



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN NRF-1 Y
NRF-2 EN LINFOCITOS T CD8+ PROVENIENTES DE DERRAME PLEURAL DE
PACIENTES CON ADENOCARCINOMA PULMONAR**

T E S I S

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

PRESENTA

ALEJANDRA PUERTO AQUINO



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2017



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:** **José Sullivan López González**

VOCAL: **Profesor:** **Claudia Teresa Tovar Palacio**

SECRETARIO: **Profesor:** **Heriberto Prado García**

1er. SUPLENTE: **Profesor:** **Julio César Martínez Álvarez**

2º SUPLENTE: **Profesor:** **Octavio Castro Escamilla**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE CÁNCER PULMONAR. DEPARTAMENTO DE ENFERMEDADES CRÓNICO-DEGENERATIVAS DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS “ISMAEL COSÍO VILLEGAS”

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Heriberto Prado García

SUSTENTANTE:

Alejandra Puerto Aquino

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
<i>1.1 Cáncer.....</i>	<i>1</i>
Autosuficiencia proliferativa	1
Insensibilidad a las señales de inhibición de la proliferación	2
Evasión de la apoptosis	2
Potencial replicativo ilimitado.....	3
Angiogénesis sostenida	3
Activación de la invasión y metástasis.....	4
Reprogramación metabólica	4
Evasión del sistema inmune	4
<i>1.2 Cáncer pulmonar.....</i>	<i>5</i>
1.2.1 Patogénesis	5
1.2.2 Clasificación del cáncer pulmonar	6
1.2.3 Derrame pleural	6
1.2.4 Derrame pleural maligno.....	7
<i>1.3 Linfocitos T CD8⁺</i>	<i>8</i>
1.3.1 Activación de la célula T	8
1.3.2 Diferenciación	10
1.3.3 Linfocitos T CD8 ⁺ en cáncer pulmonar	12
1.3.4 Evasión del cáncer pulmonar a los linfocitos T CD8 ⁺	13
<i>1.4 Mitocondria.....</i>	<i>15</i>
1.4.1 Biogénesis mitocondrial	17
2. ANTECEDENTES	20
<i>2.1 NRF-1 y NRF-2 en procesos de división y diferenciación celular.....</i>	<i>20</i>
<i>2.2 Cambio de metabolismo del linfocito T CD8⁺ durante la activación y diferenciación celular</i>	<i>23</i>
<i>2.3 Participación de la mitocondria en la activación de la célula T.....</i>	<i>25</i>

2.4 Alteraciones de los linfocitos T CD8 ⁺ en cáncer pulmonar	27
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. HIPÓTESIS	31
5. OBJETIVOS.....	31
5.1 General	31
5.2 Particulares.....	31
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	32
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
8. RESULTADOS.....	41
8.1 Inmunofenotipificación de las fracciones de linfocitos T CD8 ⁺ purificados por citometría de flujo.....	41
8.2 Estimulación de los linfocitos T CD8 ⁺ purificados	42
8.3 Estandarización de la técnica inmuno-PCR para las proteínas: actina, NRF-1 y NRF-2.....	44
8.4 Cuantificación relativa de las proteínas NRF-1 y NRF-2 en muestras de derrame pleural y sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma pulmonar y sangre periférica de sujeto sano.....	49
9. DISCUSIÓN	52
10. CONCLUSIONES	58
11. BIBLIOGRAFÍA	59

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

Tabla 1. Porcentaje de linfocitos T CD8 ⁺ después de la purificación de muestras de sangre de sujetos y derrame pleural de sujetos sanos y pacientes con cáncer pulmonar.....	42
Tabla 2. Porcentaje de linfocitos T CD137 ⁺ después de la estimulación con anticuerpo policlonal anti-CD3.....	44

Figuras

Figura 1. Complejo TCR/CD3	9
Figura 2. Regulación de la función y biogénesis mitocondrial orquestada por PGC-1 α	19
Figura 3. Comparación entre el metabolismo de la célula T naive y la célula T durante la activación.....	25
Figura 4. Estrategia de análisis para la inmunofenotipificación de las subpoblaciones de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ por citometría de flujo	41
Figura 5. Cambios morfológicos de los linfocitos T CD8 ⁺ después de haber sido estimulados con anticuerpo anti-CD3 por 48 horas (10X).....	42
Figura 6. Inmunofenotipificación de los linfocitos T sin estímulo y estimulados con anti-CD3	43
Figura 7. Prueba de proximidad del anticuerpo anti-actina	45
Figura 8. Inmuno-PCR para la detección de la proteína actina a partir de un lisado de la línea celular A-427 utilizando una concentración de 20 cels/ μ l y 100 cels/ μ l.....	47
Figura 9. Inmuno-PCR para la determinación de la concentración óptima de lisado celular proveniente de derrame pleural de paciente con adenocarcinoma pulmonar.....	48
Figura 10. Expresión relativa de las proteínas NRF-2 y NRF-2 en linfocitos T CD8 ⁺ sin estímulo	50
Figura 11. Expresión relativa de las proteínas NRF-1 y NRF-2 en linfocitos T CD8 ⁺ estimulados con anti-CD3.....	51

ABREVIATURAS

AICD	Muerte celular inducida por activación
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
APC	Célula presentadora de antígeno profesional
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
CMN-DP	Células mononucleares de derrame pleural
CMN-SP	Células mononucleares de sangre periférica
CTLs	Linfocitos T citotóxicos
COX	Citocromo c oxidasa
FADH2	Flavín adenín dinucleótido o dinucleótido de flavina y adenina reducido
FasL	Ligando de Fas
FAO	Oxidación de ácidos grasos
HIF-1	Factor Inducible a Hipoxia
ITAM	Motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
NADH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido reducido
NFAT	Factor Nuclear de células T activadas
NF-kB	Factor Nuclear kappa B
NRF	Factor Nuclear Respiratorio
NSCLC	Carcinoma pulmonar de células no pequeñas
MDSCs	Células supresoras derivadas de la línea mieloide
mtDNA	DNA mitocondrial
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PDHK	Piruvato deshidrogenasa cinasa
PGC-1	Coactivador 1 del receptor activado de proliferación de los peroxisomas- γ
PI3K	Cinasa de fosfatidil inositol 3
PPAR	Receptores activados de proliferación de los peroxisomas
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SRC	Capacidad mitocondrial de repuesto
SCLC	Carcinoma pulmonar de células pequeñas
TCR	Receptor de la célula T
TFAM	Factor de transcripción mitocondrial A
TGF- β	Factor de crecimiento transformador
TILs	Células T infiltrantes del tumor
TNF	Factor de necrosis tumoral
TORC1	Coactivador transcripcional regulado por CREB
Treg	Linfocitos T reguladores
VHL	Proteína von Hippel-Lindau
Zap-70	Proteína cinasa asociada a la cadena Zeta

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte en naciones industrializadas. En el año 2012, a nivel mundial se reportaron 14.1 millones de casos nuevos de cáncer y 8.2 millones de muertes por esta enfermedad.^[1]

El cáncer es una enfermedad genética que surge de un proceso evolutivo donde células somáticas adquieren múltiples mutaciones con las que sobrepasan las barreras que normalmente limitan su expansión descontrolada. Los cambios en la célula que dirigen su transformación hacia un fenotipo maligno incluyen mutaciones de ganancia de función que activan oncogenes, de pérdida de función que inactivan genes supresores de tumores y mutaciones que inactivan genes de estabilidad, es decir, aquellos responsables de la recombinación mitótica y la segregación cromosomal.^[2, 3]

Durante la evolución progresiva hacia el estado neoplásico, las células normales adquieren un conjunto de capacidades biológicas que les permiten volverse tumorigénicas y en última instancia, malignas. Dichas capacidades biológicas se denominan “Hallmarks” y se han establecido ocho de éstos: 1) autosuficiencia proliferativa, 2) insensibilidad a las señales de inhibición de la proliferación, 3) evasión de la apoptosis, 4) potencial replicativo ilimitado, 5) angiogénesis sostenida, 6) activación de la invasión y metástasis, 7) reprogramación metabólica y 8) evasión del sistema inmune.^[4]

1) Autosuficiencia proliferativa

Las células cancerosas pueden producir factores de crecimiento que son reconocidos por sus receptores sobre las mismas células, estimulando su proliferación de forma autócrina. Alternativamente, las células cancerosas pueden enviar señales de estimulación a las células que forman parte del estroma asociado al tumor para que éstas secreten distintos factores de crecimiento. Por otro lado, la señalización de los receptores puede ser desregulada elevando los

niveles de proteínas receptoras en la superficie celular o bien, puede derivar de la activación constitutiva de alguno de los componentes de las vías de señalización.^[4]

2) Insensibilidad a las señales de inhibición de la proliferación

La mayoría de los mecanismos de regulación negativa de la proliferación celular dependen de la acción de genes supresores de tumores. Dos de las proteínas más importantes codificadas por estos genes son las proteínas RB y p53. RB integra señales tanto del interior como del exterior de la célula y en respuesta decide si la célula debe proceder con el ciclo de crecimiento y división. Por otro lado, p53 recibe señales de estrés y sensores de actividad de los oncogenes, con lo que decide si es necesario detener la progresión del ciclo celular, o en caso de daño irreparable, desencadenar la apoptosis.^[4]

Las células cancerosas con defectos en la función de la vía RB, carecen de la función de este regulador del ciclo celular, cuya ausencia permite la proliferación celular persistente.

3) Evasión de la apoptosis

La inducción de la apoptosis está controlada por un balance entre los miembros pro y antiapoptóticos de la familia de proteínas reguladoras Bcl-2. Los inhibidores de la apoptosis Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, y A1 actúan en gran medida uniéndose y suprimiendo a las proteínas proapoptóticas Bax y Bak (embebidas en la membrana externa mitocondrial). Las células cancerosas generan una variedad de estrategias para evadir la apoptosis, la más común es la pérdida de función del gen supresor de tumores TP53, el cual induce la apoptosis mediante la regulación positiva de las proteínas Noxa y Puma (familia BH3-only). Alternativamente, las células tumorales también pueden aumentar la expresión de proteínas antiapoptóticas o de señales de supervivencia como el factor de crecimiento parecido a la insulina (Igf1/2), regular negativamente factores proapoptóticos o interrumpir la señalización de la vía extrínseca de la apoptosis.^[4]

4) Potencial replicativo ilimitado

Los telómeros son segmentos de DNA no codificante compuestos de múltiples repeticiones en tándem que protegen los extremos de los cromosomas. La longitud telomérica de una célula dicta cuantos ciclos de crecimiento y división pueden ocurrir antes de que los telómeros sean altamente erosionados y pierdan su función protectora, después de lo cual se desencadena la entrada a un estado de crisis. El potencial replicativo ilimitado de las células se ha atribuido a la habilidad de mantener la longitud del DNA telomérico lo suficiente como para evitar entrar a senescencia o apoptosis, lo anterior se logra principalmente mediante la regulación positiva de la enzima telomerasa, la cual se encuentra casi ausente en células normales pero expresada a niveles funcionales en aproximadamente el 90% de las células inmortalizadas.^[4]

5) Angiogénesis sostenida

La angiogénesis se define como el proceso de generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos pre existentes. En la vida adulta este proceso sólo ocurre transitoriamente durante procesos de cicatrización de heridas o como parte del ciclo reproductivo femenino. Sin embargo, durante la progresión tumoral ocurre un “switch angiogénico” que causa que la vasculatura normalmente quiescente genere brotes de nuevos vasos que ayudan a sustentar el crecimiento neoplásico en expansión. El switch angiogénico está gobernado por el balance de factores inductores e inhibidores de la angiogénesis, entre los factores mejor caracterizados se encuentran el Factor de crecimiento de endotelio vascular-A (VEGF-A) y la trombospondina-1 (TSP-1) respectivamente. Sin embargo, los vasos sanguíneos generados por los tumores son típicamente aberrantes: la neovasculatura del tumor se caracteriza por vasos distorsionados y agrandados, flujo sanguíneo irregular, presencia de microhemorragias y niveles anormales de proliferación y apoptosis de las células endoteliales.^[4, 5]

6) *Activación de la invasión y metástasis*

Estos procesos involucran una serie de cambios biológicos que incluyen: la invasión local, intravasación de las células malignas a vasos sanguíneos y linfáticos cercanos, el tránsito de las células cancerosas a través de los sistemas linfático ó sanguíneo, seguido del escape de las células de la luz de los vasos al parénquima o tejidos distantes (extavasación), la formación de pequeños nódulos de células malignas (micrometástasis) y finalmente el crecimiento de las lesiones micrometastásicas a tumores macroscópicos (colonización).^[4]

El proceso de Transición Epitelio-Mesénquima (EMT por sus siglas en inglés) se ha visto implicado en estos procesos. Un conjunto de factores de transcripción pleiotrópicos que incluyen Snail, Slug, Twist y Zeb1/2 orquestan la EMT y los procesos migratorios relacionados durante la embiogénesis. Dichos factores transcripcionales se encuentran expresados en distintas combinaciones en un gran número de tumores malignos.^[4]

