



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LA MASA MITOCONDRIAL
EN LINFOCITOS T CD8+ PROVENIENTES DE
PACIENTES CON CÁNCER PULMONAR**

TESIS

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

PRESENTA

Rosa Sandoval Martínez



Ciudad de México

2016



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: ENRIQUE ORTEGA SOTO**

VOCAL: **Profesor: CLAUDIA TERESA TOVAR PALACIO**

SECRETARIO: **Profesor: HERIBERTO PRADO GARCÍA**

1er. SUPLENTE: **Profesor: JULIO CESAR MARTINEZ ALVAREZ**

2° SUPLENTE: **Profesor: GIBRAN PEREZ MONTESINOS**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLÓ EN EL LABORATORIO DE CÁNCER PULMONAR DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS “ISMAEL COSIO VILLEGAS”

ASESOR DEL TEMA:

DR. HERIBERTO PRADO GARCÍA

SUSTENTANTE (S):

ROSA SANDOVAL MARTÍNEZ

Índice

Abreviaturas	1
Índice de Figuras y Tablas	3
1. Introducción	5
1.1. Cáncer	5
1.1.1. <i>“Hallmarks” del cáncer</i>	5
1.1.2. <i>Estadísticas del cáncer</i>	8
1.2. Cáncer de pulmón	9
1.2.1. <i>Derrame pleural</i>	10
1.2.2. <i>Derrame pleural maligno</i>	11
1.3. Linfocitos T CD8+	12
1.3.1. <i>Activación de linfocitos T</i>	12
1.3.2. <i>Coestimulación del linfocito T</i>	13
1.3.3. <i>CD137, marcador de activación</i>	14
1.3.4. <i>Diferenciación a subpoblaciones</i>	14
1.4. Mitocondria	16
1.4.1. <i>Papel de la mitocondria en la activación de linfocitos T</i>	17
2. Antecedentes	20
2.1. <i>Masa mitocondrial</i>	20
2.2. <i>Microambiente tumoral: hipoxia en cáncer y respuesta inmune</i>	22
2.3. <i>Muerte celular inducida por activación (AICD) en cáncer pulmonar</i>	24
3. Justificación	26
4. Hipótesis	27
5. Objetivos	27
5.1. <i>General</i>	27
5.2. <i>Particulares</i>	27
6. Materiales y Métodos	28

7. Resultados	34
7.1. <i>Análisis de la masa mitocondrial (MM) y el porcentaje de linfocitos T CD4 y CD8+</i> 35	
7.2. <i>Determinación de subpoblaciones naive, memoria y efectoras en linfocitos T CD8+</i> 37	
7.3. <i>Análisis de la masa mitocondrial (MM) en las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ estimulados: linfocitos T CD8+ naive</i>	39
7.4. <i>Análisis de la masa mitocondrial (MM) en las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ estimulados: células de memoria</i>	43
7.5. <i>Determinación de apoptosis</i>	46
8. Discusión	47
9. Conclusión	54
10. Bibliografía	55

Abreviaturas

AICD	Muerte celular inducida por activación
APC	Célula presentadora de antígeno profesional
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
CMN	Células mononucleares
CMNLP	Células mononucleares de líquido pleural
CMNSP	Células mononucleares de sangre periférica
CPT1a	Carnitina palmitoiltransferasa 1a
CRAC	Canales de calcio activados por liberación de calcio
CTL	Linfocitos T citotóxicos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Derrame pleural
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HK	Hexocinasa
IFN	Interferón
IL	Interleucina
LP	Líquido pleural
MDSC	Células supresoras de origen mieloide
MFI	Intensidad media de fluorescencia
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MM	Masa mitocondrial
MPE	Derrame pleural maligno
MSC	Células madre estromales
mtDNA	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
NADH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotido reducido
NK	Células asesinas naturales
NSLC	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
PBS	Amortiguador de fosfatos salinos
RNA ^t	Ácido ribonucleico de transferencia
RNA ^r	Ácido ribonucleico ribosómico

ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SCLC	Cáncer de pulmón de células pequeñas
SP	Sangre periférica
SRC	Capacidad respiratoria de repuesto
TCR	Receptor de células T
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
TNF	Factor de necrosis tumoral
Treg	Linfocitos T cooperadores

Índice de Figuras y Tablas

Figuras

- Fig 1.** Análisis citométrico de la masa mitocondrial de CMNLP provenientes de DP de un paciente con adenocarcinoma pulmonar.....**24**
- Fig 2.** Análisis representativo para determinar el porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+.....**25**
- Fig 3. (A)** Porcentaje de linfocitos T CD8+ y T CD4+ y **(B)** masa mitocondrial en DP y SP de pacientes con cáncer pulmonar y SP de donadores sanos.....**26**
- Fig 4.** Determinación de subpoblaciones naive, memoria y efectoras en linfocitos T CD8+ de DP y SP de pacientes con cáncer pulmonar y SP de donadores sanos. Análisis del porcentaje de células y masa mitocondrial de cada subpoblación.....**27**
- Fig 5.** Análisis representativo de la masa mitocondrial de linfocitos T CD8+ *naive* proveniente de DP y SP de pacientes con cáncer y SP de donadores sanos.....**29**
- Fig 6.** Masa mitocondrial de linfocitos T CD8+ *naive* CD137+ con MM^{high} y MM^{low} proveniente de DP y SP de pacientes con cáncer y SP de donadores sanos.....**31**
- Fig 7.** Masa mitocondrial de linfocitos T CD8+ *naive* CD137+ con MM^{high} y MM^{low} proveniente de DP y SP de pacientes con cáncer y SP de donadores sanos estimulados en condiciones de hipoxia.....**31**
- Fig 8.** Análisis representativo de la masa mitocondrial en linfocitos T CD8+ de memoria. Porcentaje de células con fenotipo MM^{high} y MM^{low} proveniente de DP y SP de pacientes con cáncer y SP de donadores sanos.....**32**
- Fig 9.** Masa mitocondrial de linfocitos T CD8+ de memoria CD137+ con MM^{high} y MM^{low} proveniente de DP y SP de pacientes con cáncer y SP de donadores sanos estimulados en condiciones de hipoxia.....**34**

Fig 10. Porcentaje de células T CD8+ CD137- Anexina V+ proveniente de DP de pacientes con cáncer pulmonar estimulados en condiciones de normoxia e hipoxia.....**35**

Tablas

Tabla 1. Anticuerpo empleados en inmunofenotipificación.....**31**

Tabla 2. Porcentaje de células T CD8+ de memoria con MM^{high} y MM^{low} proveniente de DP y SP de pacientes con cáncer y SP de donadores sanos estimulados.....**33**

1. Introducción

1.1. Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades causada por la inestabilidad de los genes, mutaciones en oncogenes y en genes supresores de tumores. El cáncer involucra cambios dinámicos en el genoma como resultado de eventos complejos. Estos cambios permiten a las células su transformación a un fenotipo maligno e incluyen mutaciones con ganancia de funciones que activan oncogenes, mutaciones con pérdida de función que inactivan genes supresores de tumores y mutaciones que afectan la estabilidad de los genes (incluyendo recombinación y segregación cromosomal adecuada durante la mitosis).⁽⁴⁸⁾

Las células neoplásicas evolucionan adquieren ciertas características y capacidades denominadas “hallmarks”.⁽³⁰⁾

1.1.1. “Hallmarks” del cáncer

Se conocen 8 capacidades conocidas como “hallmarks”, distintas y complementarias entre ellas que le permiten al tumor crecer y diseminarse:

Potencial replicativo ilimitado

Los telómeros son secuencias repetidas en tándem de hexanucleótidos localizadas en la zona final de los cromosomas y encargados de proteger la misma. La longitud del DNA telomérico en una célula determina cuantas veces esta puede dividirse antes de que las secuencias de hexanucleótidos se acorten progresivamente perdiendo su habilidad protectora, lo que provoca la muerte de las células. La actividad de la telomerasa –habilidad de extender los telómeros– está presente en células germinales y hematopoyéticas, mientras que las células somáticas tienen niveles bajos o no detectables de esta actividad. La inmortalización de las células neoplásicas se atribuye a la habilidad de mantener el DNA telomérico –al reactivar la telomerasa– con una longitud suficiente para evitar entrar en un estado de senescencia.^(30,53)

Angiogénesis sostenida

Los tumores requieren de nutrientes y oxígeno así como una vía para eliminar desechos metabólicos y dióxido de carbono. Durante la embriogénesis el desarrollo vascular involucra la creación de nuevas células endoteliales, el ensamble de los nuevos vasos (vasculogénesis) y el surgimiento de estos nuevos vasos (angiogénesis). Durante la progresión a células tumorales, el “switch angiogénico” es activado y se mantiene encendido, causando el surgimiento de nuevos vasos que permitan la expansión sostenida del tumor. ⁽³⁰⁾

Evasión de la apoptosis

Las células tumorales desarrollan una gran variedad de estrategias para limitar o evadir la apoptosis. El mecanismo mejor conocido es la pérdida de función del gen supresor de tumores TP53, el cual induce apoptosis al regular la expresión de las proteínas Noxa y Puma (miembros de la familia de proteínas “BH3-only”), en respuesta a daño en el DNA y anomalías cromosómicas; además, las células tumorales aumentan la expresión de moléculas antiapoptóticas (proteínas de la familia Bcl-2) y de señales de supervivencia (por ejemplo, el factor de crecimiento tipo insulina IGF1/2 en células epiteliales) y disminuyen la producción de factores proapoptóticos (proteínas Bax, Bim y Puma). ^(27,30)

Autosuficiencia en las señales de crecimiento

Las células neoplásicas adquieren la capacidad para producir señales proliferativas a través de distintas vías como la producción de factores de crecimiento, provocando una estimulación autocrina de la proliferación. Alternativamente, las células cancerosas envían señales de estimulación a las células normales las cuales están asociadas y forman parte del soporte del estroma tumoral. Dichas señales de estimulación conducen a que las células del estroma aporten factores de crecimiento a las células tumorales. ⁽³⁰⁾

Insensibilidad a señales antiproliferativas

Las células cancerosas deben evadir programas que regulan negativamente la proliferación celular; estos programas dependen de genes supresores de tumores, de los cuales los mejores caracterizados son el gen RB (asociado a retinoblastoma) y el gen TP53. Estos genes regulan la proliferación celular o alternativamente conducen a la célula a la apoptosis. La proteína RB integra diversas señales extracelulares y en respuesta permite o no a una célula dividirse, mientras que la proteína p53 recibe señales de estrés (daño en el DNA y anomalías cromosómicas) conduciendo a la célula a la apoptosis. Las células neoplásicas tienen defectos en la vía RB perdiendo su función, permitiendo la progresión al ciclo celular y la proliferación. ^(30,55)

Invasión a tejidos y metástasis

La metástasis es un proceso de múltiples fases durante las cuales las células malignas se propagan y extienden a órganos lejanos del tumor primario. Esta serie de cambios celulares biológicos inicia con la invasión local, después la intravasación de las células cancerosas a vasos sanguíneos y linfáticos cercanos; el tránsito de las células cancerosas a través del sistema linfático y hematógeno es seguido por el escape de células cancerosas de la lumina de los vasos al interior del parénquima de tejidos lejanos (extravasación), la formación de pequeños nódulos de células cancerosas (micrometástasis) y finalmente el crecimiento de estas lesiones micrometastásicas en tumores macroscópicos. ^(29,30)

Reprogramación metabólica

La proliferación incontrolada de las células tumorales requiere ajustes en el metabolismo para proporcionar la energía necesaria para el crecimiento y división celular. Otto Warburg fue el primero en observar las características anormales en el metabolismo energético de las células cancerosas; estas en presencia de oxígeno reprograman el metabolismo de la glucosa y su producción de energía, entrando en un estado conocido como glucólisis aerobia. La existencia de un “switch” metabólico en células cancerosas se ha confirmado a lo largo de las

décadas y al incrementar la glucólisis permite la producción de varios intermediarios glucolíticos y su entrada en varias vías biosintéticas, incluyendo la generación de nucleótidos y aminoácidos. El metabolismo glucolítico se ha asociado con la activación de oncogenes (RAS, MYC) y la mutación de supresores de tumores (TP53).⁽³⁰⁾

Evasión de la destrucción inmunológica

Las células cancerosas evaden la destrucción inmunológica inhabilitando componentes del sistema inmune. Algunos de los mecanismos de evasión mejor caracterizados en las células tumorales son inactivar linfocitos T infiltrantes de tumores (CTLs) y las células NK secretando TGF- β y otros factores inmunosupresores; otro mecanismo actúa reclutando células inflamatorias con actividad inmunosupresora, incluyendo linfocitos T reguladores (Tregs) y células supresoras de origen mieloide (MDSCs), las cuales suprimen la acción de los linfocitos T citotóxicos.⁽³⁰⁾

1.1.2. Estadísticas del cáncer

El cáncer es la principal causa de muerte en los países económicamente desarrollados y la segunda causa de muerte en países en desarrollo. El impacto del cáncer es cada vez mayor en los países económicamente desarrollados como resultado del crecimiento y el envejecimiento de la población, así como la adopción de estilos de vida asociados con el cáncer como el tabaquismo, la inactividad física y las dietas “occidentalizadas”.⁽³³⁾

De acuerdo a lo reportado por GLOBOCAN 2012, se estimaron alrededor de 14.1 millones de nuevos casos de cáncer y 8.2 millones de muertes por cáncer en el mundo en el año 2012. El cáncer más comúnmente diagnosticado fue el cáncer de pulmón (1.8 millones de casos), seguido por el cáncer de mama (1.67 millones de casos) y el cáncer colorrectal (1.36 millones de casos). La causa más común de muerte por cáncer es el cáncer de pulmón (1.6 millones de muerte), seguido por el cáncer de hígado (745 000 muertes) y cáncer de estómago (723 00 muertes).⁽²⁵⁾

1.2. Cáncer de pulmón

Se denomina cáncer de pulmón al conjunto de neoplasias malignas con origen en las células que componen las vías aéreas y el parénquima pulmonar, de este modo se excluyen las metástasis pulmonares de otros tumores. ⁽³⁾

La mayoría (cerca del 95%) de los tumores pulmonares primarios surge del epitelio bronquial (carcinoma broncogénico). El 5% restante forma un grupo que incluye tumores carcinoides bronquiales (tumores neuroendocrinos), tumores glandulares bronquiales, fibrosarcomas y linfomas. El pulmón también es un lugar frecuente de metástasis de neoplasias malignas de otras partes del cuerpo. ⁽⁴⁴⁾

El cáncer pulmonar es un grupo heterogéneo de enfermedades, dividido en 2 grandes grupos: carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés non-small cell lung cancer) y carcinoma pulmonar de células pequeñas (SCLC, por sus siglas en inglés small cell lung cancer). Esta clasificación se basa en las características histológicas y en su respuesta a las terapias convencionales; específicamente, el NSCLC incluye 3 subtipos histológicos: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células grandes. El adenocarcinoma pulmonar es el subtipo más frecuente con el 40% de los casos. ⁽³⁾

El carcinoma epidermoide es el más frecuente en los hombres y está relacionado con el antecedente de tabaquismo. El adenocarcinoma es el tipo más común de cáncer pulmonar detectado, y la neoplasia pulmonar más común en mujeres y en no fumadores. Los carcinomas de células grandes están constituidos por células poligonales grandes y constituyen un grupo de neoplasias altamente anaplásicas. ⁽⁴³⁾

El SCLC se caracteriza por un tipo celular característico: células pequeñas redondas u ovals. Estas células crecen en grupos que no tienen una organización glandular ni epidermoide. Los SCLC son notablemente malignos y tienden a infiltrarse en forma extensa, se diseminan temprano en su evolución y rara vez son resecables. ⁽⁴³⁾

1.2.1. Derrame pleural

La pleura es una membrana serosa, fina y transparente, constituida por dos capas, que cubre a la cavidad torácica y envuelve a los pulmones. La capa parietal externa es adyacente a la pared torácica, y la capa visceral interna se adhiere a la superficie externa del pulmón. ⁽³⁾

