=9$. Se muestra el error estándar.

El mismo análisis se realizó en los linfocitos Tmem de sangre periférica provenientes de pacientes con cáncer de pulmón y de sujetos sanos. El porcentaje de linfocitos Tmem con fenotipo 2NBDG+/PD-1+ aumentó significativamente al estimular con los anticuerpos anti-CD3/CD28 en comparación con el estímulo con el anticuerpo anti-CD3 en sangre periférica de sujetos sanos y pacientes con cáncer. Estos resultados fueron independientes de la condición de normoxia e hipoxia (Figura 9). Con estos resultados se especuló que PD-1 puede estar asociado a una baja captación de glucosa en los linfocitos Tmem de los DPM's pero no en el grupo no maligno ni en sangre periférica bajo condiciones de hipoxia.

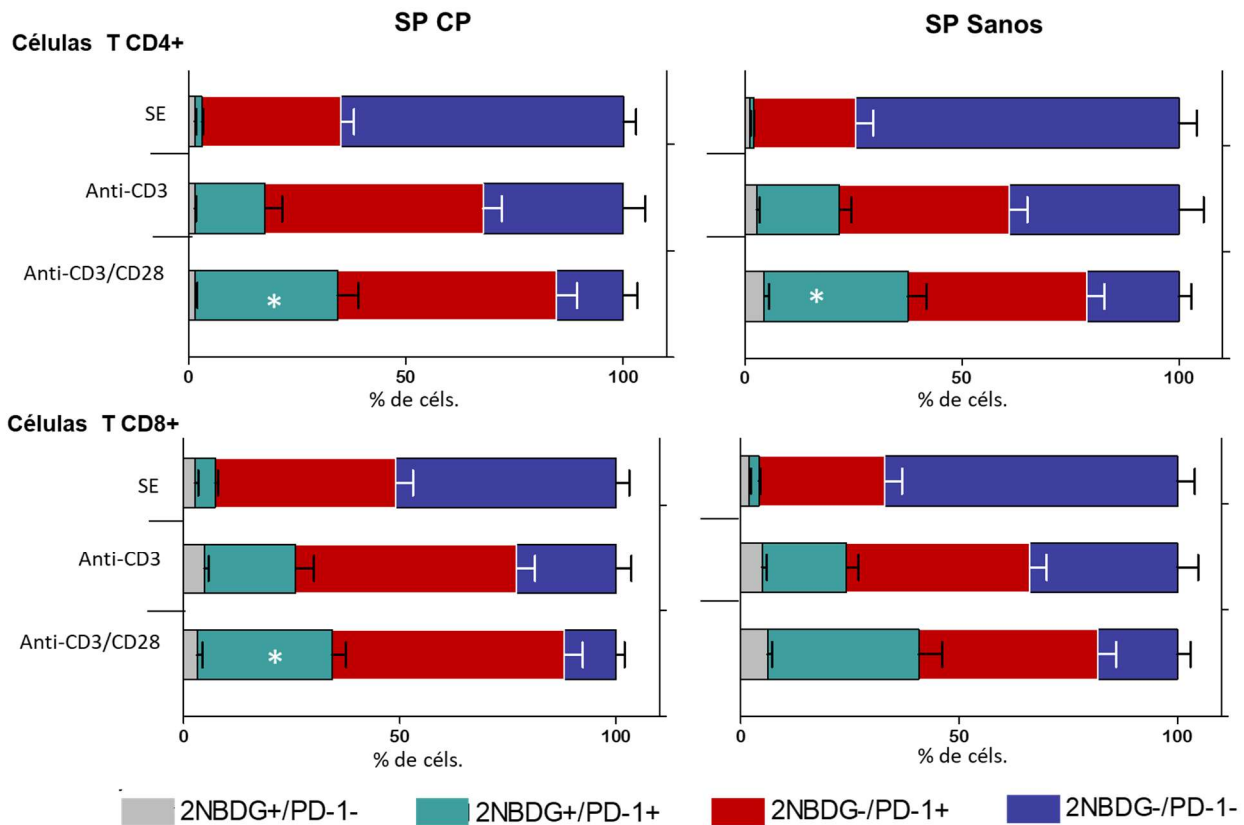


Figura 9. Media del porcentaje de linfocitos Tmem que incorporan 2NBDG y/o expresan PD-1 en condición de hipoxia en sangre periférica. Linfocitos Tmem sin estímulo, activadas con el anticuerpo anti-CD3 o estimuladas con los anticuerpos anti-CD3/CD28.* $p < 0.05$ respecto al tratamiento con anti-CD3. SP sanos $n=11$; SP CP $n=9$. Se muestra el error estándar

Por otra parte, se observó que el porcentaje de linfocitos T *naïve* 2NBDG+/PD-1+ provenientes de los DPnM's y de sangre periférica aumentó significativamente con el tratamiento con los anticuerpos anti-CD3/CD28 que con el tratamiento sólo con anti-CD3 (Anexo 1).

VIII.V Los linfocitos Tmem no aumentaron la captación de glucosa al bloquear a la molécula PD-L1 en los derrames pleurales malignos.

Para comprobar si la interacción de la molécula PD-1 con su ligando PD-L1 interfiere en la captación de glucosa, se realizó el bloqueo de la interacción PD-1/PD-L1 en los linfocitos Tmem de los DPM's. El bloqueo se realizó en los linfocitos Tmem estimulados con anticuerpos anti-CD3/CD28.