7) *Reprogramación metabólica*

Otto Warbug fue el primero en observar que incluso en presencia de oxígeno, las células cancerosas pueden reprogramar el metabolismo de la glucosa, empleando principalmente la glicólisis, a dicho proceso se le conoce como glicólisis aeróbica o efecto Warbug. El incremento de la vía glicolítica permite que sus diversos intermediarios sean metabolizados por otras vías biosintéticas, lo que facilita la biosíntesis de macromoléculas y organelos requeridos para la generación de nuevas células.^[3, 4]

8) *Evasión del sistema inmune*

El sistema inmune opera como una barrera significativa para la formación y progresión del tumor. Sin embargo, las células cancerosas pueden evadir la destrucción por parte del sistema inmune mediante distintos mecanismos. Por ejemplo, las células tumorales pueden inhibir a las células T citotóxicas (CTLs) infiltrantes y células NK mediante la secreción de TGF- β y otros factores

inmunosupresores.^[6] Otros mecanismos incluyen el reclutamiento de células inmunosupresoras como los linfocitos T reguladores (Tregs) o las células supresoras derivadas de la línea mieloide (MDSCs).^[7]

1.2 Cáncer Pulmonar

El cáncer de pulmón ha sido el tipo más común de cáncer en el mundo por muchas décadas, actualmente representa el 12.9% del total de los casos de cáncer reportados.^[1] A nivel mundial es el tipo más común de cáncer en hombres, representando el 16.7% del total de los casos y la causa más común de muerte por cáncer, estimando que es responsable de 1 de cada 5 muertes (19.4% del total). En México, ocupa el segundo lugar en frecuencia para los hombres y el quinto lugar para ambos sexos.^[1]

1.2.1 Patogénesis

El principal factor de riesgo para el desarrollo del cáncer pulmonar es el consumo del tabaco, aproximadamente entre 80-90% de los casos se presentan en fumadores.^[8] Otros factores de riesgo ocupacionales y ambientales comunes incluyen la exposición a asbestos, radón, arsénico, cromo, níquel, vinilo y la radiación ionizante.^[9] Los carcinógenos, una vez activados en el organismo se unen al DNA y forman aductos que generan mutaciones, especialmente transversiones de G-T. Estas mutaciones pueden ser reparadas, desencadenar la apoptosis de las células afectadas o persistir. Las mutaciones persistentes pueden afectar genes como *TP53* o *ras*, lo cual genera inestabilidad genética que puede llevar a mayores daños mutacionales y la eventual generación del cáncer.^[8]

Entre los oncogenes que contribuyen a la patogénesis del cáncer pulmonar se encuentran *c-myc* y *k-ras*, este último se encuentra mutado en 15-20% de los casos de carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), así como la sobre expresión de EGFR, ciclina D1 y BCL2. Entre los genes supresores de

tumores frecuentemente mutados se encuentran *TP53* (50% en NSCLC), *RB* (20% NSCLC) y *p16* (más del 50% de los casos de NSCLC).^[8]

1.2.2 Clasificación del cáncer pulmonar

Para facilitar las decisiones de tratamiento y pronóstico, el cáncer pulmonar se clasifica en dos grupos: Carcinoma pulmonar de células pequeñas (SCLC) y carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC). NSCLC incluye aproximadamente el 85% de todos los casos de cáncer pulmonar y se divide en tres subtipos histológicos: Carcinoma epidermoide (25%), Adenocarcinoma (40%) y Carcinoma de células grandes (10%).^[9]

Los adenocarcinomas son masas que se localizan de manera periférica, histológicamente heterogéneas que pueden surgir a partir de células progenitoras de los bronquiolos o alveolos, o de células productoras de moco. Generan metástasis temprana y comúnmente se presentan en pacientes con enfermedad pulmonar subyacente.^[8, 9]

1.2.3 Derrame pleural

La pleura es una membrana serosa delgada, compuesta de fibras de tejido conectivo y células mesoteliales aplanadas, que recubre la cavidad torácica y los pulmones. La pleura parietal consta de las partes costal, mediastinal y diafragmática, mientras que la pleura visceral cubre la superficie de los pulmones. El pequeño espacio cerrado entre ambas pleuras se denomina espacio pleural. En condiciones fisiológicas normales, el espacio pleural contiene una pequeña cantidad de líquido seroso (linfa intrapleural) cuya función es lubricar la superficie de los órganos durante el movimiento, lo que permite el acoplamiento mecánico entre la caja torácica y los pulmones durante las fases de la ventilación respiratoria.^[10]

En condiciones fisiológicas normales, la tasa de producción y absorción del fluido pleural depende de las fuerzas de presión hidrostática y osmótica de los capilares y el intersticio. El derrame pleural se define como una acumulación anormal de

fluido en el espacio pleural que puede ser resultado de una gran diversidad de procesos entre los que se incluyen: traumas, infecciones en la cavidad torácica, enfermedades cardíacas, neoplasias primarias en la parte abdominal o torácica, entre otras .^[10, 11]

Dependiendo de la etiología del derrame pleural, el exceso de fluido puede clasificarse como exudado o trasudado. Las fallas cardíacas congestivas y la presión pulmonar anormal son comúnmente asociados a derrames pleurales trasudativos, los cuales se caracterizan por tener poco contenido de proteína. Por otro lado, algunos tipos de cáncer, enfermedades del riñón, neumonía e infecciones pulmonares se asocian con efusiones pleurales exudativas.^[10]

1.2.4 Derrame pleural maligno

Los derrames pleurales malignos (MPEs por sus siglas en inglés) son efusiones que resultan de la directa infiltración de células cancerosas a la pleura. Representan una complicación común de un amplio rango de tumores malignos y pueden ser primarios a la pleura o a sitios intra o extra torácicos. Sin importar el tipo de cáncer que acompañan, los derrames pleurales malignos están asociados a un pronóstico pobre, con una supervivencia media de cuatro meses.^[12]

Los derrames se pueden desarrollar durante etapas avanzadas del cáncer, como presentación inicial de una neoplasia adyacente o como manifestación de recurrencia del cáncer después de la terapia. Más del 75% de los MPEs son causados por carcinomas de pulmón, mama, ovario o linfomas, siendo el adenocarcinoma el tipo histológico más común.^[12]

Estudios citológicos de los derrames pleurales indican que la mayoría de estas efusiones contienen altas proporciones de células neoplásicas y células inflamatorias lo que lo convierte en un buen modelo para el estudio de las interacciones entre el sistema inmune y las células malignas.^[13, 14]

1.3 Linfocitos T CD8⁺

Los linfocitos T citotóxicos (CTLs) son células del sistema inmune que reconocen y eliminan células infectadas con patógenos intracelulares, células alogénicas, así como células transformadas.^[15] Cuando una célula nucleada es infectada por patógenos intracelulares o presenta mutaciones en su genoma, sintetiza proteínas producidas por estos patógenos o por los genes propios alterados. Los péptidos derivados de estas proteínas no propias desplazan a los péptidos provenientes de las proteínas propias en su asociación con las moléculas de clase I codificadas por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Los linfocitos T CD8⁺ efectores reconocen y eliminan células que muestran péptidos no propios asociados a las moléculas de clase I del MHC.^[15]

1.3.1 Activación de la célula T

La respuesta efectora de linfocitos T CD8⁺ es inducida por los antígenos producidos y procesados en el citoplasma de las células presentadoras de antígeno (APCs), los cuales son presentados en su superficie en asociación con las moléculas de clase I del MHC.^[16]

Para el reconocimiento de los péptidos no propios, los linfocitos T CD8⁺ expresan en su superficie el receptor de la célula T (TCR) y la molécula CD8, entre otros. Cada linfocito expresa un distinto TCR, como consecuencia de la combinación azarosa de distintos segmentos variables y constantes que codifican la cadena α y β que forman el TCR.^[15] El complejo TCR/CD3 comprende al heterodímero $\alpha\beta$ que le confiere la capacidad de reconocimiento de antígeno y la especificidad, así como el complejo CD3, compuesto de los polipéptidos no polimórficos γ , δ , ϵ y las cadenas δ - δ , estas últimas unidas por puentes disulfuro,^[17] ver figura 1. Los componentes citosólicos de estas moléculas contienen un dominio único ITAM (Motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina)^[17] La molécula CD8 es un correceptor que se une a las regiones no polimórficas de la molécula del MHC clase I y funciona sinérgicamente con el TCR durante el reconocimiento del antígeno.^[15]

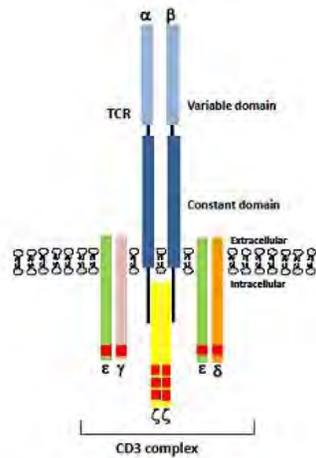


Figura 1. Complejo TCR/CD3

Un gran número de cambios bioquímicos intracelulares ocurren durante los primeros segundos y minutos de la activación, entre los que se incluyen la fosforilación de proteínas, el metabolismo de fosfolípidos, el incremento de los niveles intracelulares del calcio y rearrreglos en el citoesqueleto.^[17] Un evento temprano en la activación del TCR es la fosforilación de los motivos ITAM en el lado citosólico del complejo TCR/CD3 por la proteína tirosina cinasa Lck; posteriormente, la proteína cinasa asociada a la cadena Zeta (Zap-70) es reclutada al complejo TCR/CD3, donde promueve el reclutamiento y fosforilación de distintas proteínas adaptadoras, lo que resulta en la activación de factores de transcripción como NF-κB (Factor Nuclear kappa B) y NFAT (Factor Nuclear de células T activadas), siendo este último responsable de la transcripción del gen de interleucina 2 (IL-2).

Posterior a la interacción inicial, es necesaria la coestimulación celular apropiada que involucra tanto a distintas moléculas de superficie como a factores solubles.^[15] Las moléculas coestimuladoras mejor caracterizados son los miembros de la familia del B7, que reconocen los receptores de la familia del CD28 expresados en los linfocitos T.^[16] CD28 carece de actividad enzimática intrínseca, pero la unión con B7 estimula la fosforilación de los residuos tirosina en sus colas citoplasmáticas por cinasas de la familia Src.^[17] Lo anterior permite el reclutamiento de distintas proteínas adaptadoras como p85 (subunidad catalítica

de PI3K), que se activa y fosforila a la cinasa de treonina-serina Akt (también llamada proteína cinasa B), lo cual culmina con la activación transcripcional del factor NF- κ B y la óptima producción de IL-2. Otros cambios inducidos por CD28 incluyen la promoción de la división celular y la supervivencia mediante la inducción de la degradación de inhibidores del ciclo celular como INK4c y Kip 1 y el incremento en de la expresión del factor anti apoptótico Bcl-X_L.^[17]

Además de CD28, otra molécula coestimuladora importante de las células T CD8⁺ es CD137 (4-1BB). CD137 es miembro de la familia de receptores TNF (factor de necrosis tumoral) y su expresión es inducida posterior a la activación vía TCR, por lo su detección se asocia con la activación del linfocito T. La unión de CD137 con su ligando induce la división celular y la secreción de IL-2, así como la actividad citolítica en linfocitos T. En linfocitos T CD8⁺ provee señales de supervivencia contra la muerte inducida por activación, incrementando la expresión de moléculas antiapoptóticas Bcl-xL y Bfl-1.^[18]

El reconocimiento del antígeno y la coestimulación induce la proliferación de clonas específicas frente al antígeno (expansión clonal), lo que aumenta el número de células y la posterior diferenciación de las células naive en linfocitos T efectores y de memoria.^[16]

1.3.2 Diferenciación

Posterior al reconocimiento de antígeno y la coestimulación celular, los linfocitos T CD8⁺ inician un proceso de proliferación y diferenciación, en el que modifican sus moléculas de superficie y adquieren la maquinaria citocida que les permitirá destruir específicamente a las células que indujeron su activación.^[15]

Los programas transcripcionales que controlan la diferenciación a células efectoras y de memoria se encuentran basados en la expresión de factores de transcripción que compiten entre sí. Variaciones en la duración de la estimulación del TCR, así como en las citocinas presentes en el medio durante la activación

pueden influir en las respuestas de las células T, generando subgrupos celulares con variaciones en sus funciones efectoras y patrones migratorios.^[19] De esta forma, cuando la expresión o actividad de factores como T-bet, BLIMP1, ID2 y STAT4 sobrepasa cierto umbral durante la infección, las células T CD8⁺ adquieren fenotipos con mayor grado de diferenciación terminal, lo cual está asociado con una reducción de la capacidad proliferativa y longevidad. Por otro lado, la expresión y actividad de reguladores transcripcionales como EOMES, BCL-6, ID3 y STAT3 evitan la diferenciación terminal de células T efectoras y ayudan a mantener propiedades de células de memoria.^[19]