Las membranas pleurales- visceral y parietal- son estructuras mesoteliales que revisten los pulmones en la cavidad torácica, creando el denominado espacio pleural, un ambiente estéril y protector equipado con un sistema linfático designado para reciclar el fluido pleural normal. Una película fina de líquido seroso separa las dos capas pleurales, y esto permite que se deslicen una sobre la otra y que incluso se mantengan juntas, de tal forma que no hay separación entre los pulmones y la pared torácica. Este fluido le permite a la superficie del pulmón desplazarse y deslizarse contra la pared torácica durante la respiración. El espacio pleural es un sitio en el que frecuentemente se da la metástasis en cáncer de pulmón, mama, gastrointestinal y de ovario. ^(3,43)

El derrame pleural es la acumulación anormal de líquido en el espacio pleural. Normalmente, solo una capa fina de líquido seroso (<10 a 20 mL) separa a las capas visceral y parietal de la cavidad pleural. El derrame pleural aparece cuando la velocidad de formación del líquido supera a la velocidad de su eliminación y este puede ser transudado o exudado. Las causas posibles del derrame son: 1) bloqueo del drenaje linfático del espacio pleural por procesos obstructivos como el cáncer pulmonar; 2) Insuficiencia cardiaca, que produce presiones capilares periféricas y pulmonares extremadamente altas, que conducen a un trasudado excesivo de líquido al interior del espacio pleural; 3) disminución considerable de la presión coloidal osmótica del plasma, que permite también el trasudado excesivo de líquido; 4) infección o cualquier otro caso de inflamación de las superficies de la cavidad pleural, que rompe la integridad de las membranas capilares y permite que la cavidad se llene rápidamente de proteínas plasmáticas y de líquido. ⁽⁴³⁾

El transudado se debe a factores sistémicos y consiste en el líquido seroso, en donde la alteración funcional implica aumento de la presión capilar, disminuyendo la absorción y aumentando la acumulación de líquido. La acumulación de un transudado seroso en la cavidad pleural se suele denominar hidrotórax, siendo la insuficiencia cardíaca congestiva es la causa más común. ^(14,43)

El exudado orienta hacia un proceso de tipo inflamatorio local, alterando la permeabilidad de la superficie pleural. El aumento de la permeabilidad capilar deja escapar proteínas a la cavidad pleural, con lo que incrementa la presión oncótica del líquido pleural produciéndose así el desequilibrio de presiones que origina el derrame y favorece su aumento. Es causado por infecciones, infarto pulmonar y neoplasias malignas. ^(14,43)

1.2.2. Derrame pleural maligno

Una condición inflamatoria frecuente en el cáncer pulmonar, principalmente en adenocarcinoma, es la formación de derrame pleural como consecuencia de la invasión tumoral a la pleura en estados avanzados de la enfermedad. La acumulación de líquido en este comportamiento es la formación de derrame pleural, el cual ocurre en el 15-20% de los casos de cáncer pulmonar primario. En estos pacientes el derrame pleural es detectado con una cantidad de fluido que varía entre 300-1500 ml; la presencia de derrame pleural es una señal de un pobre pronóstico, con una media de supervivencia de 4 meses disminuyendo su calidad de vida al provocar diversos síntomas como disnea y dolor de pecho. ⁽⁴⁵⁾

El derrame pleural maligno (MPE, por sus siglas en inglés malignant pleural effusion) es tradicionalmente atribuido a la oclusión del estroma de la pleura parietal o por obstrucción de los vasos linfáticos. Además, sumado al bloqueo linfático, está la inflamación, el aumento de la angiogénesis y la fuga vascular. Se presenta frecuentemente asociado a dos condiciones: tumores primarios de la pleura y tumores metastásicos. Por lo general el derrame pleural maligno es serohemático o hemático de color rojo oscuro o vino y estudios citológicos de

líquido indican que este contiene un gran número de células neoplásicas e inflamatorias. ^(3,14,45)

1.3. Linfocitos T CD8+

Los linfocitos T son componentes esenciales del sistema inmune dividiéndose en 2 grupos por sus características funcionales: linfocitos T cooperadores y linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos T cooperadores (CD4+) liberan citocinas y organizan una respuesta inmune diversa integrando los mecanismos efectores de la inmunidad innata y adaptativa. Los linfocitos T CD8+ son un componente crucial de la respuesta inmune adaptativa, la cual es necesaria para el control de una gran variedad de infecciones bacterianas, virales y transformación oncogénica. ⁽⁴⁶⁾

La estimulación a través del receptor de células T (TCR) y receptores de coestimulación encienden el “switch” en las células T para su diferenciación de un estado de inactividad a un estado activado caracterizado por una proliferación y crecimiento rápido así como la adquisición de funciones efectoras. ⁽³⁴⁾

1.3.1. Activación de linfocitos T

La activación de células requiere dos señales a través de las células presentadoras de antígeno (APCs, por sus siglas en inglés, antigen presenting cells). La primera señal involucra la presentación del antígeno por las APCs, al interaccionar el TCR con un péptido unido a moléculas clase I o clase II del MHC (por sus siglas en inglés, mayor histocompatibility complex) en las APCs. Las moléculas del MHC son glucoproteínas de membrana que codifican en una agrupación de genes llamados el complejo mayor de histocompatibilidad. Las moléculas del MHC funcionan como moléculas de reconocimiento de antígeno, uniéndose a una gama de péptidos antigénicos derivados principalmente de la degradación de moléculas proteínicas. En las moléculas del MHC clase I y clase II hay una hendidura dentro de la cual se asienta el péptido antigénico y se presenta a linfocitos T. ⁽¹⁾

La segunda señal o señal de coestimulación, estimula las células T en conjunto con el antígeno a través de moléculas expresadas en las APCs, las cuales se unen a su receptor de coestimulación correspondiente en la superficie de linfocitos T. La interacción del TCR con el complejo antígeno-MHC permite el reconocimiento del antígeno e inician la señalización intracelular; los correceptores CD8 y CD4 asisten la señalización del TCR y las moléculas coestimuladoras inician sus propias señales intracelulares que aumentan o modulan la señalización del TCR. La activación tiene como principal consecuencia la proliferación de la clona antígeno-específica (expansión clonal) y diferenciación de la célula progenitora a célula efectora o de memoria. ^(1,10,46)

1.3.2. Coestimulación del linfocito T

Los receptores de coestimulación se definen como moléculas en la superficie celular que transducen señales dentro del linfocito T que modulan positiva o negativamente la señalización por parte del TCR. Estas moléculas juegan un papel crucial en la regulación de la activación del linfocito T, su diferenciación a subpoblaciones, sus funciones efectoras y supervivencia. ⁽¹⁹⁾

Después del reconocimiento del péptido unido a moléculas del MHC en APCs, los coreceptores se colocan con moléculas del TCR, donde tienen un efecto sinérgico con la señalización del TCR para promover o inhibir la activación del linfocito T y su función. La expresión de muchas moléculas de coestimulación en la superficie celular del linfocito T es inducida después de la activación y estos cambios ocurren en conjunto con la etapa de proliferación y diferenciación celular. ⁽¹⁹⁾

La molécula de coestimulación mejor caracterizada es CD28, expresada en la superficie celular como un homodímero glicosilado estabilizado por un puente disulfuro; en humanos, CD28 está expresado en el 80% de la población de linfocitos T CD4+ y en el 50% de linfocitos T CD8+. La molécula CD28 pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y se localiza en el cromosoma humano 2q33 y provee la segunda señal para la activación del linfocito T. ⁽⁹⁾

Ésta molécula provee una señal de coestimulación esencial para el crecimiento y supervivencia de linfocitos T al unirse a su ligando (B7-1 y B7-2) en las APCs, incrementando en los linfocito T la respuesta a la activación, teniendo como resultado la proliferación; aumenta la producción de citocinas, principalmente IL-2, al regular su expresión transcripcional y post-transcripcional y aumenta la supervivencia celular, al inducir la expresión de proteínas antiapoptóticas, incluidas Bcl-x_L.^(9,19)

1.3.3. CD137, marcador de activación

CD137 (ILA/ 4-1BB) es una molécula coestimuladora inducible, miembro de la familia de receptores TNF (factor de necrosis tumoral); los miembros de esta familia y sus ligandos actúan como reguladores importantes en procesos fisiológicos y juegan un papel muy importante en la regulación de la respuesta inmune. Se ha localizado su gen en el cromosoma 1p36; ésta región cromosómica alberga los genes de varios otros miembros de esta familia de receptores.^(51,54)

La expresión de CD137 es inducida por la activación de las células T; no es detectable en linfocitos T no activados, pero cuando éstos se estimulan con algún agonista, en presencia de APCs, aumenta su expresión. Ésta molécula genera señales de coestimulación que aumentan la supervivencia y diferenciación celular así como la actividad citolítica en linfocitos T.⁽¹⁸⁾

En linfocitos T CD8⁺ promueve la producción de IL-2 e IFN- γ , induce la activación de proteínas como ERK1/2, p38 y PI3K; provee señales de supervivencia contra la muerte inducida por activación, incrementando la expresión de moléculas antiapoptóticas Bcl-xL y Bfl-1 a través de la activación de la vía NF- κ B.^(13,54)

1.3.4. Diferenciación a subpoblaciones

La respuesta de los linfocitos al antígeno y a la segunda señal consiste en una serie de eventos biológicos dentro de la célula: (1) síntesis de proteínas, proceso en el cual los linfocitos inician la transcripción de genes que previamente estaban inactivos para sintetizar gran variedad de proteínas. (2) Proliferación celular, en

respuesta al antígeno y a factores de crecimiento producidos por los linfocitos antígeno-estimulados y por otras células, para que los linfocitos entren en división mitótica; el resultado de la proliferación y el incremento de tamaño de la clona antígeno-específico se conoce como expansión clonal. (3) Diferenciación a células efectoras, proceso en donde parte de la progenie de los linfocitos antígeno-estimulados se diferencian a células efectoras, las cuales tienen como función eliminar el antígeno. (4) Homeostasis, disminución de la respuesta inmune, pues el sistema inmune regresa a su estado basal por lo que gran parte de la progenie de los linfocitos antígeno-estimulados mueren por apoptosis. (5) Diferenciación a células de memoria; parte de la progenie de los linfocitos antígeno-estimulados no se diferencia a células efectoras, en su lugar, entran en un estado inactivo funcional conocido como linfocitos de memoria. Estas células son capaces de sobrevivir por largos periodos, aparentemente en ausencia de antígeno. ⁽¹⁾

Estudios muestran que los linfocitos T CD8+ cambian la expresión de moléculas de coestimulación en su superficie de acuerdo a su estado de diferenciación y maduración. ⁽⁵⁸⁾

Se han encontrado tres distintas etapas de diferenciación en linfocitos T CD8+, cada una de las cuales presentan diferencias en el fenotipo, función y distribución anatómica: (1) linfocitos T CD8+ *naive*, descritos como células CD45RA+ CD45RO- CD27+ CD28+; esta subpoblación se localiza principalmente en nódulos linfoides secundarios y al ser activadas pueden proliferar y diferenciarse a células efectoras y de memoria. (2) Linfocitos T CD8+ efectoras, descritos como células CD45RA+ CD45RO- CD27- CD28-; estas células muestran función efectora directa como actividad citotóxica y producción de citocinas en respuesta a su blanco. (3) Linfocitos T CD8+ de memoria, con fenotipo CD45RA- CD45RO+ CD27+ CD28+; estas células no tienen actividad citotóxica directa sin previa activación, pero sobreviven por periodos largos de tiempo y pueden proliferar y secretar citocinas en respuesta a la estimulación del antígeno. ^(44,58)

1.4. Mitocondria

La mitocondria es un sistema encargado de la coordinación de la producción y distribución de energía en base a la disponibilidad de ATP, oxígeno y demandas de mantenimiento y reproducción celular. ⁽⁶²⁾

Las mitocondrias contienen por un sistema de doble membrana, que consta de las membranas mitocondriales interna y externa, separadas por un espacio intermembranal. La membrana interna está conformada por numerosos pliegues (crestas) que se extienden hacia el interior (o matriz) del organelo. La matriz contiene el sistema mitocondrial genético así como las enzimas responsables de las reacciones centrales del metabolismo oxidativo. ⁽²²⁾

La membrana mitocondrial interna representa el sitio principal de la generación de ATP, y éste papel crítico se refleja en su estructura. En primer lugar, su superficie incrementa sustancialmente con el plegamiento en crestas. Además, la membrana mitocondrial interna contiene un porcentaje inusualmente elevado (superior a 70%) de proteínas, las cuales están implicadas en la fosforilación oxidativa, así como en el transporte de metabolitos (por ejemplo, el piruvato y ácidos grasos) entre el citosol y mitocondrias. Por otro lado, la membrana interior es impermeable a la mayoría de los iones y moléculas pequeñas –una propiedad crítica para mantener el gradiente de protones que impulsa la fosforilación oxidativa. ⁽²²⁾

En contraste, la membrana externa es libremente permeable a moléculas pequeñas. Esto es debido a que contiene proteínas llamadas porinas, que forman canales que permiten la difusión libre de moléculas más pequeñas, aproximadamente de 6000 daltons. Por lo tanto, la composición del espacio intermembrana es similar a la del citosol con respecto a los iones y moléculas pequeñas. En consecuencia, la membrana interna es la barrera funcional para el paso de pequeñas moléculas entre el citosol y la matriz y mantiene el gradiente de protones que impulsa la fosforilación oxidativa. ⁽²²⁾

La mayoría de las proteínas mitocondriales se traducen en ribosomas citosólicos libres y son importadas en al organelo a través de señales de orientación

específicos. Las mitocondrias son los únicos organelos citoplasmáticos que contienen su propio DNA, que codifica RNAt, RNAr y algunas proteínas mitocondriales. ⁽²²⁾

Muchos parámetros celulares vitales son controlados por las mitocondrias y éstos incluyen la regulación de la producción de energía, la modulación del estado de oxidación-reducción, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), control del calcio citosólico (Ca^{2+}), contribución de precursores biosintéticos, tales como acetil-CoA y pirimidinas, y la iniciación de la apoptosis a través de la activación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mt PTP). Los cambios en estos parámetros pueden afectar vías biosintéticas, vías de transducción de señales celulares, factores de transcripción y la estructura de la cromatina que cambia a la célula de un estado de reposo diferenciado a uno activamente proliferante. ⁽⁶²⁾

1.4.1. Papel de la mitocondria en la activación de linfocitos T

Los linfocitos en reposo y los activados utilizan diferentes vías metabólicas. Las células en reposo tienen demandas energéticas y biosintéticas relativamente menores en comparación con células en un estado activado. Estas células en reposo, tienen una baja tasa de captación de nutrientes obteniendo la mayor cantidad de ATP por procesos catabólicos como la fosforilación oxidativa. ⁽³⁴⁾

Después de la estimulación, los linfocitos T cambian de un estado de reposo a un estado de crecimiento activo. Procesos anabólicos como la síntesis de proteínas y lípidos aumentan mientras que los procesos catabólicos como la β -oxidación son suprimidos. ⁽³⁴⁾

La activación de linfocitos T, la cual requiere de la señal por parte del TCR y la señal de coestimulación, es seguida por un incremento rápido de captación de glucosa y el metabolismo glucolítico, promoviendo la transcripción rápida de genes que codifican enzimas glucolíticos como la fosfatasa 3-gliceraldehído deshidrogenasa, aldolasa y enolasa, entre otras. ⁽³⁴⁾

Finalmente, el piruvato, producto final de la glucólisis puede importarse a la mitocondria donde se convierte en sustrato para la producción de aminoácidos o para la síntesis de ácidos grasos. Además, el metabolismo del piruvato en la mitocondria mantiene el potencial de membrana mitocondrial, suprimiendo la apoptosis en linfocitos en proliferación. ⁽³⁴⁾