Se verificó que el bloqueo de la molécula PD-L1 se hubiera realizado correctamente. Se analizó la intensidad media de fluorescencia relativa (rMFI) de PD-L1 en los linfocitos Tmem de los pacientes con cáncer pulmonar posterior al tratamiento con el anticuerpo anti-PD-L1. Los linfocitos Tmem tratados con el anticuerpo antagonista anti-PD-L1 disminuyeron significativamente la rMFI de PD-L1 en comparación con los linfocitos Tmem tratados con el control de isotipo IgG. Estos resultados fueron independientes de la condición de hipoxia o normoxia (Figura 10). De esta forma se comprobó la unión del anticuerpo antagonista anti-PD-L1 a la molécula PD-L1, ya que su unión puede provocar la internalización del receptor y por ello la disminución del marcador.

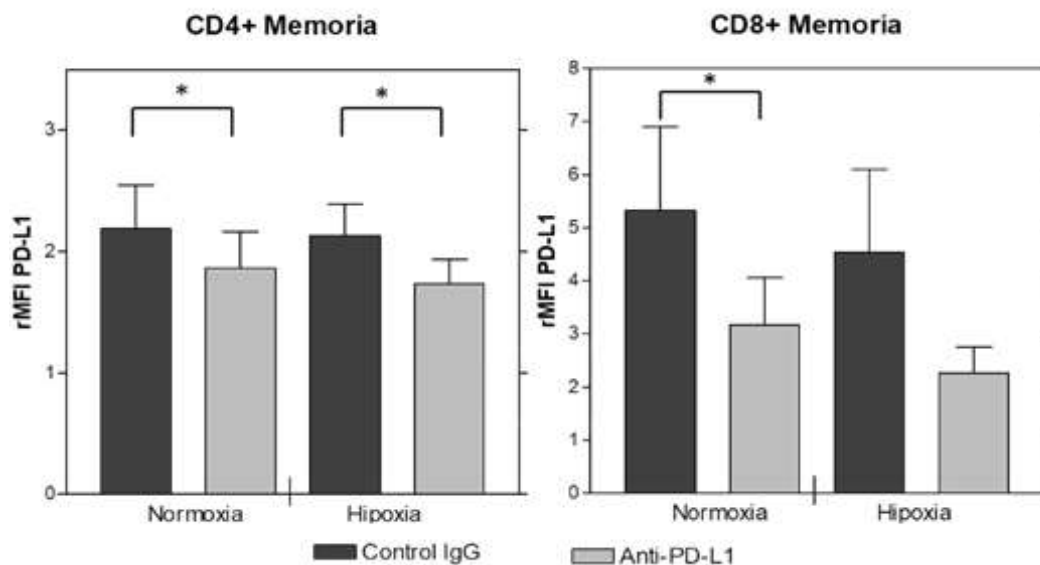


Figura 10. Intensidad media de fluorescencia relativa de PD-L1 de linfocitos Tmem provenientes de pacientes con cáncer pulmonar en condición de hipoxia o normoxia. Linfocitos T tratadas con el control de isotipo IgG o anticuerpo anti-PD-L1. (n=5). .* p<0.05 respecto al tratamiento con anti-PD-L1. Se muestra el error estándar.

Una vez que se comprobó el bloqueo de la molécula PD-L1 se analizó el porcentaje de linfocitos Tmem provenientes de los DPM's que incorporó 2NBDG. El porcentaje de linfocitos Tmem que incorporó 2NBDG no aumentó al bloquear a la molécula PD-L1 con respecto al tratamiento con el control de isotipo IgG. La proporción de linfocitos Tmem de los DPM's que captaron glucosa fue similar en condición de hipoxia y normoxia (Figura 11).

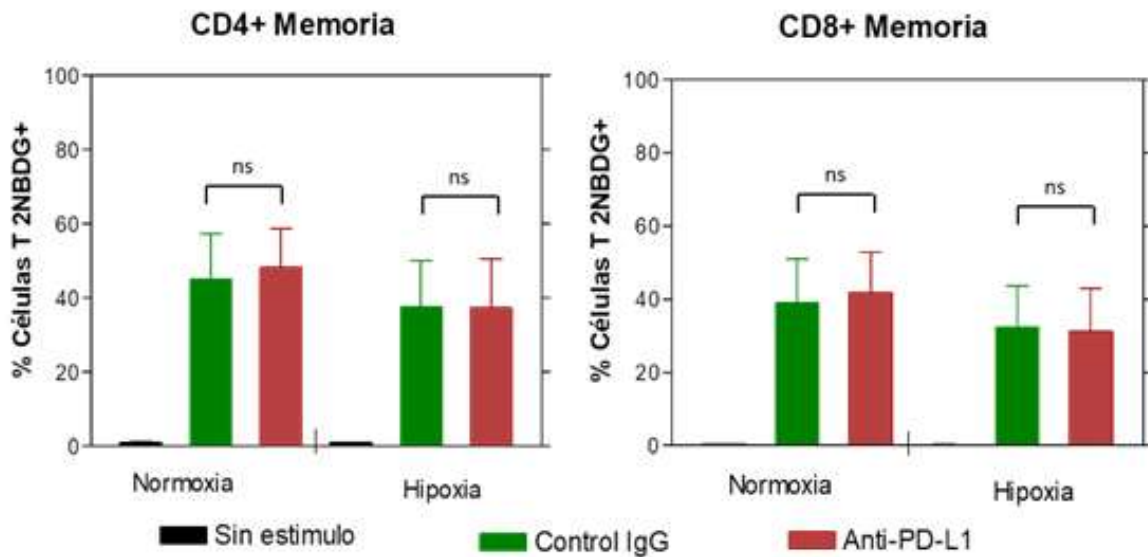


Figura 11. Media del porcentaje de linfocitos Tmem 2NBDG+ provenientes de los derrames pleurales malignos Linfocitos Tmem tratadas con el control de isotipo IgG y anti-PD-L1 en condición de normoxia e hipoxia (n=5). * $p < 0.05$; ns: No significativo respecto al tratamiento con el control de isotipo IgG. Se muestra el error estándar.