Durante la diferenciación a linfocitos T CD8⁺ efectoras se forman gránulos citoplasmáticos que contienen proteínas como perforina y granzimas, cuya función es matar a otras células. La perforina crea poros en la membrana plasmática de la célula blanco con lo que genera una lisis osmótica. Por otro lado, las granzimas liberadas pueden entrar a través de estos poros y desencadenar la apoptosis de la célula blanco. Adicionalmente, los CTLs pueden expresar ligando de Fas (FasL), proteína miembro de la familia del factor de necrosis tumoral, que al unirse a su receptor Fas en la célula blanco activa la vía extrínseca de la apoptosis.^[17]

Además, los CTLs son capaces de secretar citocinas como IFN- γ y factor de necrosis tumoral (TNF).^[16] Entre los cambios en las moléculas de superficie celular, se incluye la disminución de la expresión de receptores de moléculas expresadas en los ganglios linfáticos como CCR7 y L-selectina.^[19] Por el contrario, los CTLs adquieren una mayor capacidad de migrar a sitios de inflamación, lo cual se debe al incremento en la expresión de receptores de quimiocinas como CCR5 (quimiocina receptora de tipo 5) y CCR2 (receptor de la proteína quimioatrayente de monocitos 1).^[19]

Las células efectoras tienen una vida corta y el número de linfocitos T específicos frente al antígeno declina con rapidez a medida que se elimina el antígeno. Posterior a la disminución de la respuesta inmune, las células de memoria que sobreviven son del orden de 1 de cada 10⁴.^[16] Las células de memoria se mantienen a niveles estables durante muchos años y son las encargadas de

montar una respuesta más rápida y efectiva ante un reencuentro con el antígeno. Lo anterior se debe a su frecuencia incrementada, capacidad de rápida adquisición de funciones efectoras y su localización en sitios periféricos de la infección. [18]

1.3.3 Linfocitos T CD8⁺ en cáncer pulmonar

Como se mencionó anteriormente, los CTLs pueden reconocer y eliminar células transformadas que expresen péptidos provenientes de las proteínas mutadas en asociación con las moléculas del MHC clase I. Se ha reportado que en diversos modelos de tumores inducidos en animales, así como en algunos tipos de cánceres en humano, los péptidos asociados al tumor pueden generar en algunos casos la activación de los CTLs que conduce a la regresión del tumor. Como ejemplo de lo anterior, Yee C. y cols. demostraron que clonas de células T antígeno específico transferidas a pacientes con melanoma metastásico persisten *in vivo*, se localizan preferentemente en sitios del tumor y que son capaces de eliminar células tumorales antígeno específico. [20, 21]

Los antígenos tumorales se clasifican en cinco categorías: (a) Antígenos específicos de diferenciación. (b) Antígenos de línea germinal (testiculares). (c) Antígenos mutados: en cáncer pulmonar se han reportado mutaciones en el gen *TP53*, el gen del factor de elongación 2, actinina-4, la enzima málica y NF- κ B. [22] (d) Antígenos sobreexpresados: la sobreexpresión de survivina y del producto del gen *WT1* del tumor de Wilms son de los pocos reportados en cáncer pulmonar y (e) Antígenos codificados por virus oncogénicos. [22, 23]

Los tumores de cáncer de pulmón son considerados pobremente inmunogénicos, sin embargo muchos estudios han reportado que clonas de linfocitos T citotóxicos restringidas a moléculas de MHC clase I pueden ser establecidas y que éstos muestran citotoxicidad específica contra células blanco autólogas. Por otro lado, se ha reportado que la presencia de células T infiltrantes del tumor (TILs) contribuye a la respuesta clínica en distintos tipos de cáncer. Algunos reportes

muestran que la presencia de TILs con fenotipo de memoria en cáncer pulmonar predice una respuesta clínica favorable. ^[24] Más recientemente, Al-Shibli y cols. reportaron una correlación significativa entre la presencia de una alta densidad de células T CD8⁺ en el estroma del tumor y mayor supervivencia de pacientes con NSCLC (etapas I a IIIa). ^[25] Al mismo tiempo, los estudios anteriores sugieren que una baja infiltración de células T CD8⁺ en el sitio del tumor se encuentra asociada con una respuesta clínica pobre en los pacientes con cáncer pulmonar. ^[22]

Nuestro grupo de trabajo ha reportado que en derrames pleurales provenientes de pacientes con cáncer pulmonar, la subpoblación de células T CD8⁺ se encuentra reducida, mientras que la subpoblación de células T CD4⁺ se encuentra incrementada. De acuerdo al fenotipo de las células T CD8⁺, la población de células T de memoria se encuentra elevada con una baja proporción de células terminalmente diferenciadas, lo anterior es similar a lo reportado para los TILs. ^[13]

1.3.4 Evasión del cáncer pulmonar a los linfocitos T CD8⁺

Las células tumorales pueden generar numerosos mecanismos de evasión del sistema inmune. Algunos de los mecanismos más comunes descritos en el cáncer pulmonar son:

a) Liberación de factores inmunosupresores: Las células tumorales pueden secretar moléculas solubles como prostaglandinas, IL-10, TGF- β , entre otras, que inhiben diversas respuestas del sistema inmune.

- Prostaglandina: Se ha reportado que las células tumorales de distintos tipos de cáncer pulmonar producen elevados niveles de prostaglandina E₂ (PGE₂) a través de la enzima cicloxigenasa-1 (Cox-1) o Cox-2. Los efectos inmunosupresores de PGE₂ incluyen la inhibición de la maduración de células dendríticas (DCs), la inhibición de la función y proliferación de los linfocitos T y la disminución de la síntesis de quimiocinas proinflamatorias y citocinas tipo Th1. ^[7]

- Interleucina-10 (IL-10): PGE₂ también estimula la producción de IL-10 en distintos tipos celulares como macrófagos, células T y B. Se ha reportado que altos niveles de IL-10 *in vitro* inhiben distintas funciones celulares como la producción de citocinas proinflamatorias y la presentación de antígeno por parte de los macrófagos, la proliferación de las células T antígeno específicas y la producción de citocinas por parte de las células Th1. [26]
- Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF): Este factor promueve el proceso de angiogénesis, sin embargo, también inhibe al sistema inmune mediante la regulación negativa de la función de las APCs. [7]
- Factor de crecimiento transformador (TGF-β): Entre sus efectos se incluye la inhibición de la proliferación y funciones efectoras de los linfocitos T, promover la diferenciación a células con fenotipo Th17 y Treg y la inhibición de la activación de los macrófagos. [16]

b) Reclutamiento de células reguladoras de la respuesta inmune: Moléculas inmunosupresoras como el TGF-β promueven el reclutamiento de células reguladoras como los linfocitos T reguladores (Treg) y las células supresoras derivadas de la línea mieloide (MDSCs).

- Treg: Las células T naive pueden diferenciarse a Treg en presencia de TGF-β e IL-2 mediante la regulación positiva del factor de transcripción FoxP3. Estas células son importantes en la regulación negativa de las células Th1, Th2 y Th17 y posiblemente evitando la autoinmunidad. La función inmunosupresora de las células Treg se debe en parte a la liberación de TGF-β soluble. A su vez, éstas células producen la enzima IDO-1, la cual cataboliza la conversión del triptófano a quinurenina, con lo cual limita la respuesta de las células T. Los linfocitos Tregs se han encontrado en abundancia en distintos tipos de cáncer pulmonar. [27]
- MDSCs: Brandau y cols. han reportado la presencia incrementada de MDSCs en NSCLCs. Estas células producen arginasa, sintasa de óxido nítrico (NOS) y en algunos casos PGE₂. La arginasa es una familia de enzimas que cataliza la conversión de la arginina a ornitina y urea. La

arginina es necesaria para una correcta función de la célula T y es capaz de generar anergia de las células T. La NOS convierte la arginina en óxido nítrico y polariza a las células T, DCs y macrófagos a una respuesta tipo 1. Por otro lado PGE₂ induce a los macrófagos a producir arginasa 1, lo cual los polariza a una respuesta tipo 2 e inhibe la respuesta Th1. [28]

c) Regulación negativa de moléculas del MHC: Uno de los mecanismos de evasión más comunes contra las células T CD8⁺ es la pérdida o regulación negativa de la expresión de las moléculas de MHC. Se ha reportado que las células de cáncer pulmonar son capaces de regular la expresión de MHC I, lo cual contribuye a la pobre inmunogenicidad de los tumores. [7, 22]

d) Contraataque tumoral: La hipótesis del contraataque tumoral postula que las células tumorales evaden su eliminación mediante la expresión de FasL en su membrana celular. La interacción de FasL con su receptor desencadena la apoptosis en las células Fas+. Fas se encuentra expresada en distintos tipos celulares, incluyendo las células T. Muchos autores han reportado que distintos tipos de tumores, incluyendo carcinomas pulmonares, expresan FasL. (27) Sin embargo, nuestro grupo de trabajo y otros autores han reportado la ausencia de FasL en NSCLC. [29]

1.4 Mitocondria

Durante el proceso de activación de la célula T, la mitocondria tiene un papel fundamental, ya que este organelo, encargado de suministrar la energía celular mediante la generación del ATP, participa activamente en los cambios bioquímicos durante la activación de la célula T así como en el cambio del metabolismo celular después de la activación.

Las mitocondrias son organelos semiautónomos que contienen su propio genoma y maquinaria para la síntesis de proteínas.^[30] El DNA mitocondrial (mtDNA) es una molécula circular de doble cadena de aproximadamente 16.5 kb, contiene 37

genes que codifican para 13 subunidades de los complejos I, III, IV y V de la cadena transportadora de electrones, 22 tRNAs y 2 rRNAs.^[31] Sin embargo, la mayoría de las proteínas mitocondriales son codificadas por genes nucleares y después de ser traducidas en ribosomas citosólicos son importadas selectivamente a las mitocondrias.

Estos organelos están conformados por una membrana externa y una membrana interna, las cuales contienen la matriz mitocondrial. La membrana externa está formada en un 50% por una proteína denominada porina de 30 kDa que forma canales iónicos de alta conductancia. Este canal muestra aperturas dependientes de voltaje, pasando de un estado abierto total (selectivo a aniones), a estados parcialmente abiertos, descritos generalmente como selectivos a cationes. La membrana interna mitocondrial está organizada en pliegues característicos denominados crestas, que sobresalen en la matriz mitocondrial y en éstas se distribuyen los complejos de la cadena transportadora de electrones. Los complejos respiratorios tienen en común la función de transferir electrones al oxígeno de manera acoplada a la traslocación de protones a través de la membrana interna mitocondrial. La traslocación de protones genera un gradiente electroquímico que es utilizado para sintetizar ATP por la ATP sintasa.^[32]

Las mitocondrias participan en diversas funciones biológicas de las cuales la más conocida es la de acoplar eficientemente la oxidación de metabolitos mediante el ciclo de Krebs para la producción de ATP por la cadena transportadora de electrones.^[33] Los ácidos grasos y el piruvato son oxidados a acetil coenzima A (acetil-CoA) mediante la β -oxidación de ácidos grasos o por la piruvato deshidrogenasa (PDH), respectivamente. Subsecuentemente, el ciclo de Krebs es iniciado por la enzima citrato sintasa que cataliza la reacción de condensación del acetil-CoA con oxaloacetato para producir citrato. El ciclo de Krebs genera los agentes reductores NADH y FADH₂, los cuales actúan como donadores de electrones a la cadena transportadora de electrones.^[3, 32]

La oxidación mitocondrial del piruvato genera 31.5 moléculas de ATP en comparación con los 2 ATP generados por la glicólisis, por lo tanto la mitocondria es la fuente más eficaz para la generación de ATP en la célula. ^[32]

1.4.1 *Biogénesis mitocondrial*

Las mitocondrias no pueden ser generadas *de novo*, en cambio, estos organelos proliferan a partir del crecimiento y división de las mitocondrias pre existentes, a este proceso se le denomina biogénesis mitocondrial. ^[30]

La biogénesis mitocondrial es influenciada por estrés ambiental como el ocasionado durante el ejercicio, restricción calórica, baja temperatura, estrés oxidativo, división celular y procesos de renovación y diferenciación. A su vez, la biogénesis está acompañada de variaciones en número, tamaño y masa. ^[31]

A nivel nuclear, existen dos tipos de reguladores transcripcionales involucrados en el control de la biogénesis mitocondrial.