En linfocitos T en proliferación, la mitocondria toma un nuevo rol como centro biosintético, convirtiendo metabolitos como piruvato y glutamina en intermediarios utilizados por otras vías biosintéticas. A pesar de la habilidad para captar lípidos del medio extracelular, los linfocitos generan lípidos *de novo* a partir de los intermediarios del ciclo de Krebs (también llamado ciclo de los ácidos tricarboxílicos), para ser usados en la síntesis de la membrana durante su crecimiento y proliferación. Los aminoácidos como ácido aspártico, asparagina, arginina, glutamina y prolina son necesarios para incrementar la traducción de proteínas y son derivados de intermediarios del ciclo de Krebs. Adicionalmente, la glutamina actúa como una amina donadora en la biosíntesis de purinas y en la producción de aminoácidos no esenciales; esto explica porque la glutamina es un metabolito esencial en la proliferación de células T. ⁽³⁴⁾

Después de la unión del TCR con la señal de coestimulación por parte de la molécula CD28, se activa la vía fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), la cual a través de la conversión del lípido de membrana inositol 4,5-difosfato (PIP₂) genera la molécula inositol 1,4,5-trifosfato (PIP₃); la molécula PIP₃ promueve la liberación del calcio del retículo endoplasmático. El calcio es captado por las mitocondrias, resultando en la estimulación de las enzimas del ciclo de Krebs incrementando la tasa de fosforilación oxidativa. Este fenómeno genera aumento de la producción de ATP mitocondrial como resultado de la estimulación del ciclo de Krebs dependiente de Ca²⁺. ⁽³⁴⁾

Cuando la señalización del TCR es sostenida, el calcio proveniente del retículo endoplasmático se agota, proceso que es seguido por la entrada de calcio extracelular. La activación efectiva del linfocito T requiere del flujo de Ca²⁺ extracelular a través de los canales activados por liberación de calcio (CRACs), los

cuales puede permanecer abiertos por una señalización sostenida del TCR. Estudios recientes muestran que los CRACs tienden a acumularse en la sinapsis inmune, en la proximidad de la mitocondria. Esto sugiere que la entrada de calcio a través de los CRACs puede conducir la translocación mitocondrial a la sinapsis inmune. Niveles elevados de calcio en el citosol activa factores de transcripción que regulan la respuesta de los linfocitos T, como NFAT1 y NF- κ B, éste último involucrado en la producción de IL-2. ⁽⁴⁹⁾

Bajo estas condiciones, la estimulación de las enzimas deshidrogenasas del ciclo de Krebs dependiente de calcio en linfocitos, resulta en un elevado nivel de NADH mitocondrial necesario para mantener la respiración mitocondrial. Una consecuencia de la saturación persistente de la cadena transportadora de electrones es un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS juegan un papel crucial en la respuesta del linfocito T, potencialmente en la estimulación de la biosíntesis de nucleótidos y en la entrada a la fase S del ciclo celular. Por esto, las ROS mitocondriales pueden actuar como un segundo mensajero que indica que existen las condiciones energéticas adecuadas para sostener la proliferación de linfocitos T. ⁽³⁴⁾

2. Antecedentes

2.1. *Masa mitocondrial*

Cao Y. y cols. ⁽¹⁵⁾ realizaron un estudio en linfocitos T CD4+ y CD8+ de ratón y demostraron que las células T CD4+ tienen mayor contenido de masa mitocondrial que las células T CD8+. Además, la población de linfocitos T CD4+ aumentó su masa mitocondrial cuando se estimuló vía TCR y coestimulación. Esta diferencia de la masa mitocondrial se asoció con los diferentes fenotipos metabólicos que presentan estas dos poblaciones de linfocitos T, los cuales promueven respuestas funcionales específicas. En la población de linfocitos T CD8+ se observó aumento de la glucólisis, la cual mantiene la rápida proliferación de esta población, mientras que en los linfocitos T CD4+ el metabolismo oxidativo les proporciona mayor flexibilidad metabólica para funcionar en diversas condiciones nutricionales.

En otro estudio realizado en linfocitos T totales provenientes de ratón, D'Souza y cols. ⁽²⁴⁾ observaron que las células T incrementaron su masa mitocondrial, el número de copias del mtDNA y el potencial de membrana mitocondrial al ser activados con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (vía TCR y coestimulación), sugiriendo que se incrementa la biogénesis mitocondrial.

Los datos anteriores sugieren que los linfocitos T al activarse primero incrementan su masa mitocondrial y la fosforilación oxidativa para proveer energía necesaria para incrementar su tamaño, contenido citoplasmático y prepararse para una alta tasa de proliferación. Después, se postula que estas células generan ATP vía glucólisis, razón por la cual el potencial de membrana no continúa incrementando. El que la biogénesis mitocondrial continúe incrementando y el potencial de membrana mitocondrial se mantuviera sugiere que es por la necesidad de incrementar el número de organelos activos durante un estado de proliferación rápido y la subsecuente diferenciación. ⁽²⁴⁾

Finalmente, D'Souza y cols. ⁽²⁴⁾ observaron que el aumento coordinado de la masa mitocondrial y el número de copias de mtDNA pueden ser desacoplados uno del otro, indicando que diferentes vías modulan estos parámetros.

En contraste con el metabolismo glucolítico en los linfocitos T en proliferación en respuesta a un antígeno, en los linfocitos T *naïve* y memoria en reposo se lleva a cabo la fosforilación oxidativa para mantener sus demandas energéticas. ⁽⁵⁹⁾

En un estudio conducido por Van der Windt y cols. ⁽⁵⁹⁾ se demostró que los linfocitos T CD8+ de memoria, a diferencia de los linfocitos *naïve* y efectoras, mantienen su capacidad respiratoria de repuesto (SRC) en las mitocondrias. La SRC es la capacidad mitocondrial capaz de producir energía bajo condiciones de aumento de trabajo o estrés y es importante para mantener la supervivencia celular y funcionalidad por periodos de tiempo largos. Datos presentados en este estudio sugieren que un aumento en la SRC permite a los linfocitos T de memoria sobrevivir y funcionar como células de larga vida y, además, depende de la habilidad de estas células de oxidar ácidos grasos en sus mitocondrias. Demostraron que la IL-15 es crítica para las células T CD8+ de memoria al inducir la biogénesis mitocondrial en los linfocitos T CD8+, fenómeno observado por el incremento de masa mitocondrial y la producción de la proteína mitocondrial carnitina palmitoiltransferasa 1A (CPT1a), la cual es clave en la utilización de ácidos grasos como fuente alternativa de energía.

En el estudio anterior también se demostró que el aumento de SRC a través del incremento de masa mitocondrial permite a los linfocitos T CD8+ de memoria responder más rápido al reencuentro con el antígeno, fenómeno demostrado al re-estimular a los linfocitos T CD8+ de memoria y efectoras con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, observando que los linfocitos T CD8+ de memoria aumentan la producción de ATP comparado con las células efectoras. ⁽⁵⁹⁾

2.2. Microambiente tumoral: hipoxia en cáncer y respuesta inmune.

La hipoxia (disminución de los niveles de oxígeno en los tejidos) es una condición a la que las células pueden enfrentarse en un proceso fisiológico y patológico. Un microambiente hipóxico puede originarse en sitios patológicos como tumores sólidos. En tumores sólidos, la incidencia de hipoxia es alta y está relacionada con fenotipos tumorales agresivos y metastásicos. Entre los tipos de cáncer en los que se ha reportado regiones hipóxicas está el carcinoma endometrial, cáncer de mama, de ovario, colón, linfoma y cáncer pulmonar de células no pequeñas. ^(20,64)

En las masas tumorales, la hipoxia puede surgir por diferentes mecanismos. El rápido crecimiento de tumores tiene una pobre distribución de vasos y/o bajo número de estos; además, la vasculatura tumoral contiene irregularidades como paredes vasculares anormales, deformaciones, torcimientos, etc., que pueden comprometer el abastecimiento de oxígeno a los tejidos. La proliferación aumentada de células tumorales afecta la difusión de oxígeno y nutrientes, creando regiones hipóxicas a lo largo del tumor. Además, el crecimiento del tumor por sí mismo puede ir seguido de la compresión de los vasos sanguíneos por la masa tumoral, impidiendo el abastecimiento de oxígeno. ^(12,64)

Las bajas tensiones de oxígeno afectan directamente los parámetros del microambiente tumoral como el pH, niveles de ácido láctico, factores de crecimiento y nutrientes. Cambios en estos parámetros por efecto de los bajos niveles de oxígeno tienen consecuencias en las células inmunes alterando su eficacia en la respuesta anti-tumoral. ^(23,64)

Los tumores hipóxicos son muy inmunosupresivos, modulando la respuesta inmune de forma directa o indirecta, al expresar moléculas inmunosupresivas, principalmente TGF- β o promover la infiltración de células mieloides supresoras (MSC), también productoras de TGF- β . ^(39,56,64)

Las células responden a un microambiente hipóxico al sensor los niveles de oxígeno a través de vías asociadas con factores inducibles por hipoxia HIF-1 α y HIF-2 α , y canales iónicos. En particular, los canales iónicos han mostrado ser

proteínas efectoras que transducen la detección de hipoxia en una respuesta funcional. Los linfocitos T expresan los canales Kv1.3, involucrados en la activación de las células T y la producción de citocinas. ⁽²⁰⁾

Los canales Kv1.3 controlan el potencial de membrana de los linfocitos T. Durante la proliferación de las células T, los canales Kv1.3 proveen la suficiente hiperpolarización para permitir el flujo de calcio requerido para la proliferación. El resultado del cambio negativo en el potencial de membrana plasmática genera la fuerza requerida para la entrada de calcio desde el espacio extracelular a través de los canales de Ca^{2+} (CRAC). ⁽²¹⁾

Chimote y cols. ⁽²⁰⁾ demostraron que la hipoxia crónica induce la disminución de la expresión y funcionalidad de la proteína Kv1.3 en células T, lo cual fue asociado con disminución de la proliferación de células T, sugiriendo que la hipoxia altera la biosíntesis y/o el transporte de los canales Kv1.3 a la membrana.

También se ha reportado que la hipoxia altera el patrón de citocinas. Los linfocitos T que sobreviven a la hipoxia alteran su patrón de citocinas, disminuyendo la producción de IL-2 e IFN- γ , moléculas requeridas para la respuesta eficiente de los linfocitos T citotóxicos. Sumado a esto, se ha encontrado que la hipoxia incrementa los niveles de proteínas pro-apoptóticas (BNIP3 y BAX) y disminuye los niveles de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-xl). ^(16,32,64)

Por otro lado, la liberación de ácido láctico y disminución de pH en tumores hipóxicos inhibe quimioatrayentes de leucocitos y afecta la proliferación y actividad de los linfocitos T, así como su respuesta a IL-2. ^(26,64)

Bajo condiciones de hipoxia, la cadena respiratoria en la mitocondria es menos eficiente, al punto de liberar ROS producidas por células tumorales y células estromales. Además, es bien conocido que los tumores hipóxicos reclutan un número alto de macrófagos y granulocitos, seguido de la hiperproducción de ROS, las cuales pueden inhibir la traslocación nuclear de NF- κ B y por lo tanto el switch para la producción de citocinas proinflamatorias. Adicionalmente, el estrés oxidativo promueve la degradación selectiva de componentes del complejo TCR-

CD3 como CD3 ζ ; por ejemplo, en presencia de H₂O₂ la función de los linfocitos T de memoria disminuye drásticamente, perdiendo su habilidad de secretar IL-2, TNF- α e IFN- γ después de su activación. ^(41,64)

Entre los mecanismos involucrados en la modulación de la actividad de los linfocitos T efectores, la hipoxia media la liberación al medio extracelular de adenosina, la cual actúa en los receptores inhibidores A2R, presentes en los linfocitos T. Se ha demostrado que niveles elevados de adenosina se correlacionan con discapacidad en la activación y funcionalidad de los linfocitos T. ^(41,64)

2.3. Muerte celular inducida por activación (AICD) en cáncer pulmonar

Se ha propuesto la inducción de la apoptosis de los linfocitos T como un mecanismo para comprometer la función antitumoral del sistema inmune y contribuir a la progresión tumoral. La activación crónica de los linfocitos T puede ir seguida del agotamiento de estas células. ⁽⁴⁷⁾

Un mecanismo involucrado en el agotamiento de los linfocitos T es la muerte celular inducida por activación (AICD, por sus siglas en inglés activation-induced cell death). En pacientes con cáncer se ha propuesto que la AICD media la apoptosis de los linfocitos T infiltrantes de tumores (TIL). En algunos modelos murinos y pacientes con cáncer, los linfocitos T CD8⁺ sufren AICD después de estimulación antígeno-tumor específica o estimulación policlonal. ⁽⁴⁷⁾

Nuestro grupo de trabajo describió previamente que en cáncer pulmonar, la población de linfocitos T CD8⁺ se encontró disminuida en derrame pleural comparado con muestras de derrame pleural no maligno. Además, demostraron que el fenotipo de memoria predominó en la población de linfocitos T CD8⁺. ⁽⁴⁴⁾

En otro estudio realizado por nuestro grupo de trabajo analizó los mecanismos involucrados en la disminución de la población de linfocitos T CD8⁺ en muestras de derrame pleural de pacientes con cáncer pulmonar, mostrando que esta población sufre AICD posterior a la estimulación con anticuerpo anti-CD3 y que este fenómeno se asoció al aumento en la expresión de moléculas FasL y TRAIL. ⁽⁴⁷⁾

Además, encontraron 2 subpoblaciones con base en la expresión de la molécula anti-apoptótica Bcl.2; el porcentaje de células T CD8+ que expresaban niveles altos de Bcl-2 se encontró disminuido, mientras que la población con niveles bajos de expresión de Bcl-2 se encontró aumentada. ⁽⁴⁷⁾

Estos resultados sugieren que los linfocitos T CD8+ provenientes de derrame pleural maligno sufren AICD, comprometiendo su función antitumoral. ⁽⁴⁷⁾

3. Justificación

Se ha reportado que en derrame pleural maligno se da la interacción entre células neoplásicas e inflamatorias, permitiendo que las células tumorales induzcan alteraciones en los linfocitos T CD8+. Este fenómeno se observó en derrames pleurales causados por cáncer pulmonar donde la población de linfocitos T CD8+ de memoria –fenotipo predominante-, presenta alteraciones en sus funciones efectoras, mientras que la subpoblación efectora se encuentra disminuida.

Un estudio previo realizado por nuestro grupo de trabajo demostró que los linfocitos T CD8+ se encontraron disminuidos en derrame pleural maligno, demostrando que éstos sufren AICD después de la estimulación. Al respecto se ha propuesto que las células tumorales inducen la apoptosis de los linfocitos T CD8+ como un mecanismo para comprometer la función antitumoral del sistema inmune. Asimismo, un estudio realizado en linfocitos T CD8+ provenientes de pacientes con HIV mostró que la población de células T CD8+ con alto contenido de masa mitocondrial fue más susceptible a sufrir apoptosis comparado con la población con baja masa mitocondrial.

Por tal motivo, en este estudio se determinó el contenido de masa mitocondrial en la población de linfocitos T CD8+ totales y en las subpoblaciones de células T CD8+ naive y memoria provenientes de derrame pleural maligno, sin y posterior a ser estimuladas vía TCR y coestimulación, en dos condiciones: normoxia (O₂ 21%) e hipoxia (O₂ 2%). De esta manera se observaron los cambios en el contenido de masa mitocondrial en estas subpoblaciones provenientes de un ambiente tumoral, con el fin de determinar si la masa mitocondrial se modificó en respuesta a los estímulos aplicados. En el presente trabajo se busca demostrar si las células T CD8+ naive y memoria de derrame pleural maligno presentan alteraciones en el contenido de masa mitocondrial y si este se relaciona con la susceptibilidad a sufrir apoptosis.

4. Hipótesis

Los linfocitos T CD8+ de derrame pleural maligno, que provienen de un ambiente en el que interaccionan con las células neoplásicas, presentarán alteraciones que no les permitirán modificar su masa mitocondrial en respuesta al estímulo vía TCR y coestimulación.