X. Discusión

En este trabajo se muestra que la baja captación de glucosa realizada por los linfocitos T infiltrantes de los derrames pleurales, provenientes de pacientes con cáncer de pulmón, se encuentra ligada a la condición de hipoxia y al estímulo que estas células reciban.

El consumo de nutrientes es un factor importante para la diferenciación de los linfocitos T *naïve* hacia un perfil citotóxico⁷⁴. Una deficiente captación de glucosa en los linfocitos T de pacientes con cáncer puede provocar una disfunción en la actividad de los linfocitos T efectoras. Al igual que su diferenciación, la secreción de citocinas por parte de los linfocitos T también puede verse afectada por la baja captación de glucosa. Los linfocitos Tmem por otra parte, realizan principalmente OXPHOS para satisfacer sus necesidades energéticas. Sin embargo, la captación de glucosa en los linfocitos T CD4+ de memoria es necesaria para mantener su supervivencia⁷⁵.

En los derrames pleurales no hubo presencia de linfocitos T efectoras, sin embargo, se observó un alto porcentaje de linfocitos Tmem así como una baja proporción de linfocitos T *naïve* en comparación con sangre periférica. Estas proporciones de linfocitos T son similares a las reportadas en diversos trabajos, en donde el porcentaje de linfocitos Tmem es elevado^{71,73,76}. Esto puede ser ocasionado por la exposición previa de los linfocitos T a antígenos y a la formación de linfocitos Tmem debido a una respuesta inmune en los derrames pleurales. Los linfocitos T muestran una tendencia a diferenciarse a linfocitos Tmem, cuando la captación de glucosa es baja⁷⁷. Además, los linfocitos T CD8+ pueden diferenciarse a linfocitos Tmem cuando la función de mTOR es inhibida, o bien, cuando las moléculas involucradas en su activación son suprimidas⁷⁸. La ausencia de linfocitos T efectoras en los derrames pleurales podría deberse a una activación deficiente por parte de los linfocitos Tmem. La exposición crónica a un mismo antígeno lleva a la disfunción y al agotamiento de los linfocitos T^{79,80}, por lo que el programa de diferenciación a linfocitos T efectoras podría encontrarse afectado.

Los linfocitos T *naïve* de los derrames pleurales y de sangre periférica aumentaron la captación de glucosa posterior a la estimulación. El aumento en la captación de glucosa por parte de linfocitos T *naïve* es necesario para favorecer la diferenciación a linfocitos T efectoras.

Contrariamente a lo reportado en diversos trabajos empleando modelos animales ^{81,82}, la estimulación con el anticuerpo anti-CD3 resultó ser efectiva para aumentar la captación de glucosa en los linfocitos Tmem provenientes de derrames pleurales. Estos resultados sugieren que las señales dadas a través del TCR fueron suficientes para aumentar la captación de glucosa. Una vez que se activa la vía de señalización a través del TCR, Lck fosforila los motivos citoplasmáticos de las subunidades de CD3 y a ZAP70 la cual, a su vez activa a LAT formando un complejo en el que se une la enzima PLC γ 1. PLC γ 1 es necesaria para iniciar la activación de la vía RAS/MEK/ERK. ERK se ha asociado con la activación de enzimas glucolíticas como la hexocinasa y la captación de glucosa en los linfocitos T provenientes de ratón⁸³. La estimulación previa y constante de los linfocitos T presentes en derrames pleurales podría llevar a la diferenciación de linfocitos Tmem que pueden facilitar la captación de glucosa posterior al estímulo con anti-CD3. Qué factores se pueden encontrar involucrados en este fenómeno aún son desconocidos, aunque se ha visto que linfocitos Tmem humanas y de ratón aumentan la expresión de ZAP70⁸⁴.

Por otro lado, la coestimulación con la molécula anti-CD28 no favoreció la captación de glucosa en los linfocitos T de derrames pleurales provenientes de pacientes con cáncer pulmonar bajo condición de hipoxia. Estos defectos en la captación de glucosa pueden surgir a partir de alteraciones en la vía de señalización que se realizan por la activación de la molécula CD28.

Además de aumentar las señales de activación dadas a través del TCR, la molécula CD28 puede controlar cambios bioquímicos intracelulares, como la fosforilación y el arreglo del citoesqueleto durante la sinapsis inmunológica⁸⁵. Las señales recibidas a través de la molécula CD28 son necesarias para sostener la fosforilación de Akt⁶¹, y por ende mantener el metabolismo glucolítico mediante la translocación de Glut1 a membrana plasmática²⁰.

Defectos en la vía de señalización iniciada tras la unión de la molécula CD28 pueden causar la baja secreción de citocinas y un defecto en la proliferación celular^{86,87}. Al igual que en linfocitos T de pacientes con leucemia, la captación de glucosa no aumentó posterior a la estimulación en los linfocitos T de pacientes con cáncer pulmonar. Estos defectos pueden estar relacionados con alteraciones en la vía de señalización a través de Akt/mTOR⁸⁸. Lo anterior sugiere que los linfocitos T provenientes de derrames pleurales malignos también podrían encontrarse alterados en la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR. Además, en un trabajo previo de nuestro equipo de trabajo, se reportó que los linfocitos Tmem provenientes

de derrames pleurales malignos no aumentan la expresión de Glut1 posterior a la estimulación con los anticuerpos anti-CD3/CD28 bajo condición de hipoxia⁶⁵. Los resultados del presente estudio demuestran que al igual que la expresión de Glut1, la captación de glucosa no se ve incrementada aún en condiciones de estimulación por las señales 1 y 2.