- Factores de transcripción de unión al DNA: éstos incluyen los Factores Nucleares Respiratorios (NRF)-1 y NRF-2, que se unen a los promotores de genes nucleares que contribuyen directa e indirectamente a la expresión y función de la cadena transportadora de electrones así como a la biogénesis mitocondrial. ^[33]
- Coactivadores transcripcionales: estas proteínas reguladoras no se unen al DNA; sin embargo, ejercen sus efectos en la expresión de genes a través de su interacción con factores de transcripción y otros coactivadores. Entre estos se incluyen los miembros de la familia PGC-1 (por su nombre en inglés, PPAR –peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1) denominados PGC-1 α , PGC-1 β y PRC. ^[33]

La familia PGC-1 interactúa con una gran variedad de factores de transcripción tejido específicos. Lo anterior genera una respuesta específica en cada tejido ante las distintas condiciones de estrés. PGC-1 α induce la biogénesis mitocondrial y la expresión de la proteína de desacoplamiento 2 (UCP-2) en células del músculo

mediante la activación de los factores nucleares respiratorios (NRFs). NRF-1 y NRF-2, a su vez promueven la transcripción de un amplio rango de genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales, entre las que se incluyen componentes de la cadena transportadora de electrones como la subunidad β de la ATP sintasa y el citocromo C, así como TFAM (Factor de transcripción mitocondrial A) el cual regula la transcripción del DNA mitocondrial. En el tejido cardíaco, PGC-1 α interactúa con PPAR α y NRF-1. En tejidos de almacenamiento de energía, PGC-1 α interacciona con PPAR γ , PPAR α y el receptor de la hormona tiroidea (en tejido adiposo pardo) para inducir la biogénesis mitocondrial y la expresión de UCP-1 durante el estrés generado por el frío.^[34]

PGC-1 α es regulada a nivel de proteína mediante cambios en su localización celular, estabilidad y mediante modificaciones post-traduccionales. Por otro lado, también puede ser regulado a nivel transcripcional ya que su promotor posee distintos dominios de unión para factores de transcripción como FoxO, MEF2, ERR α , CREB y p53. Además, los niveles de PGC-1 α aumentan en respuesta a SIRT6, TORCs y AMPK.^[31, 35]

AMPK (AMP-activated protein kinase) es un regulador importante de la biogénesis mitocondrial, el cual regula el metabolismo energético intracelular en respuesta a crisis energéticas. Estudios realizados en ratas utilizando ácido β -guanidinopropiónico (β -GPA), un activador farmacológico de la AMPK demostraron que la activación crónica de la AMPK en músculo esquelético, promueve la biogénesis mitocondrial mediante la vía PGC-1 α y los NRFs. Dicho estudio reportó que la activación crónica de la AMPK ocasiona el incremento de la actividad de unión de NRF-1, medido mediante su unión a una secuencia de oligonucleótidos que contenían un sitio de unión funcional en el promotor de la ácido aminolevulínico sintasa (δ -ALAS), uno de sus genes blanco. Además, se reportó el aumento en los niveles de mRNA de δ -ALAS, así como el incremento en la expresión del citocromo C y del contenido mitocondrial.^[31]

También se sabe que la transcripción del gen *PGC-1 α* se induce mediante la expresión de TORC1 (coactivador transcripcional regulado por CREB 1). Se ha

demostrado que la expresión forzada de TORCs en células de músculo inducen la expresión de mRNA de PGC-1 α y sus genes blanco en la cadena transportadora de electrones y en el ciclo de Krebs. [31]

En resumen, PGC-1 α tiene un papel crucial enlazando estímulos externos como el frío o el ejercicio con respuestas metabólicas intracelulares como la biogénesis mitocondrial. Ver figura 2.

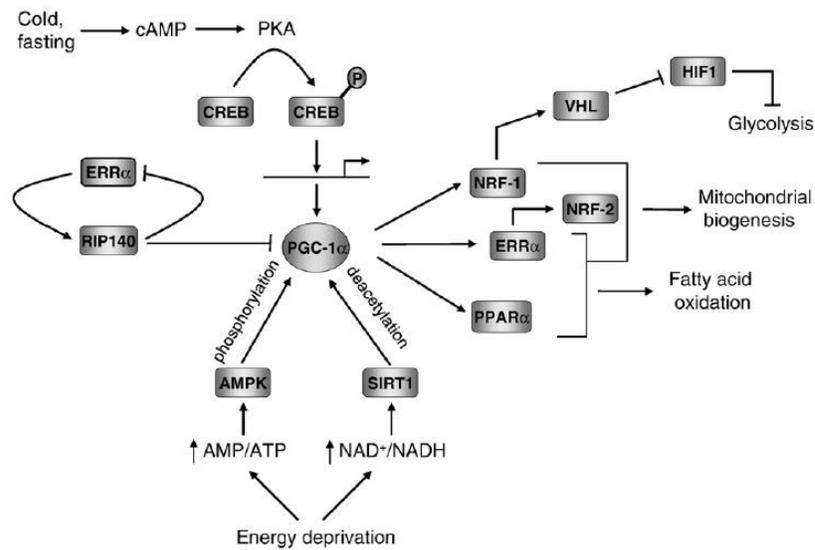


Figura 2. Regulación de la función y biogénesis mitocondrial orquestada por PGC-1 α [36]

1. ANTECEDENTES

2.1 NRF-1 y NRF-2 en procesos de división y diferenciación celular

NRF-1 fue identificado a través de su unión a una secuencia palindrómica en la región promotora del gen del citocromo C y subsecuentemente ha sido asociado con la expresión de muchos genes requeridos para la expresión y función de la cadena transportadora de electrones. Entre los genes regulados por NRF-1 se encuentran genes que codifican para: subunidades de los cinco complejos de la cadena transportadora de electrones, así como proteínas involucradas en el montaje y función de la misma, componentes que forman parte de la maquinaria de replicación y transcripción del mtDNA, enzimas mitocondriales, enzimas citosólicas de la vía biosintética del grupo hemo y proteínas que participan en el importe mitocondrial.^[33]

NRF-1 se encuentra como fosfoproteína durante el crecimiento exponencial de células en mamíferos y se une como homodímero a sus sitios de reconocimiento. Se ha reportado la inducción del mRNA de NRF-1 después de la estimulación eléctrica de miocitos cardíacos neonatales como parte de un programa de proliferación y diferenciación mitocondrial.^[37] A su vez, el mRNA de NRF-1 también es transitoriamente inducido en células de músculo esquelético de rata como respuesta a un periodo agudo de ejercicio.^[38] Dicha inducción ocurre antes del incremento adaptativo en la capacidad oxidativa mitocondrial, lo que sugiere que la elevación de los niveles de NRF-1, que acompaña múltiples periodos de ejercicio, podría estar involucrada en la biogénesis mitocondrial inducida por el ejercicio.^[33]

NRF-1 también está involucrado en la estimulación de la respiración celular que ocurre cuando células quiescentes son inducidas a división después de un tratamiento con factores de crecimiento.^[36] Este incremento en la respiración es acompañado por una rápida inducción de los niveles de mRNA de citocromo C y de la expresión de proteínas relativas a la citocromo C oxidasa (COX IV). Los datos demuestran que el citocromo C es un factor limitante en la respiración

celular durante la transición temprana de la fase G_0 a G_1 y, que tanto NRF-1 como CREB contribuyen a la inducción y mantenimiento de los niveles del citocromo C. Por otro lado, se ha visto que c-myc se encuentra asociado a la expresión de ciertos genes blanco de NRF-1 y se ha reportado que fibroblastos carentes de myc se encuentran deficientes en contenido mitocondrial. ^[39]

Por otro lado, Kuzmin I. y cols. demostraron que en humanos, la región promotora de la proteína von Hippel-Lindau (VHL) posee un sitio de reconocimiento para NRF-1, lo que sugiere que su expresión se encuentra bajo el control de dicho factor de transcripción. ^[40] VHL es considerada como supresor de tumores ya que actúa como regulador negativo del Factor Inducible a Hipoxia (HIF-1). HIF-1 es un activador transcripcional de la vía glicolítica y se ha reportado que actúa como regulador negativo de la biogénesis mitocondrial y la utilización del oxígeno en células de carcinoma renal que carecen de VHL. ^[41] En su artículo, Zhang y cols. plantean que la ausencia de la proteína VHL en las células de carcinoma renal promueve la activación de la vía HIF-1, lo cual lleva a la potenciación de la glicólisis mediante la regulación positiva de la piruvato deshidrogenasa cinasa 1 (PDHK1), que al fosforilar al complejo piruvato deshidrogenasa inhibe la conversión del piruvato a acetil-CoA. Lo anterior resulta en un decremento de la respiración mitocondrial que favorece el switch molecular de la fosforilación oxidativa mitocondrial dependiente de c-myc a la promoción de la glicólisis aeróbica mediado por HIF. ^[41]

También se ha reportado que la activación de HIF promueve la inhibición de c-myc y su degradación vía proteosoma. La represión de c-myc resulta en la inhibición de la biogénesis mitocondrial y la respiración oxidativa. ^[41] De esta forma, la vía de PGC-1-NRF-1 podría promover el metabolismo mitocondrial mediante la regulación positiva de la expresión de VHL. Ver Figura 2.

NRF-2 junto con NRF-1 han sido asociados al control transcripcional de muchos genes mitocondriales. Es importante aclarar que no se debe confundir este factor de transcripción con el Factor 2 asociado al factor nuclear eritroide 2 (NFE2L2) con el cual comparte el acrónimo de NRF-2 en la base de datos de PubMed. ^[35]

NRF-2 también llamado GABPA pertenece a la familia de factores de transcripción Ets (por su nombre en inglés E26 transformation-specific) los cuales se unen a secuencias GGAA en el DNA. NRF-2 se compone de cinco subunidades, la subunidad α , con actividad de unión al DNA y las subunidades β_1 , β_2 , γ_1 y γ_2 que forman complejos con la subunidad α . Entre los genes regulados por NRF-2 se encuentran aquellos que codifican para las subunidades IV, Vb y VIIa de la citocromo C oxidasa, así como de la subunidad β de la ATP sintasa, TFAM, TFBM1 y TFBM2 y la succinato deshidrogenasa. Además se han encontrado sitios consenso para GABPA en el gen de la proteína ribosomal S12, así como en el promotor del gen TOM20, este último codifica para un receptor de la membrana externa mitocondrial, sugiriendo que NRF-2 también se encuentra involucrado en la expresión de la maquinaria de importe de proteínas mitocondriales.^[35]

NRF-2 permite la expresión coordinada de genes de la cadena transportadora de electrones así como la biogénesis del mismo organelo. Una vez que PGC-1 α se une y coactiva a NRF-2, genera que éste reconozca y se una a sus secuencias consenso en los promotores de TFAM, TFBM1 y TFBM2 generando un incremento en su expresión. Posteriormente TFAM, TFBM1 y TFBM2 se traslocan a la mitocondria, donde inducen la biogénesis mitocondrial mediante la estimulación de la replicación y transcripción del mtDNA.^[35] Adicionalmente, se ha reportado que fibroblastos de embrión que carecen de NRF-2 no logran proliferar debido a la incapacidad de replicar el DNA mitocondrial.^[35]

La unión de NRF-2 a sus sitios de unión es requerida para la máxima activación de los promotores de los genes blanco de PGC-1 α y PRC; sin embargo, Vercauteren y cols. han reportado que no existe una unión directa entre las subunidades de NRF-2 y dichos coactivadores *in vitro*. En su estudio Vercauteren y cols. han sugerido que NRF-2 y PRC se encuentran unidas a un mismo complejo mediante uno o más intermediarios *in vivo*.^[42] Los autores proponen a HCF (host cell factor), una molécula que se une tanto a la subunidad NRF-2 β como a los coactivadores de la familia PGC-1, como el intermediario de unión entre ambas moléculas.

2.2 Cambio de metabolismo del linfocito T CD8⁺ durante la activación y diferenciación celular

Las células T en reposo y las activadas utilizan diferentes vías metabólicas para obtener la energía necesaria para sustentar los distintos requerimientos metabólicos. Las células T en reposo tienen una baja tasa de captación de nutrientes y su principal fuente de ATP proviene de los procesos de β -oxidación de ácidos grasos (FAO) y la oxidación del piruvato y la glutamina mediante el ciclo de Krebs. Ver Figura 3. ^[43]

Por otro lado, después de la activación las células T entran en una etapa de crecimiento y división celular, por lo que necesitan de mayor producción de ATP para aumentar su actividad y de la producción de intermediarios para la biosíntesis.^[44] Debido a lo anterior las células T activadas incrementan el metabolismo de la glucosa, cambio regulado principalmente por la vía PI3K-Akt.^[44] Las células T activadas consumen grandes cantidades de glucosa y producen grandes cantidades de lactato. Por lo anterior, se sabe que el metabolismo de estas células es principalmente glicolítico aún en presencia de oxígeno, proceso conocido como glicólisis aeróbica.^[44]

Se ha reportado que tanto Akt como mTORC1 pueden promover la glicólisis aeróbica para apoyar el crecimiento y función de las células T efectoras.^[43] La estimulación del TCR y la coestimulación dependiente de CD28 activa la cinasa de fosfatidil inositol 3 (PI3K) que, mediante la conversión del lípido de membrana inositol 4,5-difosfato (PIP2) a inositol 1,4,5-trifosfato (PIP3), activa la cinasa de serina treonina Akt.^[43, 45] Esta última promueve la glicólisis incrementando la expresión del transportador de glucosa Glut-1 en la superficie celular y potenciando la actividad de las enzimas glicolíticas hexocinasa y fosfofructocinasa.^[43] Al mismo tiempo, la molécula PIP3 induce la liberación del Ca^{2+} del retículo endoplásmico, lo cual promueve la entrada de calcio extracelular por medio de los canales activados por liberación de calcio (CRACs). El aumento de los niveles intracelulares de Ca^{2+} promueve la transcripción del gen de IL-2 mediante la activación de NFAT, así como la activación de enzimas del ciclo de Krebs.^[44]