5. Objetivos

5.1. General

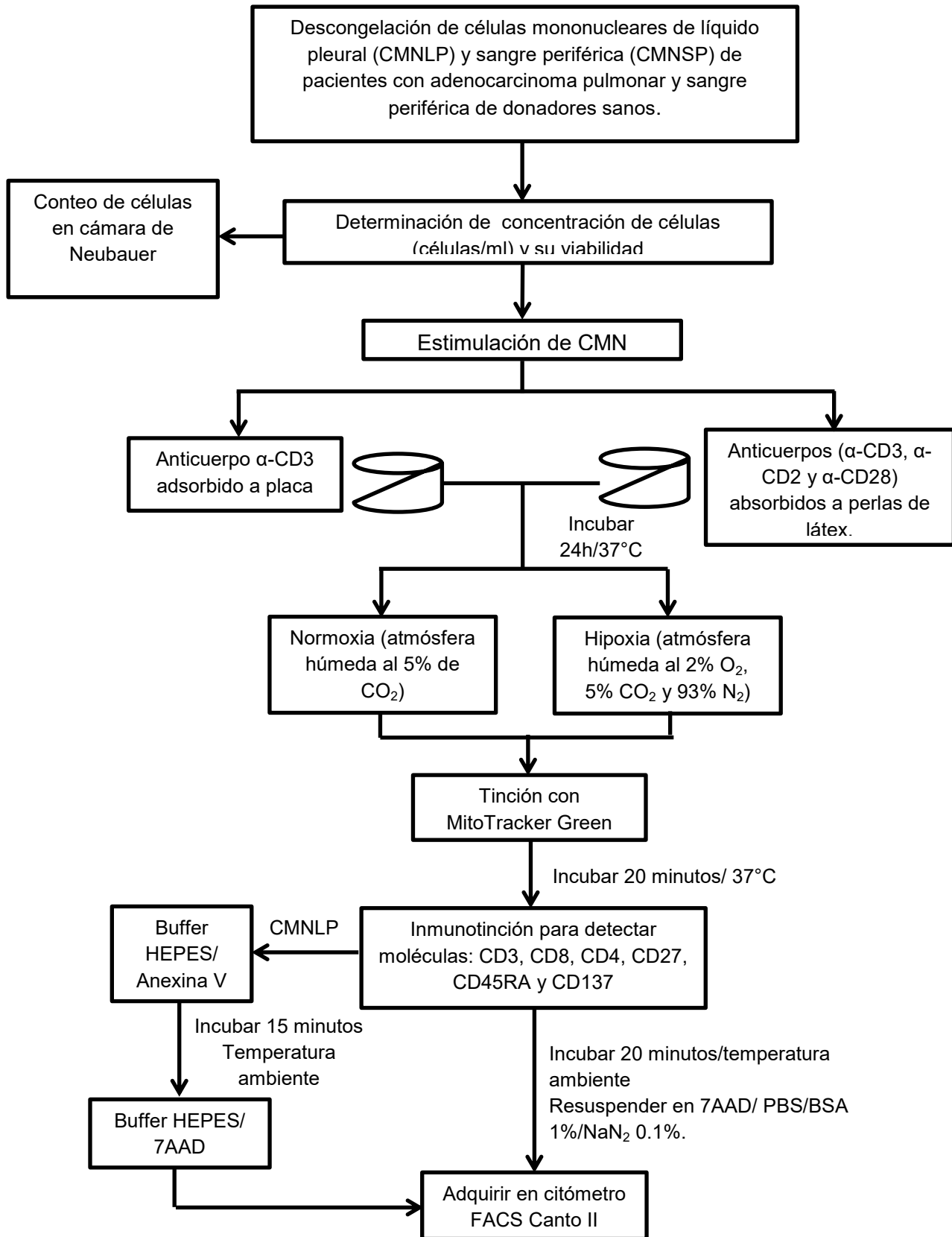
Analizar la masa mitocondrial en las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ provenientes de DP (derrame pleural) y SP (sangre periférica) de pacientes con cáncer pulmonar y SP de sujetos sanos en células sin estimular y posterior al estímulo con anticuerpo anti-CD3 y perlas acopladas con anticuerpos anti-CD2, anti-CD3 y anti-CD28.

5.2. Particulares

- i. Evaluar el porcentaje de células T CD4+ y CD8+, y la masa mitocondrial en dichas poblaciones en muestras de DP y SP de pacientes con cáncer pulmonar y SP de sujetos sanos.
- ii. Evaluar el porcentaje de linfocitos T CD8+ naive, memoria y efectoras.
- iii. Evaluar la masa mitocondrial en las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ naive, memoria y efectora.
- iv. Analizar la masa mitocondrial en las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ naive y memoria que expresan la molécula de activación CD137 posterior a ser estimuladas con anticuerpo anti-CD3 y perlas de activación en condiciones de normoxia e hipoxia
- v. Asociar la susceptibilidad a la apoptosis con el contenido de masa mitocondrial de linfocitos T CD8+ de derrame pleural maligno.

6. Materiales y Métodos

Estrategia Experimental



Población estudiada

Se incluyeron muestras de 18 pacientes diagnosticados con adenocarcinoma pulmonar, 3 pacientes con mesotelioma, 1 paciente con carcinoma de células pequeñas y 1 paciente con carcinoma epidermoide. De los pacientes se obtuvieron 15 muestras de líquido pleural y 12 muestras de sangre periférica, previo consentimiento informado. También se incluyeron 12 muestras de sangre periférica de donadores sanos.

Material biológico

Las células mononucleares (CMN) de sangre periférica (SP) y líquido pleural (LP) fueron descongeladas y lavadas en medio RPMI-1640 (Medio Roswell Park Memorial Institute-1640).

Estimulación de CMNLP y CMNSP

Las CMNLP y CMNSP se contaron en la cámara de Neubauer distinguiendo células muertas de las células vivas con un colorante supravital (azul de tripano), obteniendo la concentración de células y el porcentaje de viabilidad.

Las CMN se estimularon con anticuerpo anti-CD3 agonista (Anti-Human CD3 Functional Grade Purified, clona: UCHT1, eBioscience, USA) y con anticuerpos anti-CD2, anti-CD3 y anti-CD28 absorbidos a perlas de latex (kit T Cell Activation/Expansion Miltenyi Biotec, CA, USA) en placas de 96 pozos.

El anticuerpo anti-CD3 agonista se incubó en una placa de poliestireno de 96 pozos por 90 minutos a 37°C con una concentración de 10 µg/mL en un volumen final de 50 µL por pozo.

Para la preparación de las perlas se colocaron 25 µL de cada anticuerpo (anti-CD2, anti-CD3 y anti-CD28) marcados con biotina, posteriormente se adicionaron 250 µL de perlas de látex recubiertas con anti-Biotina (MACS Bead) y se agregaron 100 µL de PBS estéril (amortiguador salino de fosfatos). Finalmente, se incubó la preparación por 2 horas en agitación constante a una temperatura entre 2-8°C.

Para llevar a cabo la estimulación, la cantidad de CMNLP y CMNSP se ajustó a una concentración de 1×10^6 células/mL para el estímulo con anticuerpo anti-CD3 y 5×10^6 células/mL para el estímulo con perlas de activación (anticuerpo anti-CD2, anti-CD3 y anti-CD28) en un volúmen final de 200 μ L con el medio RPMI-1640. La cantidad de perlas de activación que se empleó para el estímulo de las CMNs se obtuvo de la relación de 25 μ L de perlas por mL de suspensión de células a una concentración de 5×10^6 células/mL.

Las CMN con los diferentes estímulos fueron incubados durante 24h en dos condiciones: normoxia e hipoxia. Las células en normoxia se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 21% O₂ y 5% de CO₂. Para las células en hipoxia se creó una atmosfera húmeda que contenía 2% O₂, 5% CO₂ y 93% N₂ y se incubaron en la cámara de incubación modular Billups-Rothenberg.

Tinción de CMNLP y CMNSP con MitoTracker Green FM

Después de 24h de estimulación, las CMNLP y CMNSP se recolectaron, se lavaron los pozos con un amortiguador salino de fosfatos (PBS 1x) y se colocaron las CMN en tubos Falcon de 5mL. Se preparó una solución stock de MitoTracker Green (Invitrogen, US) disolviendo el liofilizado en dimetilsulfóxido (DMSO) para una concentración 1mM; de la solución stock se realizó una disolución con PBS estéril (amortiguador salino de fosfatos) para una concentración 200nM en un volumen final de 200 μ L por tubo. Las CMNs se incubaron a esta concentración de Mitotracker Green por 20 minutos a 37° C en una atmosfera húmeda con 5% de CO₂. Después de este tiempo se lavó con PBS estéril para eliminar el exceso de MitoTracker Green y se procedió a realizar la inmunofenotipificación.

Inmunofenotipificación de CMNLP y CMNSP

Tabla 1. Anticuerpos empleados en inmunofenotipificación

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

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

Se preparó una mezcla de anticuerpos acoplados a diferentes fluorocromos para identificar las moléculas CD3, CD4, CD8, CD27, CD45RA y CD137 en un volumen final de 50 μ L por pozo. Se incubó por 20 minutos protegiendo de la exposición de la luz. Después de este tiempo se lavó con PBS/BSA 1%/NaN₂ 0.1% para eliminar el exceso de anticuerpos y las CMNs se resuspendieron en 200 μ L de una dilución de 7-amino actinomicina D (Biolegend, CA, USA), un agente intercalador del DNA fluorescente que permite discriminar las células vivas de las muertas. Se adquirieron las CMNs en el citómetro FACS Canto II (Becton Dickinson, CA, USA) con el programa FACS Diva. Los datos se analizaron con el software FlowJo versión 10.0.8.

Determinación de apoptosis

En algunas muestras provenientes de líquido pleural (CMNLP) se realizó el mismo procedimiento para estimular con anticuerpo anti-CD3 y perlas de activación. Posteriormente se hizo la tinción con MitoTracker Green y la inmunofenotipificación para los marcadores CD3, CD4, CD8 y CD137. Después del lavado con PBS/BSA 1%/NaN₂ 0.1% para quitar el exceso de anticuerpos, las CMNs se resuspendieron en 100 μ L de una mezcla de buffer HEPES/ Anexina V (Biolegend, CA, US), una proteína que se une al fosfolípido fosfatidilserina, el cual se encuentra en la cara intracelular de la membrana plasmática y durante la

apoptosis se trasloca a la cara externa de la membrana. Se incubó por 15 minutos protegiendo de la exposición de la luz. Después de este tiempo se agregó 100 μ L de una dilución de 7-amino actinomicina D. Se adquirieron las CMNs en el citómetro FACS Canto II (Becton Dickinson, CA, USA) con el programa FACS Diva. Los datos se analizaron con el software FlowJo versión 10.0.8.

Análisis de muestras por citometría de flujo

Las muestras fueron adquiridas a través del citómetro de flujo FACS Canto II, y los resultados fueron analizados por el programa FlowJo. Mediante el gráfico tamaño-área vs tamaño-altura se discriminaron los agregados y de la región correspondiente a células individuales, se graficó los parámetros intensidad de fluorescencia de la molécula 7AAD vs tamaño obteniendo la región de células viables. De la región de células 7 AAD-, se seleccionó mediante el gráfico tamaño vs granularidad la región de los linfocitos. De esta se seleccionó la población CD3+ en el gráfico intensidad de fluorescencia de la molécula CD3 vs granularidad. De la región de células CD3+ se seleccionó la población CD8+CD4- y CD8-CD4+ con el gráfico CD8 vs CD4, correspondientes a los linfocitos T CD8+ y CD4+ respectivamente.

De la población de linfocitos T CD8+ se graficó CD45RA vs CD27 para distinguir las subpoblaciones *naive* (CD27+CD45RA+), memoria (CD27+CD45RA-) y efectora (CD27-CD45RA+). A la población de linfocitos T CD4+ totales, CD8+ totales y sus diferentes subpoblaciones (*naive*, memoria y efectora) se determinó el porcentaje de células y la intensidad media de fluorescencia (MFI) de MitoTracker Green y CD137 para identificar si presentan cambios en la masa mitocondrial.

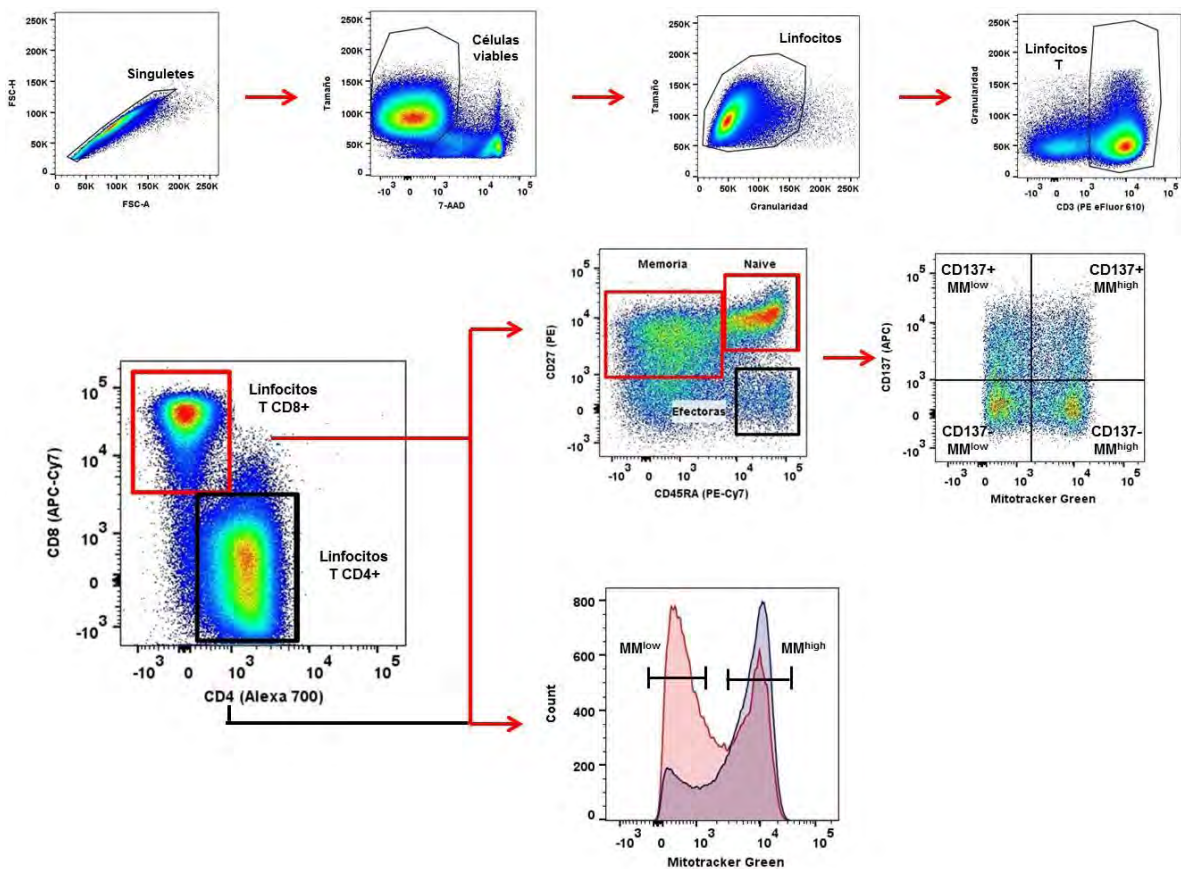
Análisis estadístico

Se determinó la distribución de las poblaciones estudiadas, mostrando una distribución normal; las comparaciones se realizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) con una $p < 0.05$ como nivel de significancia estadística. Para identificar en que grupos se produjeron diferencias se utilizó el test de

comparaciones múltiples Tukey con una $p < 0.05$ como nivel de significancia estadística.

7. Resultados

Figura 1. Análisis citométrico de la masa mitocondrial de CMNLP proveniente de un paciente con adenocarcinoma pulmonar. Las CMNLP fueron estimuladas con perlas de activación por 24 horas en condiciones de normoxia. Después de discriminar agregados celulares se seleccionó la región de células vivas (7AAD-) y de esta población a los linfocitos en función de su granularidad y tamaño. Se seleccionó la región de linfocitos T (CD3+) y de ésta se obtuvieron la población de linfocitos T CD4+ y CD8+. A partir de estas poblaciones, se determinó el porcentaje de células y la MFI de MitoTracker Green en cada una de ellas. De la población de linfocitos T CD8+ se obtuvieron las subpoblaciones *naive*, memoria y efectoras con base a los marcadores CD45RA y CD27, de las cuales se obtuvo el porcentaje de células y la MFI de MitoTracker Green. Además, de la población de linfocitos T CD8+ se obtuvo el porcentaje de células Anexina V+. De la población de células T CD8+ y CD4+ se obtuvo el porcentaje de células y la MFI de MitoTracker Green.