La baja captación de glucosa fue propia de los linfocitos Tmem de derrames pleurales, pero no de sangre periférica en pacientes con cáncer pulmonar. Esto pudo observarse posterior al estímulo con los anticuerpos anti-CD3/CD28 bajo condición de hipoxia. Estas diferencias demuestran que los linfocitos T cercanos al entorno del tumor, presentes en los derrames pleurales malignos, mantienen afectada su captación de glucosa en comparación con aquellos linfocitos T que se encuentran en circulación. Por lo tanto, el entorno tumoral juega un papel importante en la función de los linfocitos T.

Las células tumorales y/o las células inmunes supresoras modifican el entorno tumoral al secretar moléculas que pueden dañar la actividad antitumoral por parte de los linfocitos T. Los TAM's provenientes de derrames pleurales de pacientes con cáncer pulmonar afectan la función de los linfocitos T al secretar TGF- β ⁸⁹.

Así mismo, los linfocitos T provenientes de derrames pleurales malignos muestran baja producción de granzima B y perforina, necesarias para ejercer la actividad citotóxica por parte de los linfocitos T CD8⁺⁶⁹. La baja producción de enzimas citolíticas, junto con una alta expresión de moléculas de supresión como PD-1⁸⁹ y una baja captación de glucosa son algunas de las anomalías presentes en los linfocitos T provenientes de derrames pleurales malignos. Esto podría significar que en el cáncer pulmonar, la baja captación de glucosa, y la presencia de moléculas de inhibición pueden afectar la diferenciación de los linfocitos Tmem a un perfil efector en los linfocitos T cercanos al microambiente del tumor.

Los linfocitos T infiltrantes de tumores pueden encontrarse alterados por la baja disponibilidad de oxígeno presente en el microambiente tumoral⁹⁰. Los factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIF) son importantes en la regulación de enzimas glucolíticas. Se conoce que HIF1 α regula positivamente proteínas como Glut1 importantes para la captación de glucosa⁹¹. HIF1 α es regulada negativamente por proteínas sensibles al oxígeno como la proteína von Hippel-Lindau (pVHL), la cual se activa en condiciones de normoxia. Sin embargo, cuando los linfocitos T reciben señales de activación por la vía PI3K/Akt/mTOR, HIF1 α se estabiliza y se

transloca en el núcleo⁹². En hipoxia, HIF1 α se acumula pues no es degradada en el proteasoma, promoviendo la glucólisis cuando hay bajos niveles de oxígeno⁹³.

La delección HIF1 α en linfocitos T CD8+ de ratón disminuyen la captación de glucosa y la expresión de enzimas glucolíticas bajo condición de hipoxia⁹⁴. De esta manera, se puede sugerir que fallas en la regulación de HIF1 α bajo condiciones de hipoxia puede causar que moléculas asociadas al metabolismo glucolítico no se promuevan correctamente, afectando así la captación de glucosa en los linfocitos T provenientes de derrames pleurales.

Además, la expresión de la molécula de inhibición PD-1 resultó estar asociada con una baja captación de glucosa en los linfocitos T provenientes de derrames pleurales malignos. Esto se observó bajo condición de hipoxia, posterior a la estimulación con los anticuerpos anti-CD3/anti-CD28. En condición de hipoxia se puede promover la expresión de PD-1. Se conoce que la hipoxia activa canales de Ca⁺ que al incrementar las concentraciones de Ca⁺ intracelular, activan a la fosfatasa calcineurina que desfosforila el factor nuclear de los linfocitos T activadas (NFAT)⁹⁵. NFAT promueve la expresión de PD-1 después de la activación de los linfocitos T⁹⁶.

Por otra parte, se observó un aumento en el porcentaje de linfocitos Tmem proveniente tanto del derrame pleural no maligno como de sangre periférica que expresó a la molécula de inhibición PD-1 posterior a la estimulación. Esto fue independiente de la condición de normoxia o hipoxia y sólo se relacionó con la activación, ya que la captación de glucosa también se vio aumentada. Una vez que los linfocitos T reciben señales de activación, la molécula de inhibición PD-1 aumenta su expresión. Esto se debe a que la molécula PD-1 actúa como un mediador de la tolerancia periférica en los linfocitos T, evitando así una respuesta efectora contra antígenos propios, o bien, ayuda a regular la respuesta inmune mediante su expresión en linfocitos T reguladoras⁹⁷.

A pesar de que se observó una correlación en la expresión de la molécula PD-1 y una baja captación de glucosa en los linfocitos Tmem provenientes de los derrames pleurales malignos, la interacción PD-1/PD-L1 no fue un factor involucrado en la disminución de la captación de glucosa. El bloqueo de esta vía no restauró la captación de glucosa como lo han sugerido algunos trabajos^{66,68}. Así mismo, los linfocitos T *naïve* recuperaron tenuemente su capacidad de captar glucosa; Sin embargo, no se encontró alguna diferencia significativa.

Estos resultados mostraron que la baja captación de glucosa puede deberse a las alteraciones involucradas en las vías de señalización de los propios linfocitos Tmem provenientes de derrames pleurales, más que con la expresión de moléculas inhibitorias como PD-1.

Se conoce que la expresión de PD-1 en linfocitos T provenientes de derrames pleurales malignos se encuentra asociado con defectos en la actividad citotóxica⁶⁹; Sin embargo, no tuvo efectos en la captación de glucosa. El bloqueo de la interacción PD-1/PD-L1 no siempre resulta ser un tratamiento eficaz. Se ha visto que el bloqueo de múltiples receptores de inhibición en los linfocitos T presentes en melanoma han resultado favorecedores en el reclutamiento de linfocitos T efectoras⁹⁸. De esta forma se reconoce que los linfocitos T infiltrantes de tumores pueden encontrarse alteradas en más de una vía. Además de las señales de inhibición, en la célula ocurren otros procesos, como los metabólicos, que pueden afectar la respuesta de las células inmunes contra las células malignas.