Por otro lado, Finlay D. y cols. demostraron que existen vías independientes a PI3K y Akt mediadas por mTORC1 que regulan la expresión del complejo del factor de transcripción de HIF1, las cuales son requeridas para mantener el metabolismo de glucosa y la glicólisis en células T CD8⁺ efectoras. [46]

En las células T activadas, al igual que en las células tumorales en proliferación, el aumento de la glicólisis promueve la biosíntesis de macromoléculas. Muchos intermediarios de la glicólisis son procesados por enzimas de la vía de las pentosas fosfato para la síntesis de ácidos nucleicos y NADPH, agente reductor importante para las reacciones de biosíntesis. [47, 48]

El cambio de metabolismo también se caracteriza por una represión significativa de la oxidación de ácidos grasos, lo que permite que éstos se encuentren disponibles para la síntesis de lípidos. Por otro lado, el citrato generado por el ciclo de Krebs es exportado de la mitocondria al citosol, donde es utilizado en la síntesis de lípidos. Como consecuencia, el ciclo de Krebs se debe restituir constantemente, a este proceso se le denomina anaplerosis. La anaplerosis se logra mediante la desaminación de la glutamina en la mitocondria para generar α -cetoglutarato, el cual ingresa al ciclo de Krebs mediante la actividad de la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa. Ver Figura 3. [45]

Por otro lado, una vez que las células T CD8⁺ se han diferenciado a células T de memoria, su metabolismo vuelve a cambiar, dependiendo en gran medida de la oxidación de ácidos grasos como fuente de energía. Esto les permite mantener una capacidad mitocondrial de repuesto (SRC), es decir, la capacidad que se encuentra disponible en una célula para producir energía bajo condiciones de trabajo incrementado o estrés, lo cual es importante para la función y supervivencia de células de larga vida. [45] Además, se ha reportado que las células T CD8⁺ de memoria muestran un aumento en la masa mitocondrial comparada con las células T naive, lo cual sustenta su habilidad de responder rápidamente tras un reencuentro con el antígeno. [49]

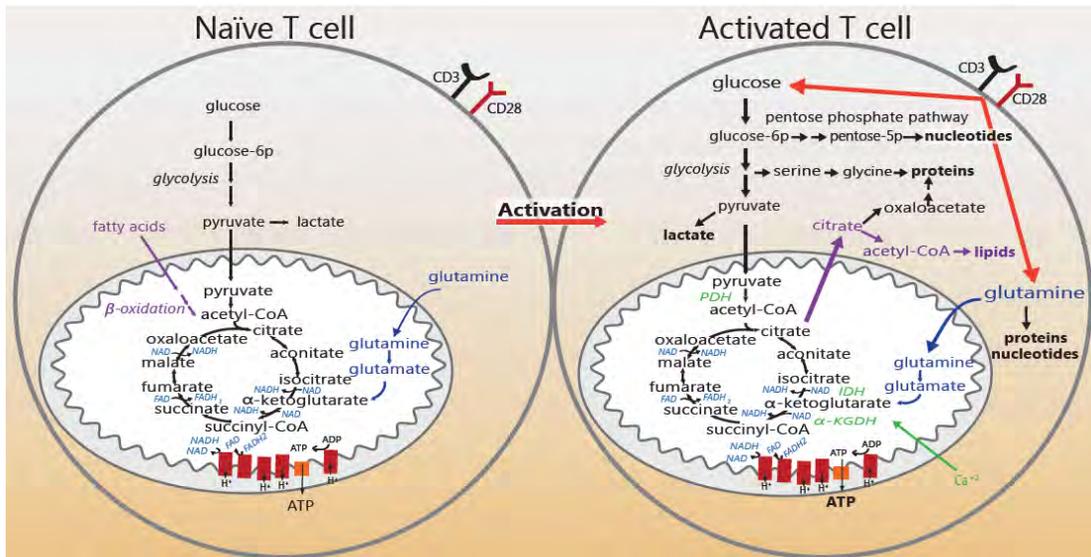


Figura 3. Comparación entre el metabolismo de la célula T naive y la célula T activada [45]

2.3 Participación de la mitocondria en la activación de la célula T

Después de la estimulación vía TCR, las células T quiescentes experimentan un incremento significativo en su tamaño celular seguido de una alta tasa de proliferación y diferenciación. Estos procesos requieren de gran cantidad de energía y por lo tanto, se requieren cambios en la cantidad y actividad de las mitocondrias a fin de satisfacer las nuevas demandas.

Después de la activación, las células T experimentan un rápido incremento en la masa mitocondrial, la fosforilación oxidativa y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Después de lo cual, cambian su metabolismo a glicólisis para satisfacer las nuevas demandas energéticas. Además, estudios han demostrado que durante la activación de la célula T, las mitocondrias se re localizan a la sinapsis inmunológica, donde parecen regular el influjo local de calcio. [50]

Por otro lado, Sena y cols. demostraron que el metabolismo mitocondrial es un componente crítico en el proceso de activación de la célula T a través la producción de especies reactivas de oxígeno por el complejo III. [44] Los autores sugieren que la inducción de la producción de ROS es mediada por la señalización

del calcio inducida por la activación del CD3. Como se mencionó anteriormente, después de la activación de la célula T se genera un aumento en los niveles intracelulares de calcio, el cual tiene efectos directos en la función mitocondrial. El Ca^{2+} activa enzimas mitocondriales involucradas en el ciclo de Krebs como la piruvato deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa. Como resultado, se genera un incremento del ciclo de Krebs y consecuentemente de la función de la cadena transportadora de electrones, lo que genera el incremento del potencial de membrana mitocondrial y el aumento en la producción de ROS. Finalmente, en dicho estudio se comprobó que las ROS producidas principalmente por el complejo III de la cadena transportadora de electrones son requeridas para la activación de las células T CD4^+ , ya que son importantes para la activación de NFAT, otros autores han reportado que la generación de ROS mitocondriales también es necesaria para la actividad óptima de NF- κ B.^[32, 44]

Por otro lado, en un estudio realizado en células T murinas, D'Souza y cols. reportaron que, tras la activación de células T totales con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 incrementa tanto la masa mitocondrial como el potencial de membrana y que dicho aumento está asociado con la amplificación del mtDNA.^[51]

En dicho estudio se reporta que durante la activación temprana, en comparación con sus niveles basales, el potencial de membrana mitocondrial incrementa en mayor medida que la masa mitocondrial.^[51] Posteriormente se observó que las células continuaron incrementando la masa mitocondrial, mientras que el potencial de membrana no presentó un aumento significativo. Los autores sugieren que tras la activación del TCR, las células T regulan positivamente la masa mitocondrial y la fosforilación oxidativa, con el fin de proporcionar la energía necesaria para incrementar el tamaño celular y el contenido citoplasmático; lo anterior es para preparar a la célula para la alta tasa de proliferación celular. Por otro lado, los autores atribuyen el hecho de que el potencial de membrana no continuara aumentando significativamente al cambio de metabolismo a uno principalmente glicolítico que ocurre después de la activación de la célula T.^[51] Sin embargo, el hecho de que la biogénesis mitocondrial y el potencial de membrana sean

mantenidos hasta cierto punto *in vitro*, sugiere que existe la necesidad de incrementar el número de organelos activos durante el estado proliferativo o para la subsecuente diferenciación.

2.4 Alteraciones de los linfocitos T CD8⁺ en cáncer pulmonar

Como se mencionó anteriormente, nuestro grupo de trabajo ha reportado que en derrames pleurales de pacientes con adenocarcinoma pulmonar se observa una menor proporción de células T CD8⁺ efectoras, así como un mayor porcentaje de células T CD8⁺ de memoria en comparación con los niveles encontrados en sangre periférica. En dicho estudio se sugiere que la disminución de la subpoblación de células CD8⁺ efectoras podría ser debido a que las células tumorales bloquean el proceso de diferenciación de células T de memoria a células T terminalmente diferenciadas.^[13]

Nuestro grupo de trabajo ha propuesto que un mecanismo por el cual las células tumorales bloquean la diferenciación terminal de los CTLs podría ser mediante la regulación negativa de la cadena CD3ε, cuya expresión se encuentra reducida en linfocitos T provenientes de sangre periférica y derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar.^[29] Dada la importancia del complejo CD3 durante la activación de la célula T, la reducción de la expresión de CD3ε podría alterar eventos bioquímicos dependientes del TCR, induciendo la anergia de las células T así como la reducción en sus respuestas observadas en pacientes con NSCLC.^[29]

Otros defectos reportados en linfocitos T CD8⁺ provenientes de derrame pleural o de TILs incluyen la reducción en la tasa de proliferación, disminución de la producción de algunas citocinas tipo Th1 y potencial citotóxico disminuido.^[13, 52] Dicho fenómeno no se observó en los linfocitos T CD4⁺.^[53] Adicionalmente, nuestro grupo también ha reportado que la subpoblación de células T CD8⁺ efectoras presenta un bajo porcentaje de células que expresan perforina, en comparación con aquellas que expresan granzima A; así como la presencia de una subpoblación de células T CD8⁺ naive que expresan Fas.^[29] Lo anterior

sugiere que las células T CD8⁺ localizadas en proximidad del tumor, se encuentran mayormente afectadas por factores derivados de éste, en comparación con aquellas células T CD8⁺ localizadas en sitios distantes al tumor.

Por otro lado, se ha propuesto que la muerte celular inducida por activación (AICD) puede mediar la apoptosis de los TILs en pacientes con cáncer.^[54] Se ha reportado que las células T estimuladas crónicamente son sometidas a AICD mediada por la interacción de Fas/FasL. Dong y cols. han reportado que en infecciones virales la estimulación crónica de los linfocitos T CD8⁺ resulta en la pérdida de las funciones efectoras de los CTLs, reportando que la expresión de perforina y granzima se encuentran disminuidas.^[55] Adicionalmente, nuestro grupo de trabajo reportó que los linfocitos T CD8⁺ provenientes de derrame pleural de pacientes presentan AICD después de ser estimulados con anticuerpo anti-CD3.^[53]

2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer pulmonar es la principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial. De acuerdo con lo reportado por la Sociedad Americana del Cáncer en 2011, sólo el 16% de los pacientes con cáncer pulmonar logran alcanzar una tasa de supervivencia mayor a 5 años. Lo anterior se debe en parte a que las células tumorales presentan una gran variedad de mecanismos con los que contrarrestan los distintos tipos de terapias, así como al sistema inmune, esto último representa un obstáculo para el uso de la inmunoterapia como tratamiento complementario.

El linfocito T CD8⁺ es la principal célula del sistema inmune encargada de eliminar a las células tumorales. Muchos estudios han asociado la presencia células T infiltrantes del tumor (TILs) con una respuesta clínica favorable en pacientes de distintos tipos de cáncer. Sin embargo, nuestro grupo de trabajo y otros han reportado que tanto en TILs como en derrames pleurales provenientes de pacientes con adenocarcinoma pulmonar, la población de células T CD8⁺ se encuentra reducida y que el fenotipo de estas células es principalmente de células T CD8⁺ de memoria. Lo anterior sugiere que las células tumorales podrían estar bloqueando el proceso de diferenciación a células T efectoras.

La mitocondria tiene un papel central en el proceso de activación de la célula T ya que inicialmente participa en procesos como la regulación del influjo de Ca²⁺ y en activación óptima de factores de transcripción como NFAT y NF-κB, mediante la producción de especies reactivas de oxígeno. Posteriormente, este organelo participa en el cambio del metabolismo celular a uno principalmente glicolítico, lo cual es necesario para apoyar la alta tasa de proliferación y diferenciación celular que ocurren después de la activación. Adicionalmente muchas de las vías cascada abajo del TCR se encuentran implicadas en la biogénesis mitocondrial y la función de este organelo, entre éstas se incluyen la vía de la proteína cinasa C, las vías de MAPK/ERK y aquellas relacionadas con el Ca²⁺.

Finalmente, no se han reportado estudios donde se evalúe la función y biogénesis mitocondrial en linfocitos T provenientes de pacientes con cáncer. Por lo anterior, en este trabajo se busca evaluar los niveles de expresión de NRF-1 y NRF-2, factores transcripcionales importantes en la regulación de la función y biogénesis mitocondrial, en linfocitos T CD8⁺ no estimulados y después de la estimulación con el anticuerpo anti-CD3, provenientes de pacientes con adenocarcinoma pulmonar; así como comparar los niveles de expresión de estos factores de transcripción con los de linfocitos T CD8⁺ provenientes de sangre periférica de sujetos sanos en ambas condiciones. De esta forma, se busca conocer si existe relación entre los defectos en la activación de los linfocitos T CD8⁺ de los pacientes con cáncer pulmonar y la actividad de la mitocondria.

3. HIPÓTESIS

Si los linfocitos T CD8⁺ provenientes de derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar presentan alteraciones en la regulación de la función mitocondrial, evaluada mediante los niveles de expresión de las moléculas NRF-1 y NRF-2, entonces estos niveles serán menores a los de los linfocitos T CD8⁺ provenientes de sangre periférica de sujetos sanos.