7.1. Análisis de la masa mitocondrial (MM) y el porcentaje de linfocitos T CD4 y CD8+

A partir de la población de linfocitos T se obtuvo el porcentaje de células T CD4+ y CD8+, así como la masa mitocondrial (MM) de cada población al realizar la determinación de la intensidad media de fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés median fluorescence intensity) del MitoTracker Green, la cual es directamente proporcional a la masa mitocondrial de los linfocitos. En el histograma se puede observar que los linfocitos T CD4+ y CD8+ presentan 2 poblaciones, una con alta masa mitocondrial (MM^{high}) y otra con baja masa mitocondrial (MM^{low}). (Ver Figura 2).

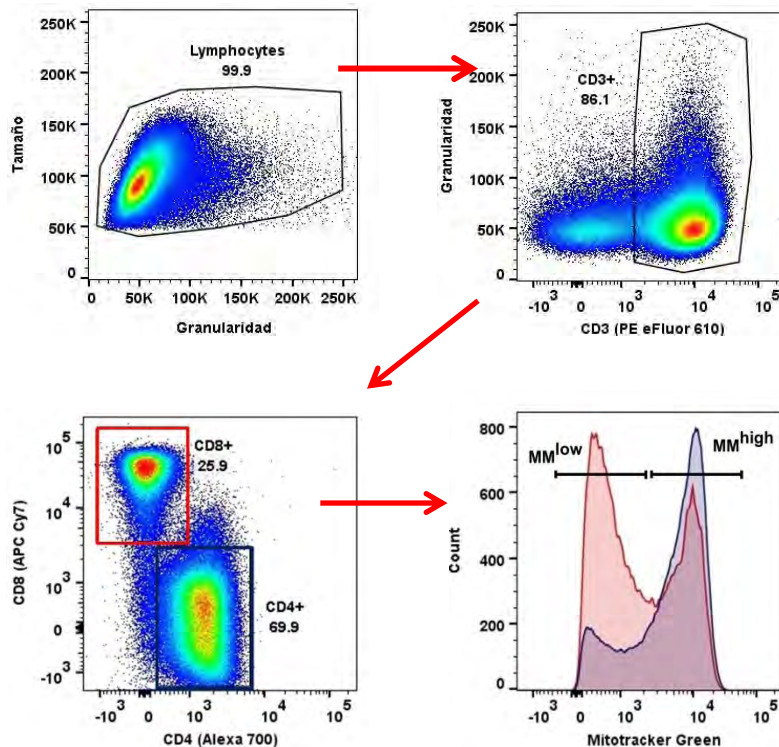


Figura 2. Análisis representativo para determinar el porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+ en una muestra de líquido pleural de un paciente con adenocarcinoma pulmonar. Se muestra a los linfocitos en función de sus características, tamaño vs granularidad; se seleccionó la región correspondiente a los linfocitos T (CD3+). A partir de la población de linfocitos T se determinó la región de linfocitos T CD8+ (cuadro rojo) y la región de linfocitos T CD4+ (cuadro azul). En el histograma se representa, en color rojo la masa mitocondrial de linfocitos T CD8+ y en color azul a los linfocitos T CD4+.

En derrame pleural (DP) de pacientes con cáncer pulmonar el porcentaje de linfocitos T CD8+ fue significativamente menor, mientras que el porcentaje de linfocitos T CD4+ fue significativamente mayor en comparación con las respectivas poblaciones en sangre periférica (SP) de pacientes con el mismo diagnóstico. No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células T CD4+ y CD8+ provenientes de SP de donadores sanos y pacientes con cáncer pulmonar (ver Figura 3A).

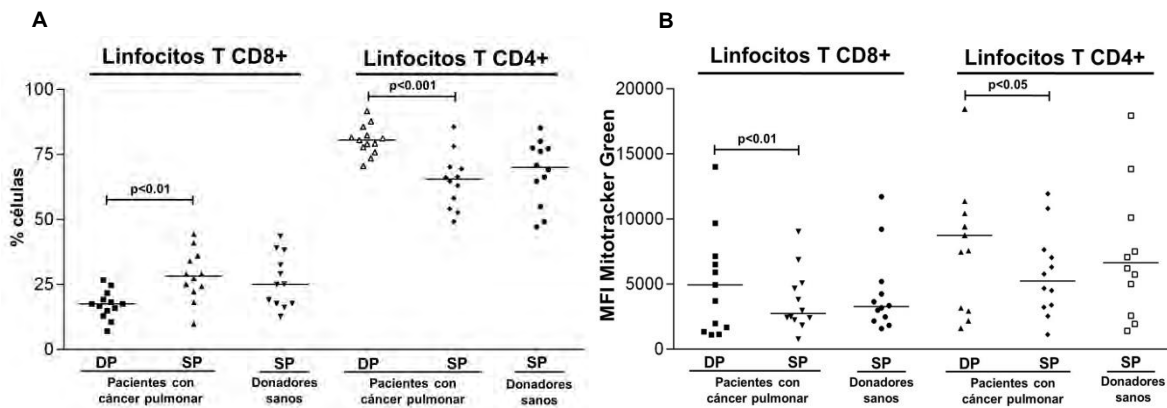


Figura 3. A) Porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+ en muestras de derrame pleural (n= 13) y sangre periférica (n= 12) de pacientes con cáncer pulmonar y muestras de sangre periférica de donadores sanos (n=12). **B)** Intensidad media de fluorescencia de MitoTracker Green correspondiente a la masa mitocondrial de los linfocitos T CD4+ y CD8+ de las tres muestras: derrame pleural (n= 13) y sangre periférica (n=12) de pacientes con cáncer pulmonar y sangre periférica de donadores sanos (n=12).

Posteriormente se analizó la masa mitocondrial de la población de linfocitos T CD4+ y CD8+. En las poblaciones de células T CD4+ y CD8+ de DP se observó mayor masa mitocondrial, medida como la MFI del MitoTracker Green comparado con las correspondientes poblaciones provenientes de SP de pacientes. Por otro lado, en las poblaciones provenientes de SP de donadores sanos y pacientes no se observaron diferencias significativas entre ellas (ver Figura 3B).

Estos resultados muestran que la población de linfocitos T CD8+ se encuentra disminuida en DP de pacientes con cáncer pulmonar, sin embargo esta población tiene mayor contenido de masa mitocondrial comparado con la correspondiente población proveniente de SP de pacientes.

7.2. Determinación de subpoblaciones *naive*, *memoria* y *efectoras* en linfocitos T CD8+

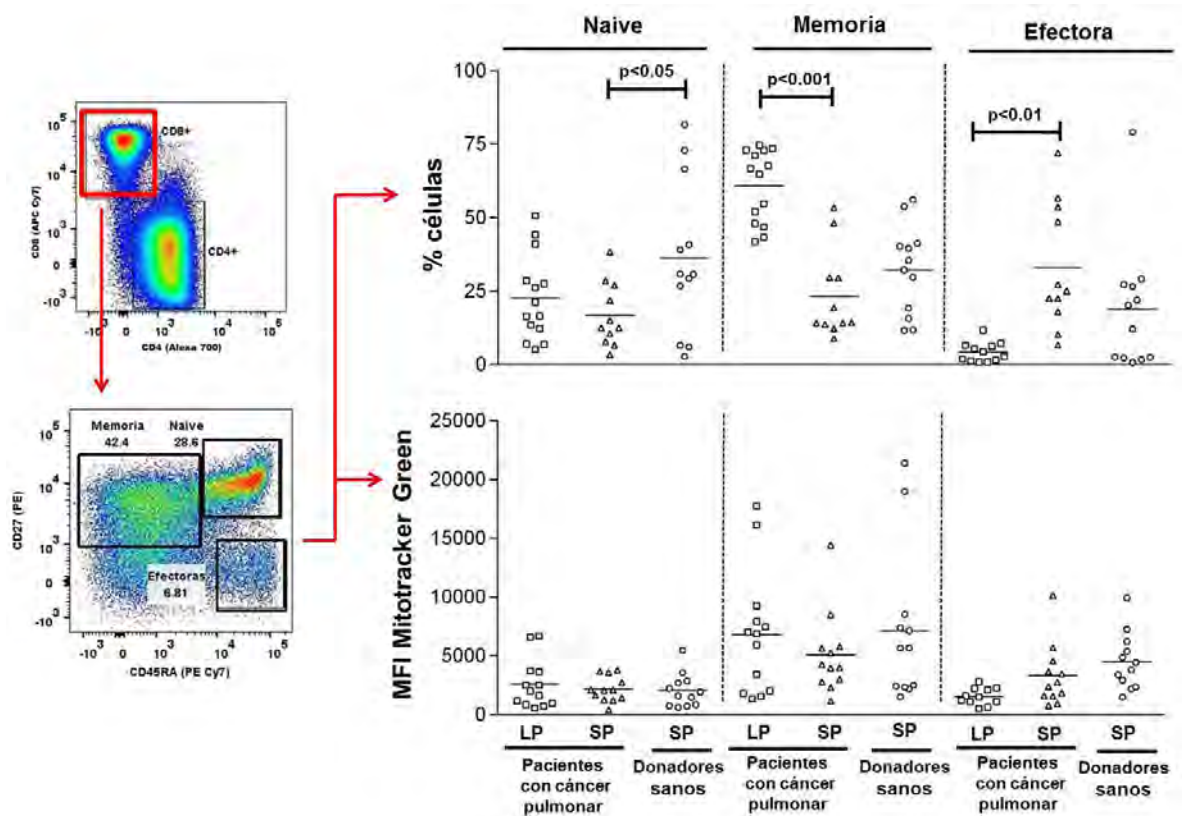


Figura 4. Determinación de subpoblaciones de linfocitos T CD8+. A partir de la población de linfocitos T CD8+, se utilizaron los marcadores CD45RA y CD27 obteniendo las subpoblaciones de células *naive*, *memoria* y *efectoras*. Se analizó el porcentaje de células y la masa mitocondrial en cada subpoblación proveniente de DP (n=14) y SP (n=12) de pacientes con cáncer pulmonar y SP (n=12) de donadores sanos.

A partir de la población de linfocitos T CD8+ se obtuvieron las subpoblaciones *naive*, *memoria* y *efectora* con base en los marcadores CD27 y CD45RA. Los resultados del porcentaje de células en cada subpoblación mostraron que el porcentaje de células de *memoria* fue significativamente mayor en linfocitos T CD8+ de derrame pleural, mientras que el porcentaje de células *efectoras* fue significativamente menor, ambos en comparación con las correspondientes subpoblaciones de linfocitos T CD8+ en SP de pacientes con cáncer pulmonar. Por otro lado, el porcentaje de células *naive* en SP de donadores sanos fue significativamente mayor en comparación con la misma subpoblación en SP de los pacientes (ver Figura 4).

Al analizar la masa mitocondrial en cada subpoblación, en general se observó que las células de memoria tienen mayor masa mitocondrial que las células *naive* y efectoras; además, al comparar la masa mitocondrial de cada subpoblación en los diferentes grupos de muestras no se encontraron diferencias significativas.

Estos resultados demuestran que la subpoblación de células T CD8+ de memoria se encuentra aumentada en DP de pacientes con cáncer pulmonar y la subpoblación efectora está disminuida. Por otro lado, las subpoblaciones *naive*, memoria y efectora tienen el mismo contenido de masa mitocondrial respecto a su correspondiente subpoblación al comparar DP y SP de pacientes con cáncer y SP de sujetos sanos.

7.3. Análisis de la masa mitocondrial (MM) en las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ estimulados: linfocitos T CD8+ naive

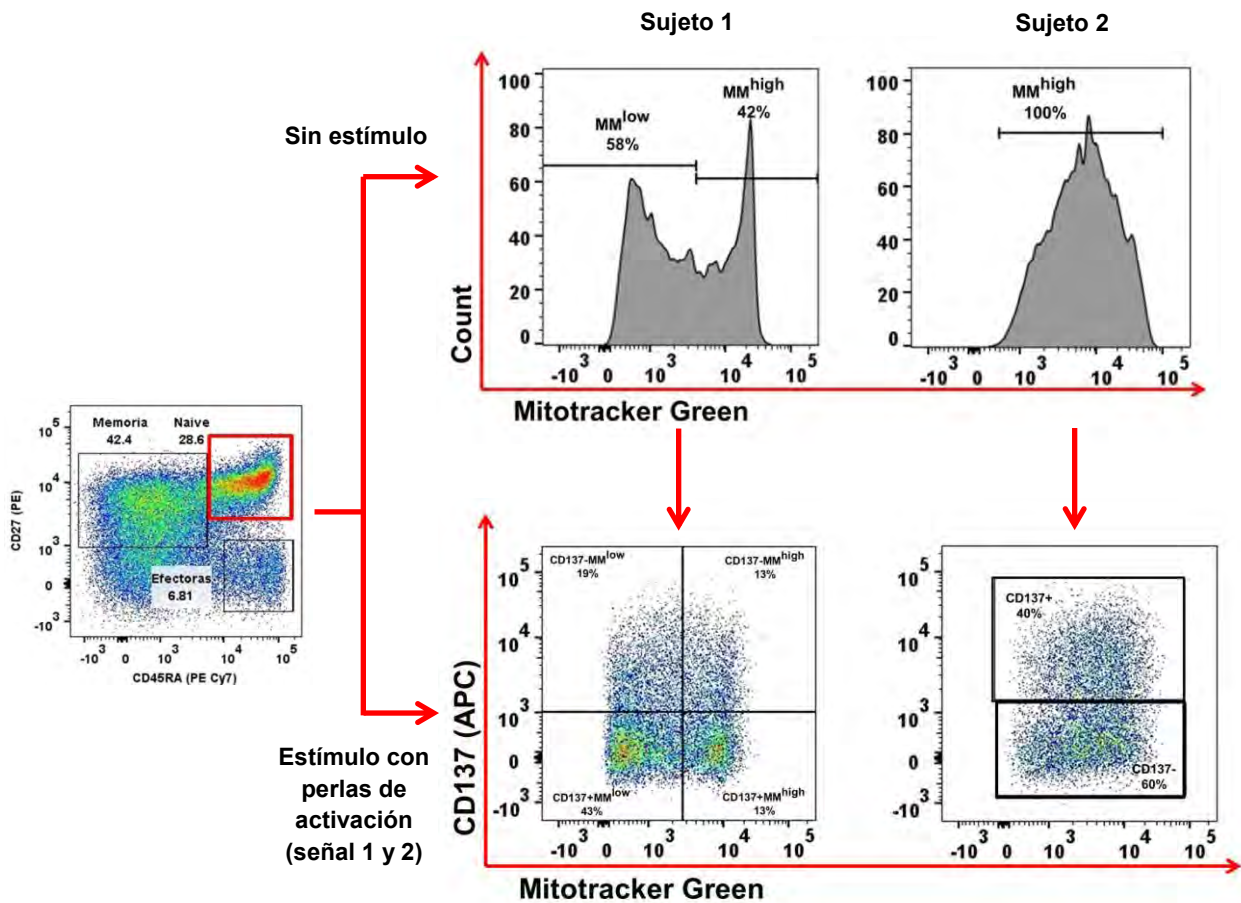


Figura 5. Análisis de la masa mitocondrial de linfocitos T CD8+ *naive* de DP de dos pacientes con cáncer pulmonar. A partir de la población de linfocitos T CD8+ se obtuvieron las subpoblaciones *naive* y memoria con base en los marcadores CD27 y CD45RA; de la población de linfocitos T CD8+ *naive* (CD45RA+CD27+) se determinó la masa mitocondrial. En células T CD8+ *naive* sin estimular, en algunos casos se observaron 2 poblaciones con base en el contenido de masa mitocondrial (MM^{high} y MM^{low}), mientras que en otros se observó una sola población con contenido homogéneo de masa mitocondrial, el cual fue clasificado de acuerdo con la MFI de MitoTracker Green en alguna de estas dos poblaciones. Las células se estimularon con anticuerpo antiCD3 (señal 1) o perlas de activación (señal 1 y 2) y posteriormente se determinó la masa mitocondrial y la expresión de la molécula CD137 como marcador de activación, mostrando en algunos casos cuatro subpoblaciones y en otras dos.