En este trabajo se reconoció que los linfocitos Tmem provenientes de derrames pleurales de pacientes con cáncer pulmonar presentan una baja captación de glucosa al recibir señales de estimulación a través del TCR y de la molécula CD28. Este fenómeno fue observable en bajos niveles de oxígeno. Por ello, es importante estudiar si existe una correcta regulación de los factores de transcripción inducibles por hipoxia, o bien, si hay defectos en la expresión de moléculas involucradas en la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR. De esta forma se podría mejorar nuestro entendimiento sobre los defectos en la captación de glucosa de los linfocitos T presentes en cáncer de pulmón.

XI. Conclusión

Los linfocitos Tmem infiltrantes de los derrames pleurales provenientes de pacientes con cáncer pulmonar presentan baja captación de glucosa al ser estimulados con los anticuerpos agonistas anti-CD3/CD28. Esto podría significar anomalías en la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR. Esta baja captación de glucosa fue observada bajo condición de hipoxia por lo que el factor de transcripción inducible por hipoxia HIF1 α , un regulador importante en la actividad glucolítica de los linfocitos T, podría encontrarse afectado. La deficiente captación de glucosa se asoció con la expresión de la molécula de inhibición PD-1 en los linfocitos Tmem de los derrames pleurales malignos. Sin embargo, el bloqueo del ligando de PD-1 no restauró la captación de la glucosa bajo condición de hipoxia, por lo que la interacción PD-1/PD-L1 no resultó ser un factor causante de esta anomalía en los linfocitos T de pacientes con cáncer pulmonar.

XII. Anexo I

Se muestran los datos del porcentaje de linfocitos Tmem CD4+ y CD8+ que incorporaron 2NBDG y expresaron la molécula de inhibición PD-1.

Tabla 2. Porcentaje de linfocitos T CD4+ con fenotipo 2NBDG+/PD-1+ provenientes de los derrames pleurales (DP) y sangre periférica (SP) con los distintos estímulos en condición de normoxia e hipoxia.

Células T CD4+		2NBDG+/PD1+						
		S/E		Anti-CD3		Anti-CD3/CD28		
		N	H	N	H	N	H	
DP	No Malignos (n=9)	Memoria	1.8±1.8	1.2±1.2	47.8±10.8	31.6±15*	57.9±12.5	47.4±14.6
		Naive	1.7±1.5	1.4±1.1	38±12.7	32.7±15.7	66±12.5	57.7±12.3
	Malignos (n=14)	Memoria	3.3±3.1	1.7±1.7	49.2±23.9	38.9±23	46.9±21.9	29.7±15.4*
		Naive	2.6±2.9	1.6±1.5	46.9±24.8	40.8±24.8	62.2±13.3	51.7±12.1*
SP	CP (n=9)	Memoria	1.3±0.9	1.6±1	17.8±12.3	16.1±11.3	45.1±17.9	32.6±14.3
		Naive	1.6±2.5	1.3±1.3	28.9±16.7	29±17.1	67.6±9.9	53.7±14.9*
		Efectora	12.8±9.6	10.5±7.6	16.5±9.7	18.5±4.4	34.3±13.8	18.6±5.4
	Sanos (n=11)	Memoria	0.9±0.8	0.9±0.6	24.1±11.1	19±10	41.7±13.3	33.1±14.9
		Naive	0.6±0.5	0.7±0.7	28.5±15.2	26.1±13.6	53.5±12	48.8±14.3
		Efectora	5.2±4.6	3.6±3.1	9.8±5.4	8.3±7.3	33.7±9.3	26.4±8.7

*: p<0.05 respecto a la condición de normoxia. Azul: p<0.05 respecto al tratamiento con el anticuerpo anti-CD3.

Tabla 3. Porcentaje de linfocitos T CD8+ con fenotipo 2NBDG+/PD-1+ provenientes de los derrames pleurales (DP) y sangre periférica (SP) con los distintos estímulos en condición de normoxia e hipoxia.

Células T CD8+			2NBDG+/PD1+					
			S/E		Anti-CD3		Anti-CD3/CD28	
			N	H	N	H	N	H
DP	No Malignos (n=9)	Memoria	1.8±1.4	0.9±0.7	52.7±13.2	37.9±15.8*	58.2±15.1	51.8±21.5
		Naive	1.2±0.9	1±0.5	42.1±18.9	35.3±17.6	61.7±13.1	59.5±10.1
	Malignos (n=14)	Memoria	2.9±3.8	1.6±2.5	45.8±20.5	36.1±19.3	42.6±25.9	32±19.5
		Naive	1.4±1.6	1.2±1.3	45.4±25.4	42.4±26.5	53.3±17.1	53.3±13.6
SP	CP (n=9)	Memoria	4±2.8	4.7±1.7	22.9±13.1	21.1±12	44±17.6	31.1±11.4
		Naive	2.6±2.1	3.2±2.4	30.4±17.2	31.3±16.2	67.1±21.9	58.7±19
		Efectora	2±1.1	2.7±1.4	9.5±6.7	19.5±6.6	22.1±10.8	16.5±10.9
	Sanos (n=11)	Memoria	2.1±2	1.9±1.5	23.9±10.2	18.9±10.4	39.5±17.8	33±18.5
		Naive	1.4±1.2	1.1±0.7	26.1±11.3	24.1±10.9	62.7±12.6	60.3±13.7
		Efectora	2.4±3.6	1.5±1.9	10.9±7.5	8.5±6.4	20.7±13.4	15±12.3

*: p<0.05 respecto a la condición de normoxia. Azul:p<0.05 respecto al tratamiento con el anticuerpo anti-CD3.