4. OBJETIVOS

5.1 General:

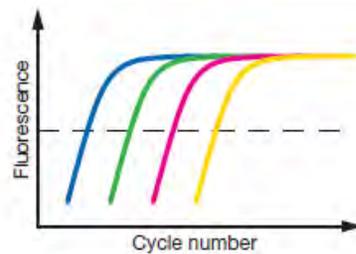
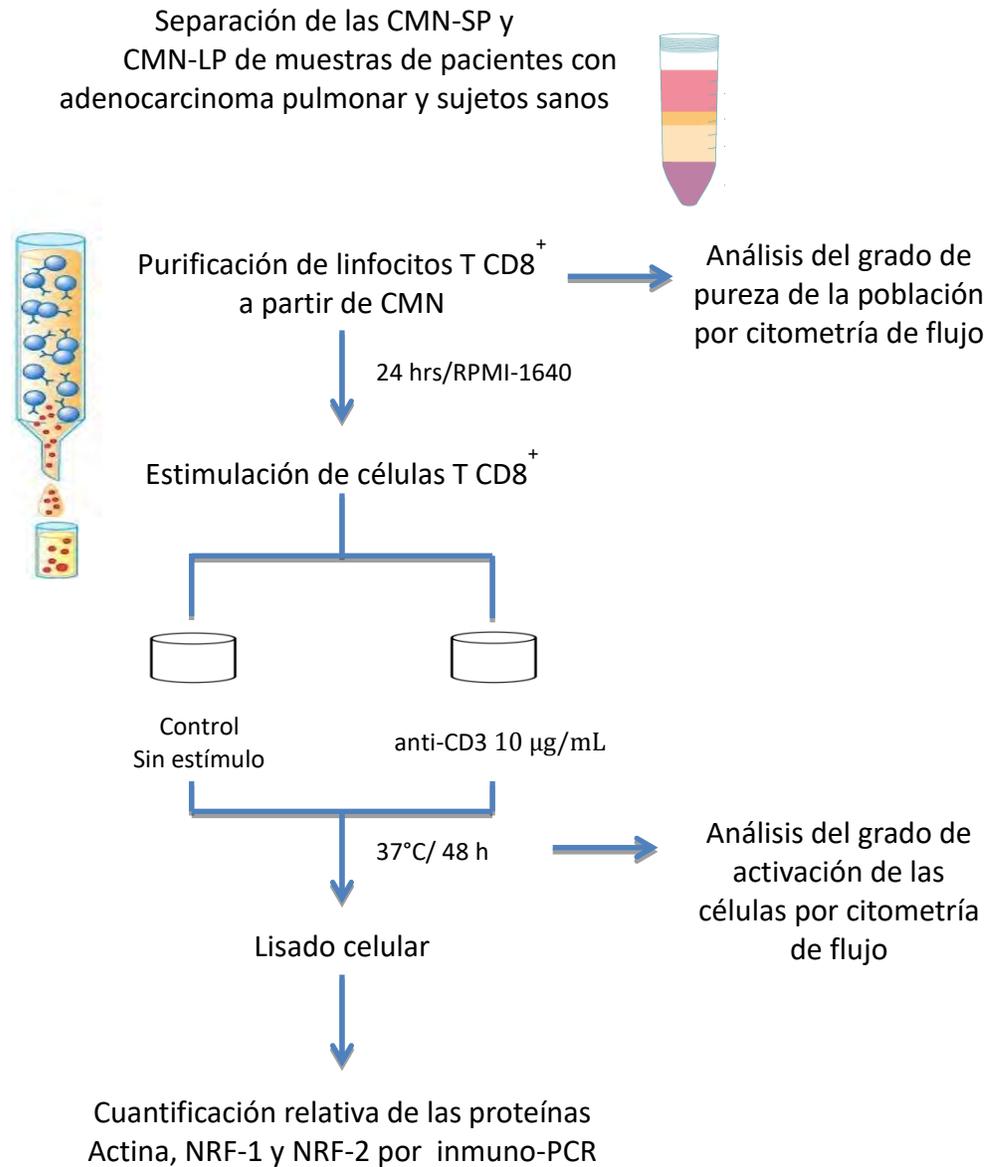
Comparar los niveles de expresión de las proteínas NRF-1 y NRF-2 en lisados celulares de linfocitos T CD8⁺ sin estímulo y posterior a ser estimulados con anticuerpo anti-CD3, provenientes de derrame pleural y sangre periférica de pacientes con cáncer pulmonar y de sangre periférica de sujetos sanos.

5.2 Particulares:

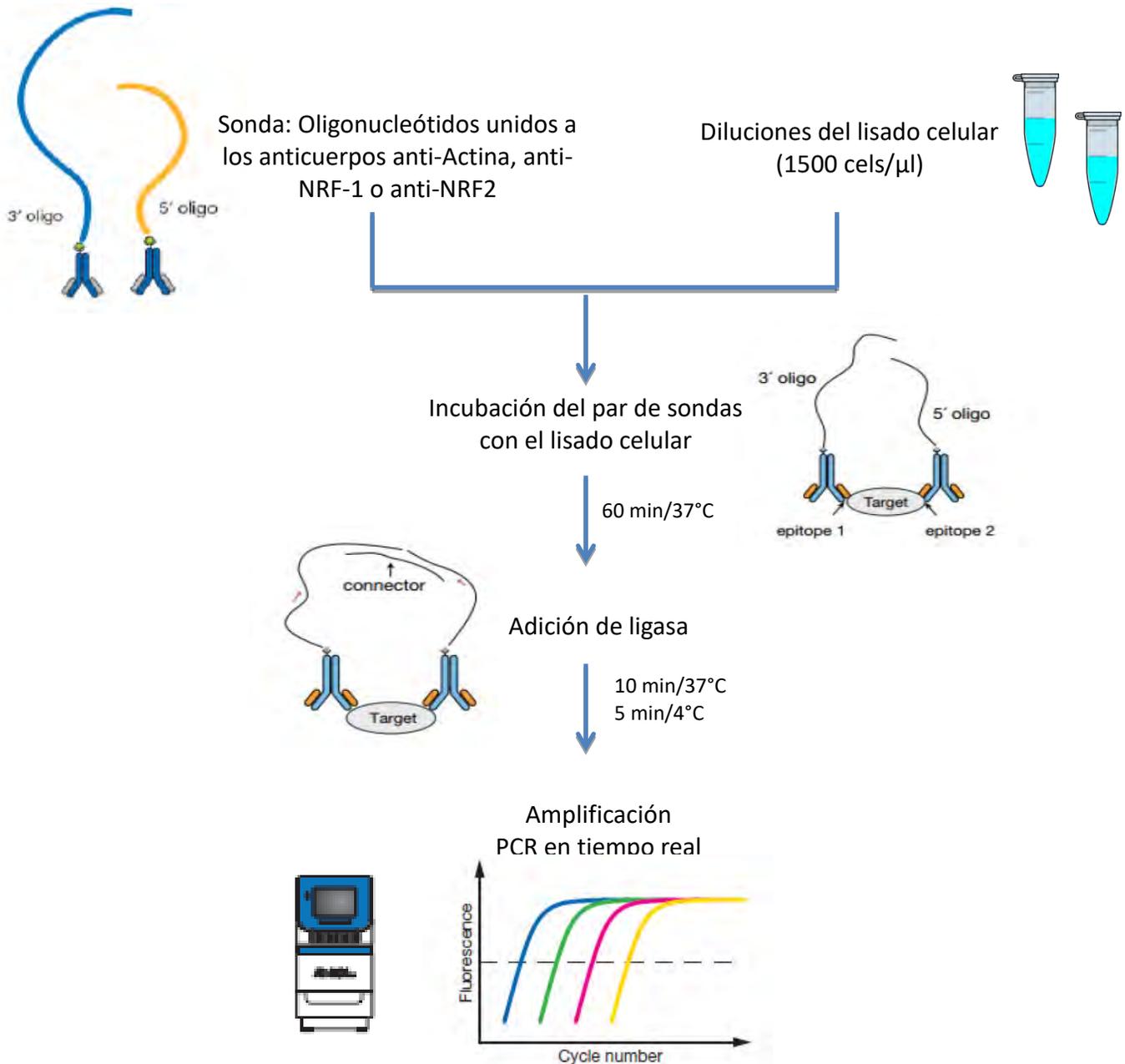
- Estandarizar la técnica inmuno-PCR para la cuantificación de las proteínas actina, NRF-1 y NRF-2 provenientes de linfocitos T CD8⁺
- Realizar la cuantificación relativa de las proteínas NRF-1 y NRF-2 en lisados celulares de linfocitos T CD8⁺ sin estímulo y después de la estimulación con anti-CD3 de pacientes con cáncer pulmonar y de sujetos sanos utilizando actina como proteína endógena.
- Comparar la expresión de Actina, NRF-1 y NRF-2 en los tres grupos de estudio y en ambas condiciones.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

1.- Separación de los Linfocitos T CD8⁺ y condiciones de estimulación



2.- Cuantificación relativa de las proteínas actina, NRF-1 y NRF-2 mediante inmuno-PCR



7. MATERIALES Y MÉTODOS

Población estudiada

Se emplearon células mononucleares (CMN) provenientes de: 5 muestras de derrame pleural de pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar en estadios III y IV, 3 muestras de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma pulmonar y 4 muestras de sangre periférica de sujetos sanos. Los linfocitos T CD8⁺ fueron purificados a partir de las CMN por selección negativa.

Obtención de las células mononucleares de derrame pleural

Las células mononucleares de derrame pleural (CMN-DP) fueron descongeladas y resuspendidas en medio RPMI-1640 adicionado con antibióticos y suero fetal bovino al 10% y se centrifugaron por 12 minutos a 1600 rpm. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se resuspendió en medio RPMI-1640.

Con el fin de separar las CMN de las células tumorales, se realizó un gradiente discontinuo empleando Ficoll al 75% y 100% (Lymphoprep, Axis-Shield, Oslo, Noruega). Las células se colocaron en el gradiente y se centrifugaron a 1300 rpm durante 35 min. A partir del gradiente obtenido, se separaron las CMN de las células tumorales presentes en la muestra.

Purificación de los linfocitos T CD8⁺ a partir de CMN

Las CMN-SP y las CMN-DP fueron resuspendidas y lavadas (12 minutos a 1600 rpm) en medio RPMI-1640. Después se resuspendieron en 2 mL de buffer PBS libre de Ca²⁺ y Mg²⁺ con EDTA a una concentración de 2mM y albúmina sérica bovina (BSA) al 0.5%.

Se realizó la cuantificación de las células totales en una cámara de Neubauer utilizando el colorante azul tripano para distinguir entre células vivas y muertas. Se tomaron dos alícuotas de células para el posterior análisis por citometría de flujo y el resto de las células se purificó como se explica a continuación:

Se realizó un lavado de las células con buffer PBS-BSA (0.5%)-EDTA (2mM) y se resuspendieron en 40 µl del mismo buffer. A la suspensión anterior se le agregó un cóctel de anticuerpos monoclonales conjugados a biotina (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA) contra las moléculas CD4+, CD15+, CD16+, CD19+, CD34+, CD36+, CD56+, CD123+, TCR Y/δ+ y CD235a+ y se incubó por 10 minutos a 4°C. Posteriormente se adicionaron perlas magnéticas conjugadas a anticuerpos monoclonales anti-CD14, anti-CD61 y anti-biotina (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA) y se incubó por 15 minutos a 4°C. Se adicionó buffer PBS-BSA (0.5%)-EDTA (2mM) y se hizo pasar la suspensión por una columna de separación magnética LS SuperMACS II (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA) colocada dentro de un campo magnético en un separador MACS.

Las células T CD8⁺ se eluyeron con buffer y se recolectaron. Las células no CD8⁺ también fueron recolectadas. Se tomaron alícuotas de ambas fracciones para su posterior análisis por citometría de flujo y el resto de las células se colocó en placas de 96 pozos a una concentración de 2×10^6 cels/mL durante la noche a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

Inmunofenotipificación de las fracciones purificadas de linfocitos T CD8⁺ por citometría de flujo.

Los anticuerpos utilizados para realizar las tinciones de citometría de flujo fueron: anti-CD3 PE-eFluor610 (clona UCHT1, eBioscience, San Diego, CA, US), anti-CD4 FITC (clona RPA-T4, BioLegend, San Diego, CA, US), anti-CD8 PECy7 (clona RPA-T8, BD Biosciences, San Jose, CA, US), anti-CD45 PECy5 (clona HI30, BD Biosciences, San Jose, CA, US), anti-CD137 APC (clona 4B4-1, BioLegend, San Diego, CA, US), anti-CD4 PECy5 (clona RPA-T4, BioLegend, San Diego, CA, US) y anti-CD3 FITC (clona HIT3a, BioLegend, San Diego, CA, US).

Las alícuotas de CMN, células T CD8⁺ purificadas y células no T CD8⁺ se inmunofenotipificaron para identificar las poblaciones de linfocitos T CD8⁺ y así verificar la pureza después de la separación magnética. Las células fueron resuspendidas y lavadas en buffer PBS adicionado con BSA al 1% y azida de

sodio (NaN_3) al 0.1% y fueron teñidas con anticuerpos anti- CD3 PE-eFluor610, anti-CD4 FITC, anti-CD8 PECy7 y anti-CD45. Después de 20 min de incubación en oscuridad, se realizó un lavado con buffer. Finalmente las células se resuspendieron en 200 μl de paraformaldehído (1% p/v) y se almacenaron a 4°C para su posterior análisis por citometría de flujo.