Posteriormente se determinó la MM de las células T CD8+ *naive*. En la población de linfocitos T CD8+ *naive* de DP de pacientes con cáncer, 3 de 9 muestras mostraron una sola población con contenido de masa mitocondrial homogéneo y el resto mostró 2 poblaciones, predominando en el 67% de los pacientes la población con MM^{low} (ver Figura 5).

En las células T CD8+ *naive* de SP de pacientes con cáncer, en 7 de 10 muestras se observó que el contenido de MM fue homogéneo, mientras que el resto mostró 2 poblaciones: MM^{high} y MM^{low}, predominando en el 60% de los pacientes la población MM^{high} (ver Figura 5).

Respecto a las células T CD8+ *naive* provenientes de SP de donadores sanos, en 5 de 10 muestras se observó una población con contenido de MM homogéneo, mientras que el resto de las muestras mostraron 2 poblaciones: MM^{high} y MM^{low}, predominando en el 80% de los donadores la población MM^{high} (ver Figura 5).

A partir de las subpoblaciones analizadas, se determinó la masa mitocondrial de las células *naive* estimuladas con anticuerpo antiCD3 (vía TCR) o perlas de activación (vía TCR y coestimulación). Con base en la expresión del marcador de activación (CD137) y el contenido de masa mitocondrial, las células que mostraron 2 poblaciones de acuerdo al contenido de masa mitocondrial (MM^{high} y MM^{low}), mostraron 4 subpoblaciones: CD137+MM^{low}, CD137+MM^{high}, CD137-MM^{low} y CD137-MM^{high}, mientras que en los casos donde sólo se observó una población con contenido homogéneo de masa mitocondrial, posterior al estímulo se obtuvieron 2 poblaciones: CD137+ y CD137-, las cuales de acuerdo al valor de MFI de MitoTracker Green se clasificó como MM^{high} o MM^{low} (ver Figura 5).

En la población de células T CD8+ *naive* con MM^{high} provenientes de SP de donadores sanos la masa mitocondrial fue significativamente menor cuando se estimuló con perlas de activación (señal 1 y 2), mientras que en la misma subpoblación proveniente de DP y SP de pacientes con cáncer no modificó su masa mitocondrial posterior al estímulo (ver Figura 6).

En la población de células T CD8+ *naive* con MM^{low} de SP de donadores sanos, la masa mitocondrial mostró tendencia a disminuir posterior al estímulo sin diferencias significativas, mientras que en la misma población en DP y SP de los pacientes con cáncer pulmonar, la masa mitocondrial incrementó cuando se

estimularon las células con anticuerpo anti-CD3 (señal 1) comparado con la misma población sin estímulo (ver Figura 6).

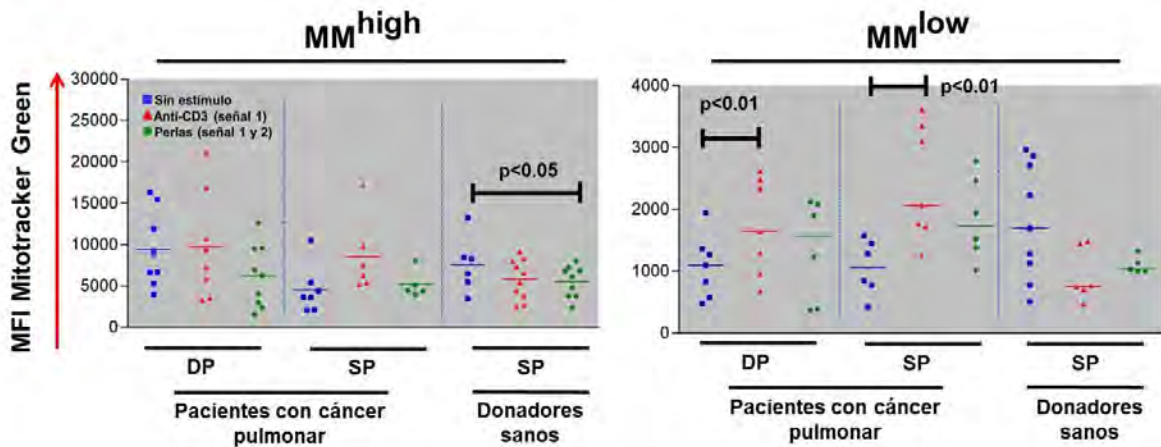


Figura 6. Linfocitos T CD8+ *naïve* CD137+ provenientes de DP (n=9) y SP (n=7) de pacientes con cáncer pulmonar y SP (n=10) de donadores sanos. Masa mitocondrial medida como la MFI de MitoTracker Green en población con MM^{high} (izquierda) y MM^{low} (derecha).

Dado que la hipoxia es una condición frecuente en los tumores sólidos como es el caso del carcinoma pulmonar de células no pequeñas, se evaluó el efecto de la hipoxia en la masa mitocondrial de los linfocitos T CD8+. Se comparó la masa mitocondrial de células activadas en hipoxia (2% O₂) respecto al mismo estímulo en normoxia (21% O₂). En la población de células T CD8+ *naïve* CD137+ de SP de donadores sanos, la subpoblación de células con MM^{high} mostró menor MM cuando se estimuló en hipoxia (ver Figura 7). En la misma población proveniente de SP de pacientes, el 60% de las muestras mostraron mayor porcentaje de células con el fenotipo MM^{high} y al colocarse en atmósfera de hipoxia, la masa mitocondrial disminuyó y esta población pasó a formar parte de la población con MM^{low} (datos no mostrados). Por otro lado, en la misma población proveniente de DP de pacientes con cáncer no se encontraron diferencias significativas en el contenido de masa mitocondrial posterior al estímulo en condiciones de hipoxia.

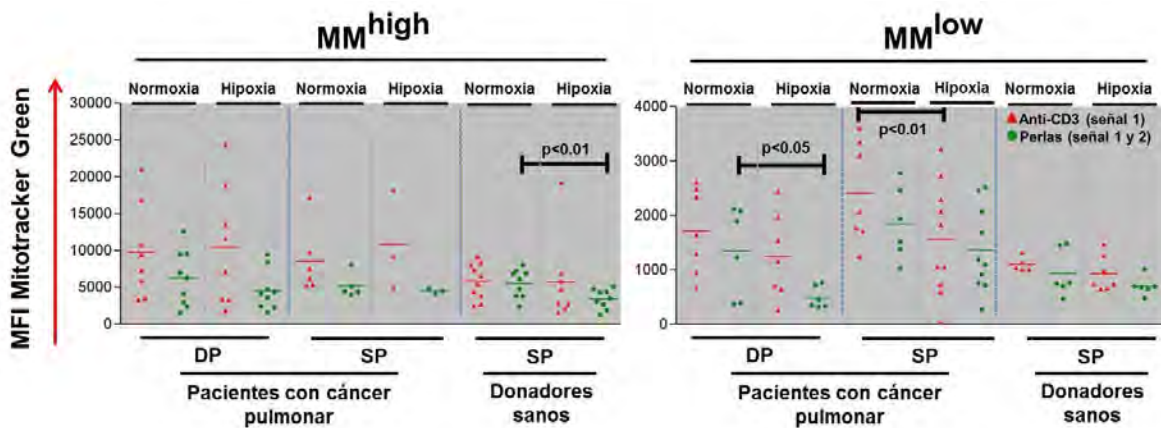


Figura 7. Linfocitos T CD8+ *naive* CD137+ con MM^{high} y MM^{low} proveniente de DP y SP de pacientes con cáncer y SP de donadores sanos. Masa mitocondrial medida como la MFI de MitoTracker Green en células activadas en condiciones de normoxia e hipoxia.

Con respecto a la subpoblación de células T CD8+ *naive* con MM^{low} de SP de donadores sanos, ésta no mostró diferencias significativas cuando se estimuló en condiciones de hipoxia respecto al mismo estímulo en normoxia, mientras que en la misma subpoblación proveniente de DP y SP de pacientes con cáncer pulmonar la masa mitocondrial en esta condición fue significativamente menor (ver Figura 7).

Estos resultados sugieren que los linfocitos T CD8+ *naive* con MM^{high} y MM^{low} provenientes de DP y SP de pacientes con cáncer pulmonar presentan alteraciones que no les permite modificar su masa mitocondrial en respuesta a los estímulos aplicados.

7.4. Análisis de la masa mitocondrial (MM) en las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ estimulados: células de memoria

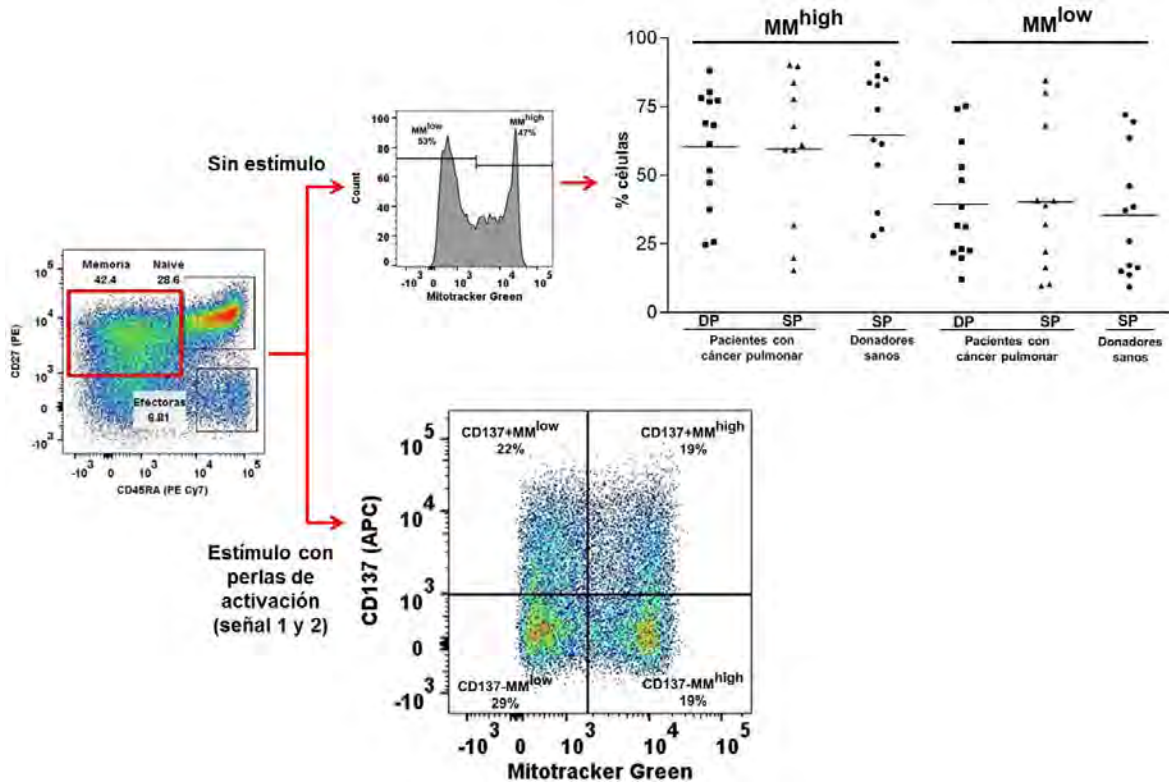


Figura 8. Análisis de la masa mitocondrial de linfocitos T CD8+ de memoria, provenientes de DP y SP de pacientes con cáncer pulmonar y SP de donadores sanos. En células de memoria (CD27+CD45RA-) sin estimular se observaron 2 poblaciones con base en el contenido de masa mitocondrial (MM^{high} y MM^{low}). Se estimularon las células con anticuerpo anti-CD3 (señal 1) o perlas de activación (señal 1 y 2), obteniendo cuatro subpoblaciones: CD137+MM^{low}, CD137+MM^{high}, CD137-MM^{low} y CD137-MM^{high}.

A partir de los linfocitos T CD8+ de memoria provenientes de DP y SP de pacientes con cáncer pulmonar y SP de sujetos sanos, se determinó la MM en las células sin estímulo. Se encontraron 2 subpoblaciones con base en el contenido de masa mitocondrial: MM^{high} y MM^{low}, predominando la subpoblación con fenotipo MM^{high} (ver Figura 8).

La masa mitocondrial, medida como la MFI de MitoTracker Green en la población de células T CD8+ de memoria con MM^{high} y MM^{low}, proveniente DP y SP de pacientes con cáncer y SP de donadores sanos no mostró diferencias significativas posterior al estímulo con anticuerpo anti-CD3 y perlas de activación. Sin embargo, al analizar el porcentaje de células T CD8+ de memoria con el

fenotipo MM^{high} en SP de donadores sanos, éste fue menor cuando se estimuló con perlas de activación (con la señal 1 y 2) respecto a la misma población sin estímulo, mientras que el porcentaje de la población con MM^{low} aumentó. Dicho fenómeno no se observó en la población de memoria con MM^{high} y MM^{low} de DP y SP de pacientes con cáncer pulmonar (ver Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de células T CD8+ de memoria con MM^{high} y MM^{low}, proveniente de DP y SP de pacientes con cáncer y SP de donadores sanos (promedio ± desviación estándar).

Estímulo	MM ^{high}			MM ^{low}		
	DP pacientes	SP pacientes	SP sujetos sanos	DP pacientes	SP pacientes	SP sujetos sanos
Sin estímulo	60.5±21.2	59.6±26.7	64.6±22.0	39.5±21.2	40.4±26.7	35.4±22.9
Anti-CD3 (señal 1)	56.0±22.1	59.5±23.4	63.8±24.2	44.0±22.1	40.5±23.4	36.2±24.2
Perlas (señal 1 y 2)	56.4±24.0	57.2±18.0	54.5±19.4*	43.6±24.0	42.8±18.0	45.4±19.4*

*p<0.05 respecto a células sin estímulo

Al evaluar el efecto de la hipoxia en la masa mitocondrial de las células T CD8+ de memoria, se encontró que esta población provenientes de SP de donadores sanos y pacientes, la subpoblación con fenotipo MM^{low} mostró menor masa mitocondrial respecto a las células bajo el mismo estímulo en condiciones de normoxia. Sin embargo, las células T CD8+ de memoria con MM^{low} proveniente de DP de pacientes con cáncer pulmonar, la masa mitocondrial no se modificó (ver Figura 9). En la subpoblación de células de memoria con MM^{high} en los tres grupos de muestras no se encontraron diferencias significativas en la masa mitocondrial cuando se estimularon en condiciones de hipoxia respecto a normoxia (datos no mostrados).

Estos datos indican que la subpoblación de linfocitos T CD8+ de memoria proveniente de DP de pacientes con cáncer no disminuyó la masa mitocondrial en respuesta a los estímulos aplicados.