XIII. Referencias

1. Hassanpour, S. H. & Dehghani, M. Review of cancer from perspective of molecular. *J. Cancer Res. Pract.* **4**, 127–129 (2017).
2. Stratton, M. R., Campbell, P. J. & Futreal, P. A. The cancer genome. *Nature* **458**, 719–724 (2009).
3. Wang, L.-H., Wu, C.-F., Rajasekaran, N. & Shin, Y. K. Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. *Cell. Physiol. Biochem.* **51**, 2647–2693 (2018).
4. No autor, Mexico Source: Globocan 2020. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>.(2021).
5. Dela Cruz, C. S., Tanoue, L. T. & Matthay, R. A. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin. Chest Med.* **32**, 605–44 (2011).
6. Mao, Y., Yang, D., He, J. & Krasna, M. J. Epidemiology of Lung Cancer. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **25**, 439–445 (2016).
7. Feller-Kopman, D. & Light, R. Pleural Disease. *N. Engl. J. Med.* **378**, 740–751 (2018).
8. Yalcin, N. G. & Eizenberg, N. Anatomy and Pathophysiology of the Pleura and Pleural Space. *Thorac. Surg. Clin.* **23**, 1–10 (2013).
9. Porcel, J. M. & Light, R. W. Pleural effusions. *Disease-a-Month* **59**, 29–57 (2013).
10. Porcel, J. M. *et al.* The diagnosis of pleural effusions. *Expert Rev. Respir. Med.* **9**, 801–815 (2015).
11. Psallidas, I., Kalomenidis, I., Porcel, J. M., Robinson, B. W. & Stathopoulos, G. T. Malignant pleural effusion: from bench to bedside. *Eur. Respir. Rev.* **25**, 189–98 (2016).
12. Basak, S. K. *et al.* The Malignant Pleural Effusion as a Model to Investigate Intratumoral Heterogeneity in Lung Cancer. *PLoS One* **4**, 5884 (2009).
13. Parkin, J. & Cohen, B. An overview of the immune system. *Lancet* **357**, 1777–1789 (2001).
14. Sauls, R. S. & Taylor, B. N. T-Cell Lymphocyte. in *Histology* (StatPearls Publishing, 2019).
15. Forrester, J. V, Dick, A. D., McMenamin, P. G., Roberts, F. & Pearlman, E. Immunology. in *The eye* 370-461.e2 (W.B. Saunders, 2016).
16. Hwang, JR., Byeon, Y., Kim, D. *et al.* Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development. *Exp Mol Med* **52**, 750–761 (2020).
17. No autor, T-cell activation | British Society for Immunology. <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/systems-and-processes/t-cell-activation>.(2019).
18. Hünig, T., Beyersdorf, N. & Kerkau, T. CD28 co-stimulation in T-cell homeostasis: a recent perspective. *ImmunoTargets Ther.* **4**, 111 (2015).
19. Avendaño, C. & Menéndez, J. C. Drugs That Inhibit Signalling Pathways for Tumor Cell Growth and Proliferation. in *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs* 251–305 (Elsevier, 2008).
20. Jacobs, S. R. *et al.* Glucose uptake is limiting in T cell activation and requires CD28-mediated Akt-dependent and independent pathways. *J. Immunol.* **180**, 4476–86 (2008).

21. Chen, H., Yang, T., Zhu, L. & Zhao, Y. Cellular metabolism on T-cell development and function. *Int. Rev. Immunol.* **34** 19–33 (2015).
22. Salmond, R. J. mTOR regulation of glycolytic metabolism in T cells. *Front. Cell Dev. Biol.* **6** (2018).
23. Finlay, D. & Cantrell, D. A. Metabolism, migration and memory in cytotoxic T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 109–117 (2011).
24. Klebanoff, C. A. *et al.* Central memory self/tumor-reactive CD8⁺ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 9571–9576 (2005).
25. Golubovskaya, V. & Wu, L. Different subsets of T cells, memory, effector functions, and CAR-T immunotherapy. *Cancers* **8** (2016).
26. O’Sullivan, D. The metabolic spectrum of memory T cells. *Immunol. Cell Biol.* **97**, 636–646 (2019).
27. Gubser, P. *et al.* Rapid effector function of memory CD8⁺ T cells requires an immediate-early glycolytic switch. *Nat Immunol* **14**, (2013).
28. Almeida, L., Lochner, M., Berod, L. & Sparwasser, T. Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation. *Semin. Immunol.* **28** 514–524 (2016).
29. Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 677–704 (2008).
30. Patsoukis, N. *et al.* Immunometabolic regulations mediated by coinhibitory receptors and their impact on T cell immune responses. *Front. Immunol.* **8** (2017).
31. Mallett, G., Laurence, A. & Amarnath, S. Programmed Cell Death-1 Receptor (PD-1)-Mediated Regulation of Innate Lymphoid Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **20** (2019).
32. Kumar, H. & Choi, D. K. Hypoxia Inducible Factor Pathway and Physiological Adaptation: A Cell Survival Pathway? *Mediators Inflamm.* 2015 (2015).
33. Phan, A. T. & Goldrath, A. W. Hypoxia-inducible factors regulate T cell metabolism and function. *Mol. Immunol.* **68**, 527–535 (2015).
34. Noman, M. Z. *et al.* Hypoxia: A key player in antitumor immune response. A review in the theme: Cellular responses to hypoxia. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **309**, C569–C579 (2015).
35. Zahavi, D. J. & Weiner, L. M. Tumor mechanisms of resistance to immune attack. in *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 164 61–100 (Elsevier B.V., 2019).
36. Naito, Y. *et al.* CD8⁺ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res.* **58**, 3491–3494 (1998).
37. Wei, S., Chang, A. & Zou, W. Immune Escape: Immunosuppressive Networks. in *Cancer Immunotherapy* 83–97 (Elsevier Inc., 2007).
38. Lv, X. *et al.* The role of hypoxia-inducible factors in tumor angiogenesis and cell metabolism. *Genes Dis.* **4** 19–24 (2017).
39. Dewhirst, M. W., Cao, Y. & Moeller, B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat. Rev. Cancer* **8** 425–437 (2008).