Estimulación de los linfocitos T CD8⁺

Las células T CD8⁺ fueron estimuladas con anticuerpo anti-CD3 (clona UCHT1, eBioscience Inc. San Diego, CA, USA) mediante el siguiente procedimiento:

Tras un periodo de 24 horas las células T CD8⁺ se recuperaron con PBS 1X frío estéril, se lavaron y se contaron (BioRad TC20 Cell Counter). Las células fueron llevadas a una concentración de 2×10^6 cels/mL con medio RPMI-1640.

Para fijar el anticuerpo anti-CD3 a la placa de 96 pozos, se preparó una dilución de 50 μl de anticuerpo a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ en PBS frío estéril. Se depositó la dilución de anticuerpo en un pozo de la placa y se incubó por 90 minutos a 37 °C. Al finalizar el tiempo de incubación se lavó con 100 μl de PBS frío y se agregó la mitad del volumen de las células T CD8⁺ a una concentración de 2×10^6 cels/mL. En otro pozo sin anticuerpo se depositó el resto de las células.

Después de 48 h de estimulación a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO_2 , se tomaron alícuotas de ambas condiciones y se realizó la inmunofenotipificación con anticuerpos anti-CD137, anti-CD8, anti-CD4 y anti-CD3 según el protocolo descrito anteriormente.

Obtención del lisado celular de linfocitos T CD8⁺

Para la obtención del lisado celular se utilizó el kit Protein Expression Sample Preparation Kit (Thermo Scientific, Foster City, CA, USA). La solución de lisis se preparó adicionando inhibidores de fosfatasa y proteasa (EMD Millipore, Billerica, MA, USA) a un volumen de Cell Lysis Reagent, 2X (Thermo Scientific, Foster City, CA, USA).

Los linfocitos T CD8⁺ sin estímulo y estimulados con anticuerpo anti-CD3 fueron recuperados con PBS frío estéril, se lavaron y resuspendieron en 500 µl de PBS para realizar el conteo de las células empleando un contador de células automatizado (BioRad TC20 Cell Counter). Finalmente se realizó un lavado con PBS y las células se resuspendieron en un volumen 1:1 de Cell Resuspension Buffer y solución de lisis para obtener una concentración de 2000 cels/µl.

Cuantificación relativa de las proteínas por inmuno-PCR

La cuantificación relativa de las proteínas NRF-1 y NRF-2 en los lisados celulares se realizó mediante la técnica de inmuno-PCR utilizando actina como proteína endógena. El inmuno-PCR se realizó siguiendo la metodología descrita a continuación:

Preparación de sondas específicas para cada anticuerpo

Se utilizó un anticuerpo policlonal anti-actina biotinilado y fabricado en cabra (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) y anticuerpos anti-NRF-1 y anti-GABPA/NRF2A biotinilados fabricados en conejo (Bioss, Woburn, MA, USA).

Se realizó una dilución de cada anticuerpo con Antibody Dilution Buffer (Thermo Scientific, Foster City, CA, USA) para obtener una concentración de 100 µg/mL y se dejaron en hielo. Para cada anticuerpo se prepararon dos complejos: al complejo A se le agregó 0.3 µl de anticuerpo diluido y 0.3 µl de oligonucleótido de extremo 3' conjugado a estreptavidina (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA). Al complejo B se le agregaron 0.3 µl de dilución de anticuerpo y 0.3 µl de oligonucleótido de extremo 5' conjugado a estreptavidina (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA). Después de dejar los complejos en incubación por una hora a temperatura ambiente, a cada uno se le adicionó 5.4 µl de Assay Probe Storage Buffer (Thermo Scientific, Foster City, CA, USA) y se dejaron en incubación por 20 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, se preparó una Sonda (Assay Probe Solution) para cada anticuerpo mezclando 40.5 µl de Assay Probe Dilution Buffer (Thermo Scientific, Foster City, CA, USA) y 2.25 µl de cada

complejo (A y B). Al final se generaron 3 Sondas: para el anticuerpo anti-actina, para el anticuerpo anti-NRF-1 y para el anticuerpo anti-NRF-2.

Preparación de diluciones de lisados celulares

A partir de cada lisado celular (sin estímulo y estimulado con anti-CD3) se realizó una dilución con Cell Resuspension Buffer (Thermo Scientific, Foster City, CA, USA) para obtener una concentración final de 1500 cels/ μ l. El volumen final de cada dilución fue de 30 μ l.

Reacción de unión antígeno-anticuerpo

La reacción de unión se realizó entre la sonda de cada anticuerpo (Assay Probe Solution) y una dilución específica de lisado celular. Se realizaron 9 reacciones de unión independientes.

Por cada sonda de anticuerpo se realizaron 2 reacciones de unión, una con cada dilución de lisado celular (con estímulo y anti-CD3). Para cada reacción de unión se adicionaron 8 μ l de sonda de uno de los anticuerpos y 8 μ l de lisado celular. Adicionalmente se incluyeron controles negativos (NPC) para cada anticuerpo, los cuales contenían 6 μ l de Sonda y 6 μ l de cell resuspension buffer. La reacción de unión se llevó a cabo dentro de un termociclador (Thermal Cycler, Eppendorf) durante una hora a una temperatura de 60°C, después de este tiempo, los tubos se mantuvieron a una temperatura de 4°C.

Reacción de ligasa entre los extremos 5' y 3' de las sondas

La reacción de ligasa se realizó utilizando reactivos provenientes del kit TaqMan Protein Expression Assays Core Reagents Base Kit. Se diluyeron 0.2 μ l de DNA Ligasa 500X en 99.8 μ l de Ligase Dilution Buffer, 1X (Thermo Scientific, Foster City, CA, USA) y la dilución se mantuvo en hielo.

La solución de ligación se preparó adicionando 1136 μ l de H₂O inyectable filtrada, 62.5 μ l de Ligase Reaction Buffer 20X y 1.25 μ l de la dilución de ligasa. Posteriormente se mezclaron 144 μ l de solución de ligación y 6 μ l de muestra

proveniente de los tubos de la reacción de unión. Para los controles negativos se adicionaron 96 μl de solución de ligación y 4 μl de los tubos de NPC. La reacción de ligasa se realizó durante 10 minutos a una temperatura de 37°C en un thermoblock (Multi-block Heater, Lab-Line). Después de este tiempo, los tubos se mantuvieron en hielo a temperatura de 4°C.

PCR cuantitativo

El templado generado por la reacción de la DNA ligasa se amplificó y detectó mediante PCR cuantitativo utilizando Universal PCR Assay, 20X (TaqMan Protein Expression Assays Core Reagent Base Kit) y Fast Master Mix, 2X (TaqMan Protein Expression Fast Master Mix Kit). Universal PCR Assay, 20X contiene concentraciones optimizadas de sondas TaqMan y primers de oligonucleótidos (Forward y Reverse) mientras que Fast Master Mix, 2X contiene a la DNA polimerasa. Los reactivos de estos kits fueron diseñados para amplificar una región del producto de ligación para su detección por PCR tiempo real.

Se preparó una mezcla de reactivos para todas las reacciones adicionando 212 μl de Fast Master Mix y 21 μl de Universal PCR Assay, 20X, se mezcló en vortex y se mantuvo en hielo. A los tubos de muestra se les agregó un volumen de 29 μl de mix y 20.3 μl de muestra provenientes de los tubos correspondientes a la reacción de ligasa. Para los controles negativos se adicionaron 19.5 μl de mix y 13.5 μl de los tubos de reacción de ligación correspondientes.

Por cada tubo de reacción de PCR, se alicuotaron 3 pozos (15 μl por pozo) de una placa reacción de 96 pozos (MicroAmp Fast 96 –Well Reaction Plate 0.1mL, Thermo Scientific) y por cada tubo de control negativo se alicuotaron 2 pozos con el mismo volumen.

La reacción de PCR tiempo real se llevó a cabo en un termociclador StepOnePlus system con los siguientes eventos:

1. Un ciclo inicial de 95°C de 20 segundos de duración, en el cual se realizó la activación de la enzima
2. Desnaturalización del cDNA a una temperatura de 95°C por 1 segundo
3. Alineamiento/extensión a temperatura de 60°C por 20 segundos.
4. Los pasos dos y tres constituyen un ciclo. En el proceso de amplificación y detección por PCR tiempo real se realizaron 40 ciclos.

Análisis de resultados

A partir de los valores de Ct de las proteínas sin estímulo se realizó una cuantificación relativa utilizando el método de ΔCt (ecuación 1). Lo anterior con el objetivo de conocer los niveles de expresión basal de las proteínas NRF-1 y NRF-2 en los linfocitos T CD8⁺ sin estímulo con respecto a los niveles de expresión de actina. El ΔCt se calcula como se indica en la ecuación (2). Finalmente, las veces de cambio son obtenidas con la siguiente ecuación:

$$\text{Veces de cambio} = 2^{-\Delta Ct} \dots (1)$$

Para determinar la expresión de las proteínas en los linfocitos T CD8⁺ activados, los datos obtenidos del PCR cuantitativo fueron analizados con el método de cuantificación relativa $\Delta\Delta Ct$, utilizando Microsoft Office Excel. Este método compara los resultados experimentales obtenidos para la proteína de interés con un calibrador, es decir, la proteína en condición normal (sin estímulo) y un normalizador, el cual debe ser una proteína de expresión constante, en este caso actina. Los valores de Ct tanto de la proteína de interés (NRFs en condición anti-CD3) como del calibrador (NRFs sin estímulo) son ajustadas en relación a la proteína normalizadora en ambas muestras. Posteriormente, utilizando el valor de $\Delta\Delta Ct$ se determinan las veces de cambio en la expresión como se indica:

$$\Delta Ct_{\text{calibrador}} = Ct_{\text{NRFs}}^{\text{sin estímulo}} - Ct_{\text{actina}}^{\text{sin estímulo}} \dots (2)$$

$$\Delta Ct_{\text{muestra}} = Ct_{\text{NRFs}}^{\text{anti-CD3}} - Ct_{\text{actina}}^{\text{anti-CD3}} \dots (3)$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}} \dots (4)$$

$$\text{Veces de cambio} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \dots (5)$$

8. RESULTADOS

8.1 Determinación de la pureza de las fracciones de linfocitos T CD8⁺ purificados por citometría de flujo

La pureza de las células T CD8⁺ se verificó mediante la inmunofenotipificación de las células antes y después de la separación magnética utilizando anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD45. El análisis citométrico (ver Figura 4A) se realizó discriminando agregados celulares y seleccionando la población de linfocitos en función de su tamaño y granularidad. Posteriormente se seleccionó la región de linfocitos T (CD45+CD3+) a partir de la cual se analizaron las subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺.

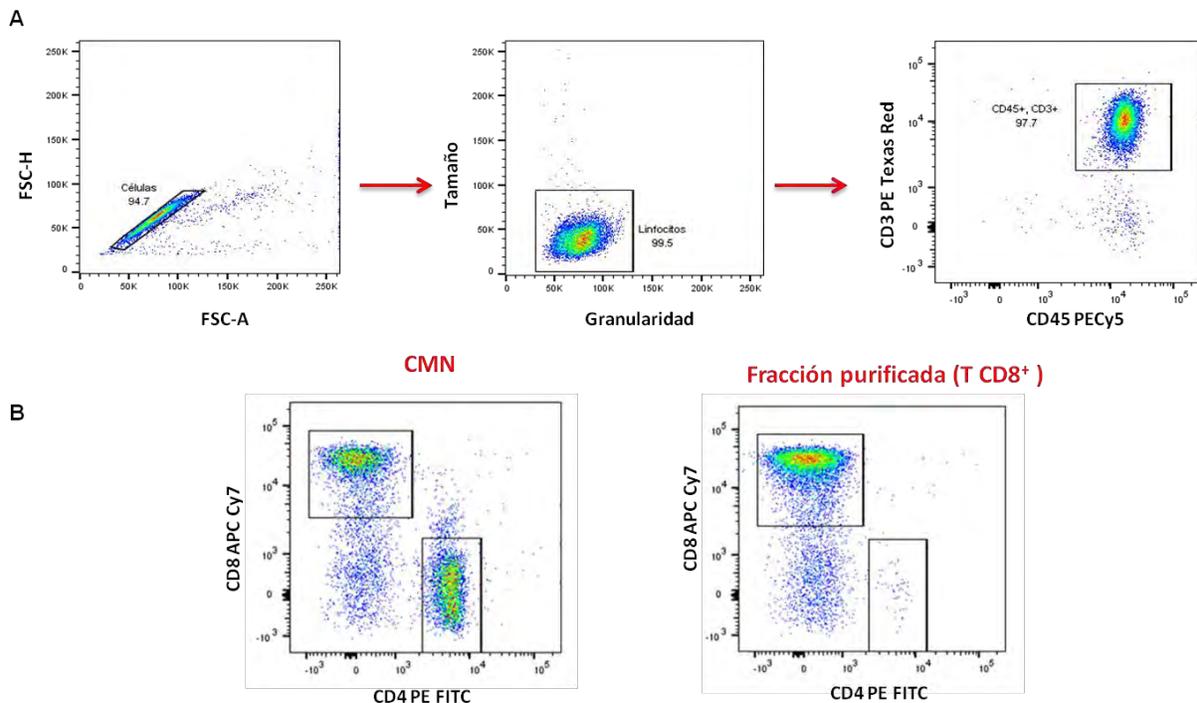


Figura 4. A) Estrategia de análisis de las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ por citometría de flujo. B) Inmunofenotipificación de las células mononucleares y de las fracción de células purificadas de una muestra representativa de sangre periférica de sujeto sano.