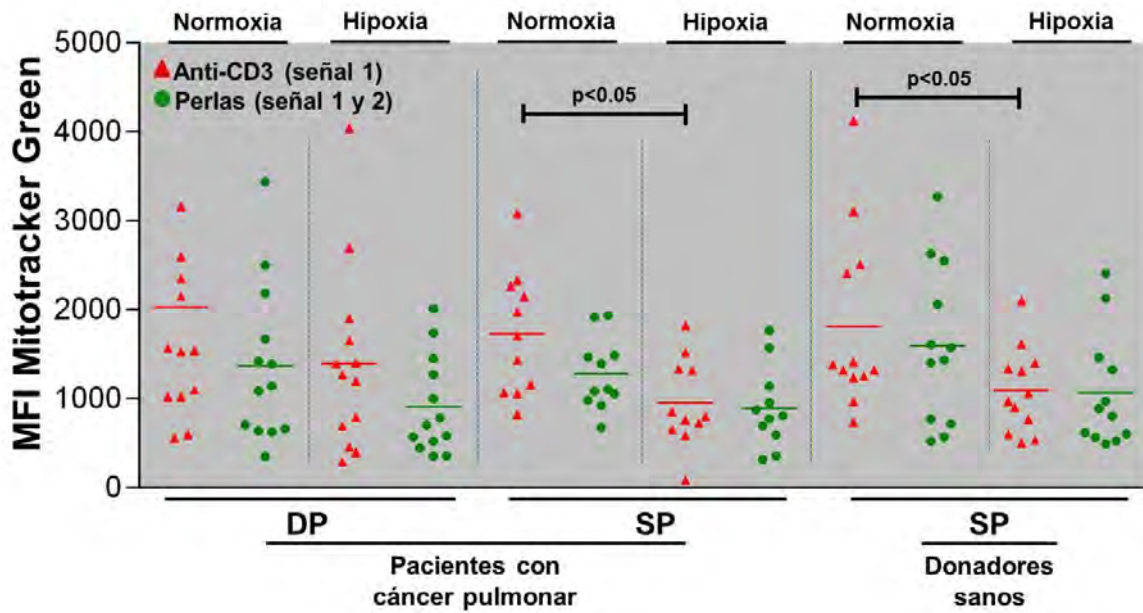


Figura 9. Linfocitos T CD8+ de memoria CD137+ con MM^{low} provenientes de DP y SP de pacientes con cáncer y SP de donadores sanos. Masa mitocondrial medida como la MFI de MitoTracker Green en células estimuladas en condiciones de normoxia e hipoxia.

7.5. Determinación de apoptosis

Petrovas C. y cols. ⁽⁴²⁾ relacionaron la susceptibilidad a la apoptosis con el contenido de masa mitocondrial en linfocitos T CD8+ de pacientes con VIH, por lo que se buscó determinar el porcentaje de células en apoptosis en las poblaciones con MM^{high} y MM^{low} de linfocitos T CD8+ provenientes de DP de pacientes con cáncer, utilizando el marcador de apoptosis temprana Anexina V.

Las células T CD8+ se estimularon con anticuerpo anti-CD3 (señal 1) o perlas de activación (señal 1 y 2) en condiciones de normoxia e hipoxia y posteriormente se determinó el porcentaje de células Anexina+. En las poblaciones con MM^{high} y MM^{low} se observó un mayor porcentaje de células Anexina V+ en la población CD137- estimuladas con la señal 1 y 2 (ver Figura 10), mientras que en las células CD137+ se observó la misma tendencia sin diferencias significativas (datos no mostrados).

Por lo tanto, nuestros resultados muestran que la susceptibilidad a la apoptosis se debió al estímulo aplicado (señal 1 y 2) y no al contenido de masa mitocondrial alto (MM^{high}) o bajo (MM^{low}), pues se obtuvieron porcentajes similares de células en apoptosis en ambas poblaciones.

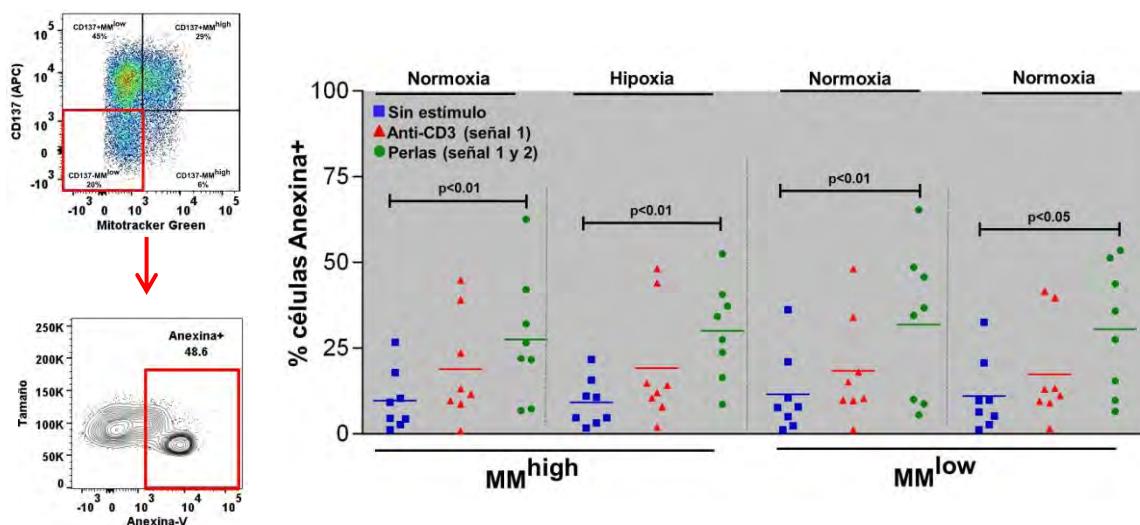


Figura 10. Porcentaje de linfocitos T CD8+ CD137- Anexina+, provenientes de DP de pacientes con cáncer pulmonar estimulados en condiciones de normoxia e hipoxia,

8. Discusión

Los linfocitos T CD8+ representan el principal componente de la respuesta inmune antitumoral, al tener la habilidad de reconocer y atacar a células que expresan péptidos no propios, como es el caso de las células tumorales. ^(8,44)

En derrame pleural maligno, un proceso inflamatorio frecuente en pacientes con adenocarcinoma pulmonar, se induce el reclutamiento de células en el espacio pleural permitiendo la interacción entre células neoplásicas e inflamatorias. El estudio de estas células *ex vivo* provee un modelo que nos permite estudiar el efecto de las alteraciones mediadas por las células tumorales en los linfocitos provenientes de derrame pleural. ^(47,50)

En derrame pleural maligno originado por cáncer pulmonar de células no pequeñas se observó disminución de la población de células T CD8+ mientras que la población de células T CD4+ se encontró aumentada. Estos resultados son similares a los descritos previamente por nuestro grupo de trabajo, donde se atribuye la disminución de la población de linfocitos T CD8+ a la susceptibilidad que presenta ésta a sufrir AICD (muerte celular inducida por activación), fenómeno que no se observó en SP de pacientes con cáncer, sugiriendo que en el compartimiento anatómico se da la muerte de células T CD8+. ⁽⁴⁷⁾

En cuanto a las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ en derrame pleural maligno, se observó una elevada proporción de células de memoria (CD45RA-CD27+), mientras que el fenotipo efector (CD45RA+CD27-) disminuyó significativamente, respecto a las correspondientes poblaciones provenientes de sangre periférica de pacientes con cáncer. Estos resultados son similares a los reportados en estudios previos, donde se han propuesto diferentes hipótesis para explicar dicho fenómeno: i) defectos en el reclutamiento de células efectoras; ii) las células efectoras entran rápidamente en apoptosis y iii) disminución de la expresión de la cadena ϵ , molécula que participa en la vía de traducción de señales por el receptor de las células T. ^(4,6,7,31,44,50)

Al analizar la masa mitocondrial, medida como la MFI de MitoTracker Green, en general la población de células T CD4+ mostró mayor masa mitocondrial que la población de células T CD8+. Estos resultados son similares a los reportados previamente por Cao Y. y cols. ⁽¹⁵⁾ donde se demostró que los linfocitos T CD4+ tienen mayor contenido mitocondrial que los linfocitos T CD8+ y que éste incrementa al activarse. Los autores asociaron esta diferencia con el uso de distintas vías metabólicas para mantener las funciones específicas de cada población, pues los linfocitos T CD4+ al activarse aumentan su metabolismo oxidativo mientras que los linfocitos T CD8+ aumentan la glucólisis aerobia. ⁽¹⁵⁾

En general las células de memoria mostraron mayor masa mitocondrial que las subpoblaciones naive y efectora; sin embargo, cuando se analizó la masa mitocondrial en cada subpoblación de linfocitos T CD8+ (*naive*, memoria y efectora) no encontramos diferencias significativas en cada subpoblación proveniente de los diferentes grupos cuando se compararon entre sí.

En este sentido, Van der Windt y cols. ⁽⁶⁰⁾ demostraron que las células T CD8+ de memoria de ratones infectados por *Listeria monocitogenes* contenían más mitocondrias que las células T *naive*, consistente con la capacidad respiratoria de repuesto (SRC) que presentan las células de memoria. En derrame pleural maligno, la población de linfocitos T CD8+ mostró mayor masa mitocondrial que la correspondiente población proveniente de SP de pacientes, fenómeno que relacionamos directamente con el alto porcentaje de células con el fenotipo de memoria.

No existen a la fecha reportes que estudien la masa mitocondrial en las poblaciones de células T CD8+ *naive* y memoria provenientes de derrame pleural de pacientes con cáncer pulmonar. En el presente trabajo, con el fin de determinar si la mitocondria está involucrada en las alteraciones producidas por las células tumorales en linfocitos T CD8+, se comparó la masa mitocondrial en las subpoblaciones naive y memoria de células T CD8+ provenientes de DP con las correspondientes subpoblaciones en SP de pacientes con cáncer pulmonar, con el propósito de determinar si las alteraciones presentes en los linfocitos T CD8+ se

deben al efecto local producido por la interacción directa con las células neoplásicas o por efectos sistémicos producidos por éstas.

La población de células T CD8+ *naive* y memoria, en general mostraron dos subpoblaciones con base en el contenido de masa mitocondrial, una con alta masa mitocondrial (MM^{high}) y otra con baja masa mitocondrial (MM^{low}).

Los linfocitos T CD8+ *naive* en reposo son metabólicamente quiescentes y utilizan la fosforilación oxidativa para producir energía, pero tras la activación por el TCR y la coestimulación, llevan a cabo un switch metabólico a través de la vía PI3K-Akt, incrementando el metabolismo de la glucosa vía glucólisis. Al analizar las poblaciones de linfocitos T CD8+ *naive* con MM^{high} y MM^{low} en SP de sujetos sanos, la masa mitocondrial disminuyó cuando se estimularon las células con la señal 1 (vía TCR) y 2 (coestimulación), fenómeno explicado por la utilización de otras vías metabólicas que no involucren a la mitocondria. ^(11,34,61) Al respecto, Addabbo F. y cols. ⁽²⁾ reportaron que la disminución de masa mitocondrial se asocia con la reducción de las enzimas aconitasa-2 y enoil-CoA-hidrolasa-1, claves en el ciclo de Krebs, promoviendo el switch metabólico glucolítico.

En la población de células T CD8+ *naive* con MM^{high} de DP y SP de pacientes con cáncer no se observó disminución significativa de la masa mitocondrial posterior al estímulo, fenómeno que se podría asociar con defectos en la vía PI3K-Akt, encargada de llevar a cabo el switch metabólico. ⁽³⁴⁾

Por otro lado, la población de células T CD8+ *naive* con MM^{low} de DP y SP de pacientes con cáncer pulmonar incrementó significativamente la masa mitocondrial posterior al estímulo. D'Souza y cols. ⁽²⁴⁾ reportaron que el incremento de masa mitocondrial puede o no ir acompañado de incremento en el mtDNA, es decir, aumento en el número de organelos, concluyendo que distintas vías regulan estos parámetros. Los autores asociaron el incremento de masa mitocondrial con vías relacionadas con el calcio, como es el caso de las vías calcineurina y CAMK, quienes participan en la activación de los linfocitos T. ⁽³⁸⁾ Con base en este estudio se sugiere que en las células T CD8+ *naive* con MM^{low} existe una

desregulación de estas vías incrementando la masa mitocondrial cuando no se requiere.

Asimismo, el incremento en la masa mitocondrial en estas células podría deberse al uso de la fosforilación oxidativa durante la activación por limitaciones en el metabolismo de la glucosa a través de la glucólisis aerobia y/o por defectos en la señalización para llevar a cabo el switch metabólico, lo cual, como demostraron Chang y cols. ⁽¹⁷⁾ y Sena y cols. ⁽⁵²⁾ compromete las funciones efectoras de las células T.

Del mismo modo que la subpoblación de células T CD8+ *naïve*, la subpoblación de memoria en estado de reposo utiliza la fosforilación oxidativa para la producción de ATP, pero al activarse promueve la glucólisis aerobia para soportar el crecimiento y proliferación celular, así como las funciones efectoras. ^(60,61)

Nuestros resultados muestran que en las células T CD8+ de memoria de sujetos sanos, la masa mitocondrial disminuyó posterior al estímulo, fenómeno observado por la disminución de la población con fenotipo MM^{high} y el aumento de la población con MM^{low}, lo cual podría deberse al uso de la glucólisis aerobia para soportar las demandas energéticas.

Al respecto, Van der Windt y cols. ⁽⁶⁰⁾ demostraron que la inducción de la glucólisis en las células T CD8+ de memoria depende de la asociación mitocondrial con la enzima hexocinasa (HK), reclutada hacia la mitocondria en respuesta a la activación de Akt durante la señalización por el TCR y la coestimulación para llevar a cabo el switch metabólico glucolítico. Esta enzima es la encargada de la conversión de glucosa a glucosa-6-fosfato en un proceso que requiere de ATP intramitocondrial, razón por la cual los autores especularon que la disponibilidad directa de ATP mitocondrial mantiene la rápida activación de HK cuando está asociada con la mitocondria. ⁽⁶⁰⁾

En las células T CD8+ de memoria provenientes de DP y SP de pacientes con cáncer pulmonar no se observó disminución de la masa mitocondrial posterior al estímulo, fenómeno que podríamos asociar con defectos en la inducción de la

glucólisis debido a alteraciones en la generación de ATP mitocondrial y/o en la asociación de la enzima HK con la mitocondria.

Por otro lado, se evaluó el efecto de la hipoxia en la masa mitocondrial de los linfocitos T CD8+ estimulados, con el objeto de determinar si las células podrían adaptarse a esta condición a la cual se enfrentan en situaciones patológicas como es el caso de tumores sólidos, en particular en cáncer pulmonar de células no pequeñas. Por lo tanto, determinamos si las células modificaron su masa mitocondrial al ser estimuladas en hipoxia del mismo modo que lo haría en normoxia.

Como resultado se observó que las células T CD8+ *naive* y memoria con MM^{high} de SP de sujetos sanos y pacientes mostraron menor masa mitocondrial cuando se estimularon en condiciones de hipoxia, comparado con el mismo estímulo en normoxia, fenómeno que podría deberse al uso de la glucólisis debido al switch metabólico y a la baja disponibilidad de oxígeno. Sumado a esto, Zhang H. y cols.⁽⁶⁵⁾ propusieron la autofagia mitocondrial (proceso en el cual la mitocondria es degradada catabólicamente vía lisosomal contribuyendo a la regeneración de metabolitos) como una respuesta metabólica adaptativa, con el fin de prevenir incremento en los niveles de producción de ROS y daño al mtDNA que lleven a la muerte celular bajo condiciones hipóxicas.⁽⁶⁵⁾

Estudios previos demostraron que uno de los mecanismos mediante los cuales las células responden a la reducción de oxígeno es a través de los canales iónicos dependientes de voltaje (kv), como es el caso de los canales Kv1.3.^(20,21) Al respecto, Chimote y cols.⁽²⁰⁾ demostraron que en linfocitos T CD8+ la hipoxia crónica, una condición a la que se enfrentan los linfocitos T CD8+ en presencia de tumores sólidos, media la disminución de los niveles de la proteína Kv1.3, quien además de participar como sensor de los niveles de oxígeno, actúa en la activación y proliferación de los linfocitos T.

Con base en estos trabajos nosotros proponemos que los linfocitos T CD8+ de memoria provenientes de DP de pacientes con cáncer, al provenir de un ambiente

hipóxico presentan disminuidos los niveles de la proteína Kv1.3 afectando la respuesta metabólica a la hipoxia.

En el caso de la población de linfocitos T CD8+ *naive* y memoria con MM^{low} de SP de sujetos sanos, la masa mitocondrial no se modificó al estimularse en condiciones de hipoxia respecto al mismo estímulo en normoxia, lo cual podría deberse a su bajo contenido de masa mitocondrial, suficiente para sobrevivir. Además, el fenotipo MM^{low} podría no producir grandes cantidades de ROS y daños al mtDNA, los cuales comprometan la supervivencia celular. ⁽⁶⁴⁾ El mismo fenómeno se observó en la población de linfocitos T CD8+ de memoria con MM^{low} provenientes de SP y DP de pacientes con cáncer pulmonar.