40. Lanitis, E., Irving, M. & Coukos, G. Targeting the tumor vasculature to enhance T cell activity. *Curr. Opin. Immunol.* **33** 55–63 (2015).
41. Zuckerberg, A. L., Goldberg, L. I. & Lederman, H. M. Effects of hypoxia on interleukin-2 mRNA expression by T lymphocytes. *Crit. Care Med.* **22**, 197–203 (1994).
42. Hao, N. B. *et al.* Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin. Dev. Immunol.* 2012 (2012).
43. Zhou, L. *et al.* HIF1A/PD-L1 axis mediates hypoxia-induced cell apoptosis and tumor progression in follicular thyroid carcinoma. *Onco. Targets. Ther.* **12**, 6461–6470 (2019).
44. Glass, C. K. & Natoli, G. Molecular control of activation and priming in macrophages. *Nat. Immunol.* **17** 26–33 (2016).
45. Pinto, M. L. *et al.* The Two Faces of Tumor-Associated Macrophages and Their Clinical Significance in Colorectal Cancer. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
46. Sumitomo, R. *et al.* M2 tumor-associated macrophages promote tumor progression in non-small-cell lung cancer. *Exp. Ther. Med.* (2019) doi:10.3892/etm.2019.8068.
47. Geiger, R. *et al.* L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity. *Cell* **167**, 829–842 (2016).
48. Thommen, D. S. & Schumacher, T. N. T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer Cell* **33** 547–562 (2018).
49. Tseng, Y. H. *et al.* PD-L1 Expression of Tumor Cells, Macrophages, and Immune Cells in Non–Small Cell Lung Cancer Patients with Malignant Pleural Effusion. *J. Thorac. Oncol.* **13**, 447–453 (2018).
50. Barsoum, I. B., Smallwood, C. A., Siemens, D. R. & Graham, C. H. A mechanism of hypoxia-mediated escape from adaptive immunity in cancer cells. *Cancer Res.* **74**, 665–674 (2014).
51. Luchini, C. *et al.* PD-1, PD-L1, and CD163 in pancreatic undifferentiated carcinoma with osteoclast-like giant cells: expression patterns and clinical implications. *Hum. Pathol.* **81**, 157–165 (2018).
52. Noman, M. Z. *et al.* PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J. Exp. Med.* **211**, 781–790 (2014).
53. Guo, R., Li, Y., Bai, H. & Wang, J. KRAS mutants to regulate PD-L1 expression through NF-KB and HIF-1 α pathways in non-small cell lung cancer cells. *J. Clin. Oncol.* **35**, e20049–e20049 (2017).
54. Jing, W. *et al.* Breast cancer cells promote CD169+ macrophage-associated immunosuppression through JAK2-mediated PD-L1 upregulation on macrophages. *Int. Immunopharmacol.* **78**, (2020).
55. Kuang, D. M. *et al.* Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *J. Exp. Med.* **206**, 1327–1337 (2009).
56. Weber, R. *et al.* Myeloid-derived suppressor cells hinder the anti-cancer activity of immune checkpoint inhibitors. *Front. Immunol.* **9** (2018).
57. Zhang, Y., Huang, S., Gong, D., Qin, Y. & Shen, Q. Programmed death-1 upregulation is correlated with dysfunction of tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes in human non-small cell lung

- cancer. *Cell. Mol. Immunol.* **7**, 389–395 (2010).
58. Brusa, D. *et al.* The PD-1/PD-L1 axis contributes to T-cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Haematol.* **98**, 953–963 (2013).
 59. Sugiura, A. & Rathmell, J. C. Metabolic Barriers to T Cell Function in Tumors. *J. Immunol.* **200**, 400–407 (2018).
 60. Mueckler, M. & Thorens, B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol. Aspects Med.* **34** 121–138 (2013).
 61. Frauwirth, K. A. *et al.* The CD28 Signaling Pathway Regulates Glucose Metabolism. *Immunity* **16**, 769–777 (2002).
 62. Finlay, D. K. Regulation of glucose metabolism in T cells: New insight into the role of phosphoinositide 3-kinases. *Front. Immunol.* **3** (2012).
 63. Siska, P. J. *et al.* Mitochondrial dysregulation and glycolytic insufficiency functionally impair CD8 T cells infiltrating human renal cell carcinoma. *JCI insight* **2**, (2017).
 64. Patsoukis, N. *et al.* PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
 65. Prado-Garcia, H., Romero-Garcia, S., Castro-Flores, D. A. & Rumbo-Nava, U. Deficient glucose uptake is linked to impaired Glut1 expression upon CD3/CD28 stimulation in memory T cells from pleural effusions secondary to lung cancer. *Scand. J. Immunol.* **90**, (2019).
 66. Xia, L., Liu, Y. & Wang, Y. PD-1/PD-L1 Blockade Therapy in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Current Status and Future Directions. *Oncologist* **24**, (2019).
 67. Brahmer, J. *et al.* Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **373**, 123–135 (2015).
 68. Beyrend, G. *et al.* PD-L1 blockade engages tumor-infiltrating lymphocytes to co-express targetable activating and inhibitory receptors. *J. Immunother. Cancer* **7**, (2019).
 69. Prado-Garcia, H., Romero-Garcia, S., Puerto-Aquino, A. & Rumbo-Nava, U. The PD-L1/PD-1 pathway promotes dysfunction, but not “exhaustion”, in tumor-responding T cells from pleural effusions in lung cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* **66**, 765–776 (2017).
 70. Thommen, D. S. *et al.* A transcriptionally and functionally distinct PD-1+ CD8+ T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with pd-1 blockade. *Nat. Med.* **24**, 994–1004 (2018).
 71. Prado-Garcia, H., Aguilar-Cazares, D., Flores-Vergara, H., Mandoki, J. J. & Lopez-Gonzalez, J. S. Effector, memory and naïve CD8+ T cells in peripheral blood and pleural effusion from lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer* **47**, 361–371 (2005).
 72. Atanackovic, D. *et al.* Characterization of effusion-infiltrating T cells: benign versus malignant effusions. *Clin. Cancer Res.* **10**, 2600–8 (2004).
 73. Scherpereel, A. *et al.* Defect in recruiting effector memory CD8+ T-cells in malignant pleural effusions compared to normal pleural fluid. *BMC Cancer* **13**, 1–9 (2013).
 74. Chapman, N. M., Boothby, M. R. & Chi, H. Metabolic coordination of T cell quiescence and activation. *Nat. Rev. Immunol.* **20** 55–70 (2020).
 75. Maekawa, Y. *et al.* Notch controls the survival of memory CD4+ T cells by regulating glucose