Por su parte, los linfocitos T CD8+ *naive* con MM^{low} provenientes de DP y SP de pacientes con cáncer disminuyeron significativamente su masa mitocondrial al estimularse en hipoxia respecto al mismo estímulo en normoxia. Estas células T CD8+ *naive* con MM^{low} aumentaron su masa mitocondrial cuando se estimularon con la señal 1 en condiciones de normoxia, mostraron mayor masa mitocondrial comparado con el mismo estímulo aplicado en la correspondiente población proveniente de SP de sujetos sanos, por lo que proponemos que en DP y SP de pacientes con cáncer se lleva a cabo la autofagia mitocondrial con el fin de promover la supervivencia celular.

Por último, Petrovas C. y cols. ⁽⁴²⁾ examinaron la posible relación de la mitocondria en la apoptosis de linfocitos T CD8+ en pacientes con HIV. Cuando analizaron la masa mitocondrial obtuvieron dos poblaciones, una exhibía alta masa mitocondrial (MM^{high}) y otra baja (MM^{low}), resultados similares a los obtenidos en este trabajo. Los autores encontraron que la población con MM^{high} presentó mayor susceptibilidad a la apoptosis, mostrando que la mitocondria actúa como amplificador de la apoptosis. ⁽³⁴⁾

Con base en este estudio, buscamos la relación entre el contenido de masa mitocondrial con la sensibilidad a la apoptosis en linfocitos T CD8+ provenientes de DP de pacientes con cáncer pulmonar. Encontramos que la población CD137-

estimulada con la señal 1 y 2 mostró mayor porcentaje de células Anexina V+, independientemente del contenido de masa mitocondrial. Estos resultados asocian la sensibilidad a la apoptosis con el estímulo aplicado más que con el contenido de masa mitocondrial, resultados que concuerdan con los reportados previamente por nuestro grupo de trabajo, donde se sugiere que el microambiente tumoral sensibiliza a los linfocitos T CD8+ de derrame pleural a sufrir AICD.⁽⁴⁷⁾

9. Conclusión

- ❖ Las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ *naïve* y memoria con MM^{high} provenientes de SP de sujetos sanos disminuyeron su masa mitocondrial al ser estimulados vía TCR y coestimulación; del mismo modo, estas subpoblaciones disminuyeron aún más su masa mitocondrial como respuesta metabólica a un ambiente hipóxico. Este fenómeno no se observó en las correspondientes subpoblaciones provenientes de DP de pacientes con cáncer pulmonar, lo cual podría comprometer el metabolismo y la funcionalidad del linfocito T CD8+.

10. Bibliografía

1. Abbas, Abul K. Lichtman, Andrew H. Pober, Jordan S. (2000). Cellular and Molecular Immunology. Cuarta edición.
2. Addabbo, F., Ratliff, B., Park, H. C., Kuo, M. C., Ungvari, Z., Csiszar, A., Krasnikov, B., Sodhi, K., Zhang, F., Nasjletti, A., Goligorsky, M. S. (2009). The Krebs cycle and mitochondrial mass are early victims of endothelial dysfunction: proteomic approach. *The American Journal of Pathology*, 174(1), 34-43.
3. Agalioti, T., Giannou, A. D., Stathopoulos, G. T. (2015). Pleural involvement in lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*, 7(6), 1021-1030.
4. Aguiar, L. M., Antonangelo, L., Vargas, F. S., Zerbini, M. C., Sales, M. M., Uip, D. E., Saldiva, P. H. (2008). Malignant and tuberculous pleural effusions: immunophenotypic cellular characterization. *Clinics*, 63(5), 637-644.
5. Albers, A. E., Schaefer, C., Visus, C., Gooding, W., DeLeo, A. B., Whiteside, T. L. (2009). Spontaneous apoptosis of tumor-specific tetramer+ CD8+ T lymphocytes in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. *Head & neck*, 31(6), 773-781.
6. Atanackovic, D., Block, A., de Weerth, A., Faltz, C., Hossfeld, D. K., Hegewisch-Becker, S. (2004). Characterization of Effusion-Infiltrating T Cells Benign versus Malignant Effusions. *Clinical Cancer Research*, 10(8), 2600-2608.
7. Balkwill, F. (2003). Chemokine biology in cancer. In *Seminars in immunology*. Academic Press.
8. Barry, M., Bleackley, R. C. (2002). Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nature Reviews Immunology*, 2(6), 401-409.
9. Boomer, J. S., Green, J. M. (2010). An enigmatic tail of CD28 signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(8), a002436.

10. Broere, F., Apasov, S. G., Sitkovsky, M. V., van Eden, W. (2011). A2 T cell subsets and T cell-mediated immunity. In Principles of immunopharmacology(pp. 15-27). Birkhäuser Basel.
11. Buck, M. D., O'Sullivan, D., Pearce, E. L. (2015). T cell metabolism drives immunity. *The Journal of Experimental Medicine*, 212(9), 1345-1360.
12. Cairns, R. A., Kalliomaki, T., Hill, R. P. (2001). Acute (cyclic) hypoxia enhances spontaneous metastasis of KHT murine tumors. *Cancer Research*, 61(24), 8903-8908.
13. Cannons, J. L., Lau, P., Ghumman, B., DeBenedette, M. A., Yagita, H., Okumura, K., Watts, T. H. (2001). 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. *The Journal of Immunology*, 167(3), 1313-1324.
14. Cano-Valle, F., Núñez-Pérez, R., Cardoso-Ramón, M., Lugo-Pérez, E., Colinabarranco-González, M., Barrios del Valle, R., Criales-Cortés, J. L. (1991). Pleura.
15. Cao, Y., Rathmell, J. C., Macintyre, A. N. (2014). Metabolic reprogramming towards aerobic glycolysis correlates with greater proliferative ability and resistance to metabolic inhibition in CD8 versus CD4 T cells. *PLoS ONE*, 9(8), e104104.
16. Carraro, F., Pucci, A., Pellegrini, M., Giuseppe Pelicci, P., Baldari, C. T., & Naldini, A. (2007). p66Shc is involved in promoting HIF-1 α accumulation and cell death in hypoxic T cells. *Journal of Cellular Physiology*, 211(2), 439-447.
17. Chang, C. H., Curtis, J. D., Maggi, L. B., Faubert, B., Villarino, A. V., O'Sullivan, D., Huang, S.C., van der Windt, G.J., Qui, J., Weber, J. D., Pearce, E.J., Jones, R.G., Pearce, E.L. (2013). Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell*, 153(6), 1239-1251.
18. Chen, L. (Ed.). (2007). *CD137 Pathway: Immunology and Diseases*. Springer.
19. Chen, L., Flies, D. B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology*, 13(4), 227-242.

20. Chimote, A. A., Kuras, Z., Conforti, L. (2012). Disruption of kv1. 3 channel forward vesicular trafficking by hypoxia in human T lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 287(3), 2055-2067.
21. Comes, N., Bielanska, J., Vallejo-Gracia, A., Serrano-Albarrás, A., Marruecos, L., Gómez, D., Soler, C., Condom, E., Ramon y Cajal, S., Hernández-Losa, J., Ferreres, J. C., Felipe, A. (2013). The voltage-dependent K (+) channels Kv1. 3 and Kv1. 5 in human cancer. *Frontier in Physiology*, 4, 283.
22. Cooper, G. M., Hausman, R. E. (2000). *The cell*. Sunderland: Sinauer Associates.
23. Dayan, F., Mazure, N. M., Brahim-Horn, M. C., Pouysségur, J. (2008). A dialogue between the hypoxia-inducible factor and the tumor microenvironment. *Cancer Microenvironment*, 1(1), 53-68.
24. 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.
25. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359-E386.
26. Fischer, K., Hoffmann, P., Voelkl, S., Meidenbauer, N., Ammer, J., Edinger, M., Gottfried, E., Schwarz, S., Rothe, G., Hoves, S., Renner, K., Timischl, B., Mackensen, A., Kunz-Schughart, L., Andreesen, R., Krause, S.W., Kreutz, M. (2007). Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*, 109(9), 3812-3819.
27. Fulda, S. (2010). Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. *International Journal of Cell Biology*, 2010.
28. Giaccia, A. J., Simon, M. C., Johnson, R. (2004). The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes & Development*, 18(18), 2183-2194.

29. Gupta, G. P., Massagué, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 127(4), 679-695.
30. Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
31. Hoffmann, T.K., Dworacki, G., Tsukihira, T., Meidenbauer, N., Gooding, W., Johnson, J.T., Whiteside, T.L. (2002). Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance. *Clinical Cancer Research*, 8(8), 2553-2562.
32. Kim, H., Peng, G., Hicks, J. M., Weiss, H. L., Van Meir, E. G., Brenner, M. K., Yotnda, P. (2008). Engineering human tumor-specific cytotoxic T cells to function in a hypoxic environment. *Molecular Therapy*, 16(3), 599-606.
33. Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(2), 69-90.
34. Jones, R. G., Thompson, C. B. (2007). Revving the engine: signal transduction fuels T cell activation. *Immunity*, 27(2), 173-178.
35. Kuss, I., Donnem, A.D., Gooding, W., Whiteside, T.L. (2003). Effector CD8⁺ CD45RO-CD27⁻ T cells have signalling defects in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *British Journal of Cancer*, 88(2), 223-230.
36. Lee, H. W., Park, S. J., Choi, B. K., Kim, H. H., Nam, K. O., Kwon, B. S. (2002). 4-1BB promotes the survival of CD8⁺ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1. *The Journal of Immunology*, 169(9), 4882-4888.
37. Lockhart, D. C., Chan, A. K., Mak, S., Joo, H. G., Daust, H. A., Carritte, A., Douville, C.C., Goedegebuure, P.S., Eberlein, T. J. (2001). Loss of T-cell receptor-CD3 ζ and T-cell function in tumor-infiltrating lymphocytes but not in tumor-associated lymphocytes in ovarian carcinoma. *Surgery*, 129(6), 749-756.
38. Manicassamy, S., Gupta, S., Huang, Z., Molkentin, J. D., Shang, W., Sun, Z. (2008). Requirement of calcineurin A β for the survival of naive T cells. *The Journal of Immunology*, 180(1), 106-112.

39. Ohnishi, S., Yasuda, T., Kitamura, S., Nagaya, N. (2007). Effect of Hypoxia on Gene Expression of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Mononuclear Cells. *Stem Cells*, 25(5), 1166-1177.
40. Oka, M., Yoshino, S., Hazama, S., Shimoda, K., Suzuki, T. (1993). The characterization of peritoneal and pleural exudate cells from malignant effusions. *Surgery Today*, 23(6), 500-503.
41. Palazón, A., Aragonés, J., Morales-Kastresana, A., de Landázuri, M. O., & Melero, I. (2012). Molecular pathways: hypoxia response in immune cells fighting or promoting cancer. *Clinical Cancer Research*, 18(5), 1207-1213.
42. Petrovas, C., Mueller, Y. M., Dimitriou, I. D., Altork, S. R., Banerjee, A., Sklar, P., Mounzer, K.C., Altman, J.D., Katsikis, P. D. (2007). Increased mitochondrial mass characterizes the survival defect of HIV-specific CD8+ T cells. *Blood*, 109(6), 2505-2513.
43. Porth, C. M. (2006). *Fisiopatología: salud-enfermedad: un enfoque conceptual*.
44. Prado-Garcia, H., Aguilar-Cazares, D., Flores-Vergara, H., Mandoki, J. J., Lopez-Gonzalez, J. S. (2005). Effector, memory and naive CD8+ T cells in peripheral blood and pleural effusion from lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer*, 47(3), 361-371.
45. Prado-Garcia, H., Romero-Garcia, S., Aguilar-Cazares, D., Meneses-Flores, M., Lopez-Gonzalez, J.S. (2012). Tumor-induced CD8+ T-cell dysfunction in lung cancer patients. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012:741741.
46. Prado-Garcia, H., Romero-Garcia, S., Lopez-Gonzalez, J. S. (2015). The Role of Exhaustion in Tumor-Induced T Cell Dysfunction in Cancer. In *Cancer Immunology* (pp. 61-75). Springer Berlin Heidelberg.
47. Prado-Garcia, H., Romero-Garcia, S., Morales-Fuentes, J., Aguilar-Cazares, D., Lopez-Gonzalez, J. S. (2012). 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(7), 1065-1080.

48. Romero-García, S., López-González, J. S., Báez-Viveros, J. L., Aguilar-Cazares, D., Prado-García, H. (2011). Tumor cell metabolism: an integral view. *Cancer Biology & Therapy*, 12(11), 939-948.
49. Ron-Harel, N., Sharpe, A. H., Haigis, M. C. (2014). Mitochondrial metabolism in T cell activation and senescence: a mini-review. *Gerontology*, 61(2), 131-138.
50. Scherpereel, A., Grigoriu, B. D., Noppen, M., Gey, T., Chahine, B., Baldacci, S., Trauet, J., Copin, M.C., Dessaint, J.P., Porte, H., Labalette, M. (2013). Defect in recruiting effector memory CD8+ T-cells in malignant pleural effusions compared to normal pleural fluid. *BMC Cancer*, 13(1), 1.
51. Schwarz, H., Arden, K., Lotz, M. (1997). CD137, a member of the tumor necrosis factor receptor family, is located on chromosome 1p36, in a cluster of related genes, and colocalizes with several malignancies. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 235(3), 699-703.
52. Sena, L. A., Chandel, N. S. (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular Cell*, 48(2), 158-167.
53. Shamas, M. A. (2011). Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 14(1), 28.
54. Shao, Z., Schwarz, H. (2011). CD137 ligand, a member of the tumor necrosis factor family, regulates immune responses via reverse signal transduction. *Journal of Leukocyte Biology*, 89(1), 21-29.
55. Sherr, C. J., McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer cell*, 2(2), 103-112.
56. Siemens, D. R., Hu, N., Sheikhi, A. K., Chung, E., Frederiksen, L. J., Pross, H., Graham, C. H. (2008). Hypoxia increases tumor cell shedding of MHC class I chain-related molecule: role of nitric oxide. *Cancer Research*, 68(12), 4746-4753.
57. Sikora, J., Zeromski, J. (2001). Expression of TCR-zeta chain and apoptosis in subpopulations of tumor-associated lymphocytes (TALs) from malignant pleural effusions. *Folia histochemica et cytobiologica/Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*, 40(4), 347-351.

58. Takata, H., Takiguchi, M. (2006). Three memory subsets of human CD8+ T cells differently expressing three cytolytic effector molecules. *The Journal of Immunology*, 177(7), 4330-4340.
59. van der Windt, G. J., 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.
60. van der Windt, G. J., O'Sullivan, D., Everts, B., Huang, S. C. C., Buck, M. D., Curtis, J. D., Chang, C.H., Smith, A.M., Ai, T., Faubert, B., Jones, R. G., Pearce, E.J., Pearce, E.L. (2013). CD8 memory T cells have a bioenergetic advantage that underlies their rapid recall ability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(35), 14336-14341.
61. Walker, M. A., Volpi, S., Sims, K. B., Walter, J. E., Traggiai, E. (2014). Powering the immune system: mitochondria in immune function and deficiency. *Journal of Immunology Research*, 2014:164309
62. Wallace, D. C. (2012). Mitochondria and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12(10), 685-698.
63. Whiteside, T. L. (1999). Signaling defects in T lymphocytes of patients with malignancy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 48(7), 346-352.
64. Yotnda, P., Wu, D., Swanson, A. M. (2010). Hypoxic tumors and their effect on immune cells and cancer therapy. *Immunotherapy of Cancer: Methods and Protocols*, 651, 1-29.
65. Zhang, H., Bosch-Marce, M., Shimoda, L. A., Tan, Y. S., Baek, J. H., Wesley, J. B., Gonzalez, F.J., Semenza, G. L. (2008). Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*, 283(16), 10892-10903.