- uptake. *Nat. Med.* **21**, 55–61 (2015).
76. De Aguiar, L. M. Z. *et al.* Malignant and tuberculous pleural effusions: Immunophenotypic cellular characterization. *Clinics* **63**, 637–644 (2008).
 77. Sukumar, M. *et al.* Inhibiting glycolytic metabolism enhances CD8+ T cell memory and antitumor function. *J. Clin. Invest.* **123**, 4479–4488 (2013).
 78. Araki, K. *et al.* mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature* **460**, 108–112 (2009).
 79. Bucks, C. M., Norton, J. A., Boesteanu, A. C., Mueller, Y. M. & Katsikis, P. D. Chronic Antigen Stimulation Alone Is Sufficient to Drive CD8 + T Cell Exhaustion . *J. Immunol.* **182**, 6697–6708 (2009).
 80. Schietinger, A. *et al.* Tumor-Specific T Cell Dysfunction Is a Dynamic Antigen-Driven Differentiation Program Initiated Early during Tumorigenesis. *Immunity* **45**, 389–401 (2016).
 81. Schwartz, R. H. T CELL ANERGY . *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 305–334 (2003).
 82. Thompson, K. A., Frauwirth, M.-L. & Alegre, C. B. CTLA-4/B7 Interaction Induction of T Cell Anergy in the Absence of. *J Immunol Ref.* **164**, 2987–2993 (2000).
 83. Marko, A. J., Miller, R. A., Kelman, A. & Frauwirth, K. A. Induction of Glucose Metabolism in Stimulated T Lymphocytes Is Regulated by Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. *PLoS One* **5**, 15425 (2010).
 84. Farber, D. L. Biochemical signaling pathways for memory T cell recall. *Sem. Immunol.* **21** 84–91 (2009).
 85. Esensten, J. H., Helou, Y. A., Chopra, G., Weiss, A. & Bluestone, J. A. CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity* **44** 973–988 (2016).
 86. Kaer, V., Saiki, I., Okumura Yoshihiro Hayakawa, K., Takeda, K. & Yagita, H. Costimulatory Pathways Functions of NKT Cells by CD28 and CD40 Differential Regulation of Th1 and Th2. *J Immunol Ref.* (2001)
 87. Dodson, L. F. *et al.* Targeted Knock-In Mice Expressing Mutations of CD28 Reveal an Essential Pathway for Costimulation. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 3710–3721 (2009).
 88. Siska, P. J. *et al.* Suppression of Glut1 and Glucose Metabolism by Decreased Akt/mTORC1 Signaling Drives T Cell Impairment in B Cell Leukemia. *J. Immunol.* **197**, 2532–2540 (2016).
 89. Li, L. *et al.* Impaired T cell function in malignant pleural effusion is caused by TGF- β derived predominantly from macrophages. *Int. J. Cancer* **139**, 2261–2269 (2016).
 90. Chouaib Azzarone, S. *et al.* The Cooperative Induction of Hypoxia-Inducible Factor-1 and STAT3 α during Hypoxia Induced an Impairment of Tumor Susceptibility to CTL-Mediated Cell Lysis. *J Immunol Ref.* **182**, 3510–3521 (2009).
 91. McNamee, E. N., Korn Johnson, D., Homann, D. & Clambey, E. T. Hypoxia and hypoxia-inducible factors as regulators of T cell development, differentiation, and function. *Immunol Res* **55**, 58–70 (2013).
 92. Zhang, Z., Yao, L., Yang, J., Wang, Z. & Du, G. PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathway in hypoxia-ischemia. *Mol. Med. Rep.* **18** 3547–3554 (2018).
 93. Masoud, G. N. & Li, W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm. Sin. B* **5**, 378–89 (2015).

94. Palazon, A. *et al.* An HIF-1 α /VEGF-A Axis in Cytotoxic T Cells Regulates Tumor Progression. *Cancer Cell* **32**, 669-683.e5 (2017).
95. Senavirathna, L. K. *et al.* Hypoxia induces pulmonary fibroblast proliferation through NFAT signaling. *Sci. Rep.* **8**, (2018).
96. Oestreich, K. J., Yoon, H., Ahmed, R. & Boss, J. M. NFATc1 Regulates PD-1 Expression upon T Cell Activation. *J. Immunol.* **181**, 4832–4839 (2008).
97. Francisco, L. M., Sage, P. T. & Sharpe, A. H. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol. Rev.* **236** 219–242 (2010).
98. Curran, M. A., Montalvo, W., Yagita, H. & Allison, J. P. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 4275–4280 (2010).