En la Figura 4B se muestra el análisis citométrico de las poblaciones T CD8⁺ (PE-Cy7) y T CD4⁺ (FITC) presentes en una muestra de células mononucleares (antes de la purificación) y su correspondiente fracción purificada. Las células analizadas provienen de una muestra representativa de sangre periférica de sujeto sano. Como se puede observar, después de realizar la purificación de las CMN con perlas magnéticas la cantidad de células T CD8⁺ aumentó considerablemente. En la Tabla 1 se muestran los porcentajes de linfocitos T CD8⁺ obtenidos después de realizar la purificación a las distintas muestras obtenidas de pacientes y sujetos sanos.

Tabla 1. Porcentaje de linfocitos T CD8⁺ después de la purificación

	Sano		Paciente	
	SP n=4	SP n=3	DP n=5	
CD8+ (%)	87.0±1.7	90.7±7.4	90.7±3.6	

Porcentaje de linfocitos T CD8⁺ purificados a partir de muestras de sangre periférica (SP) de sujetos sanos y de derrame pleural (DP) y sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma pulmonar. Se muestra la media ± desviación estándar.

8.2 Estimulación de los linfocitos T CD8⁺ purificados

Después de la purificación de los linfocitos T CD8⁺, éstos fueron estimulados con anticuerpo anti-CD3 por un periodo de 48 h. A partir de las 24 h de estimulación se observó al microscopio la presencia de colonias de linfoblastos comparado con los linfocitos sin estimular. Ver Figura 5

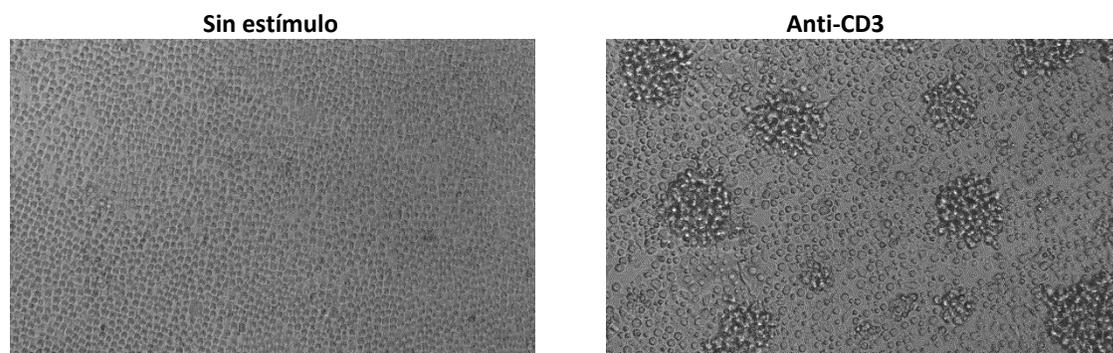


Figura 5. Cambios morfológicos de los linfocitos T CD8⁺ después de haber sido estimulados con anticuerpo anti-CD3 por 48 h (10X). Los linfocitos presentados pertenecen a una muestra representativa proveniente de sangre periférica de sujeto sano.

Para corroborar que el estímulo con el anticuerpo policlonal anti-CD3 activaba a los linfocitos T, la fracción de células no T CD8+ correspondiente a los linfocitos T CD4+ de cada muestra fue estimulada bajo las mismas condiciones. Después de 48 h de estimulación, se realizó la inmunofenotipificación de las células estimuladas y sin estímulo con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD137. Se analizó en el citómetro de flujo siguiendo la estrategia de análisis descrita previamente. De la población de linfocitos T se cuantificó la población de células positivas al marcador de activación CD137. En la Figura 6 se observan los gráficos de dispersión de la marca CD137 APC en función de CD3 FITC para células sin estímulo y estimuladas con anti-CD3 provenientes de muestras representativas de derrame pleural de paciente y de sangre periférica de sujeto sano.

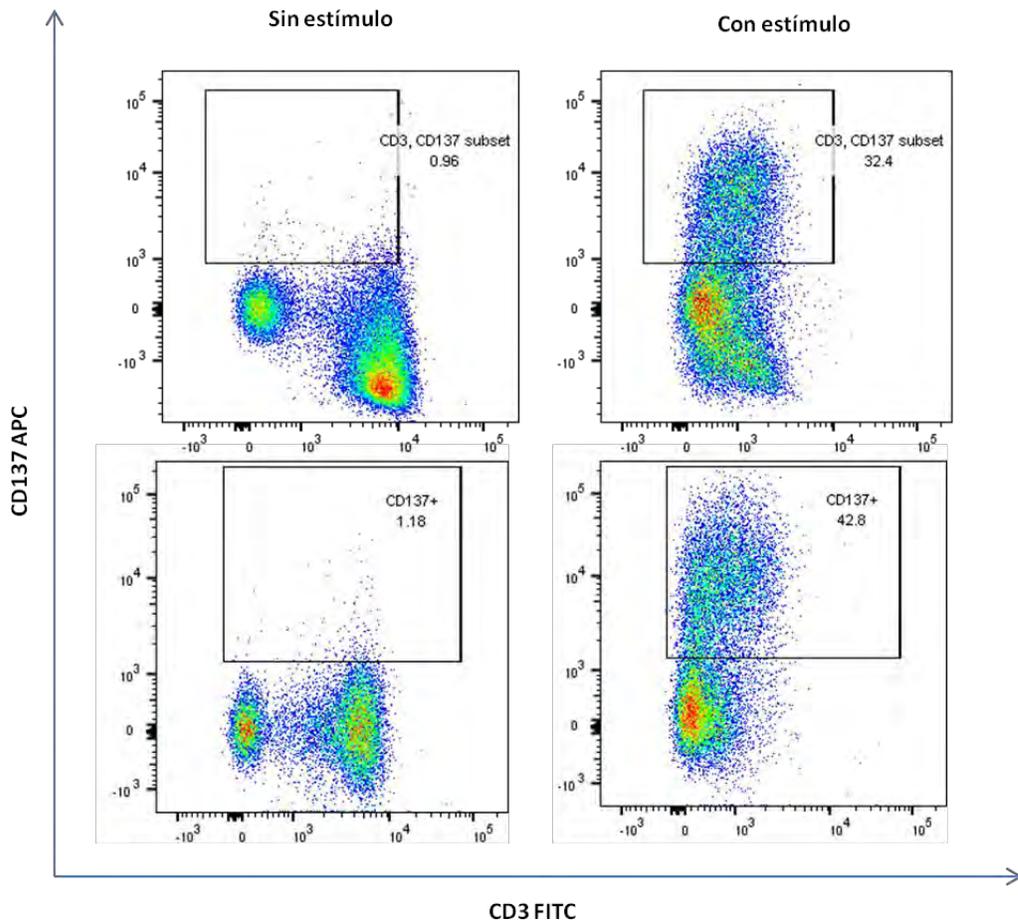


Figura 6. Inmunofenotipificación de los linfocitos T sin estímulo y estimulados con anticuerpo anti-CD3. Los gráficos de dispersión de la parte superior corresponden a los resultados representativos de derrame pleural maligno, mientras que los gráficos de la parte inferior corresponden a resultados representativos para sujeto sano.

La expresión de la molécula CD137 es inducida por la activación de las células T y por tanto no puede ser detectada en linfocitos T en reposo, por lo anterior es comúnmente utilizada como marcador de activación.^[56] Como se observa en la Figura 6, el porcentaje de células CD137+ fue de 32.4% en las células T estimuladas de la muestra representativa de derrame pleural y de 42.8% en la muestra de células T estimuladas provenientes de sangre periférica de sujeto sano. Se comprobó que el anticuerpo anti-CD3 activa a los linfocitos T debido a que en éstos se detectó un gran aumento en la expresión de la molécula CD137 comparado con la poca o nula expresión encontrada en la fracción de células sin estímulo (Ver Tabla 2). Además, a partir de los cambios morfológicos observados al microscopio se puede concluir que los linfocitos T CD8⁺ fueron activados con el anticuerpo anti-CD3.

Tabla 2. Porcentaje de linfocitos T CD137+ después de la estimulación con anticuerpo policlonal anti-CD3.

	Sano	Paciente	
	SP n=2	SP n=2	LP n=3
CD137+ (%)	36.8 ± 9.0	44.4 ± 13.1	38.3 ± 6.8

Las células estimuladas corresponden a los linfocitos no T CD8+ de las muestras de sangre periférica (SP) y derrame pleural (DP) de pacientes con cáncer pulmonar y SP de sujetos sanos. Se muestra la media ± desviación estándar

8.3 Estandarización de la técnica inmuno-PCR para las proteínas: actina, NRF-1 y NRF-2

Para evaluar si los anticuerpos anti-actina, anti-NRF-1 y anti-NRF-2 biotinilados se unían a los oligonucleótidos 5' y 3' conjugados con estreptavidina para formar las sondas del inmuno-PCR, se realizaron pruebas de proximidad forzada. En esta prueba, cada anticuerpo fue diluido a una concentración de 200 nM e incubado en un volumen 1:1 con una mezcla de oligonucleótidos 5' y 3' a la misma concentración. Adicionalmente se preparó un control negativo donde sólo se agregó la mezcla de oligonucleótidos y buffer. Posteriormente se realizó la reacción de ligasa y de PCR en tiempo real como se describe en la Metodología.

La curva de amplificación para el anticuerpo anti-actina y su respectivo control negativo se muestra en la Figura 7. A partir de los valores de Ct (threshold cycle) obtenidos se calculó la diferencia de ciclos de amplificación (ΔCt) entre la sonda y el control negativo. Se considera que el anticuerpo es capaz de unirse a los oligonucleótidos para formar las sondas y por tanto, es apto para ser utilizado en ensayos de proximidad cuando el ΔCt entre éste y el control negativo es mayor a 8.5 ciclos de amplificación.

Todos los anticuerpos pasaron la prueba de proximidad forzada obteniéndose un ΔCt de 10.75 ciclos de amplificación para el anticuerpo anti-NRF-1, ΔCt de 10.88 ciclos de amplificación para anti-NRF-2 y 11.01 ciclos para anti-actina.

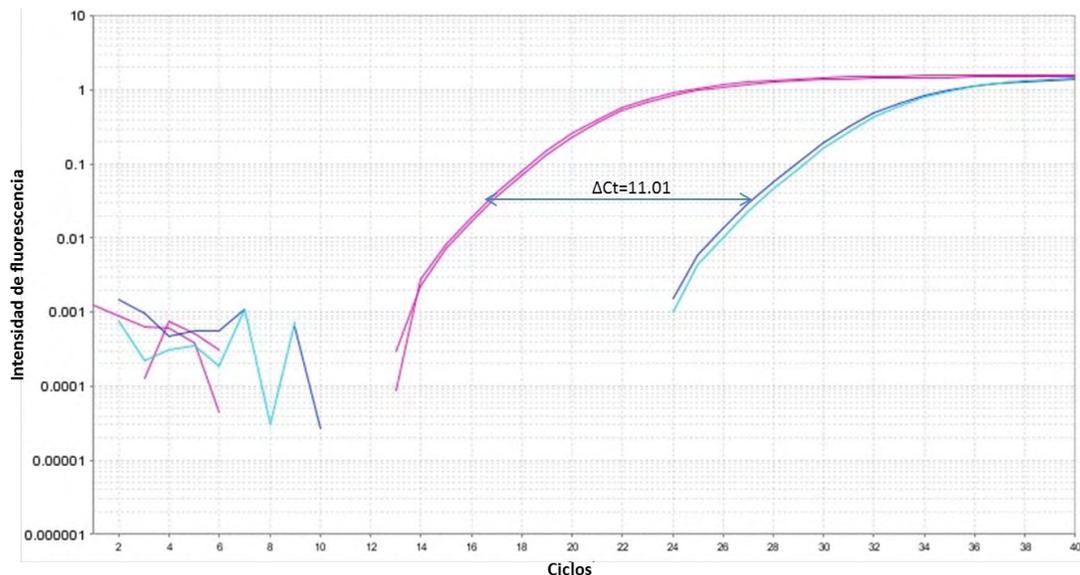


Figura 7. Prueba de proximidad del anticuerpo anti-actina. Las curvas de amplificación para el anticuerpo anti-actina se muestran en rosa, mientras que las curvas de amplificación para el control negativo se muestran en azul.

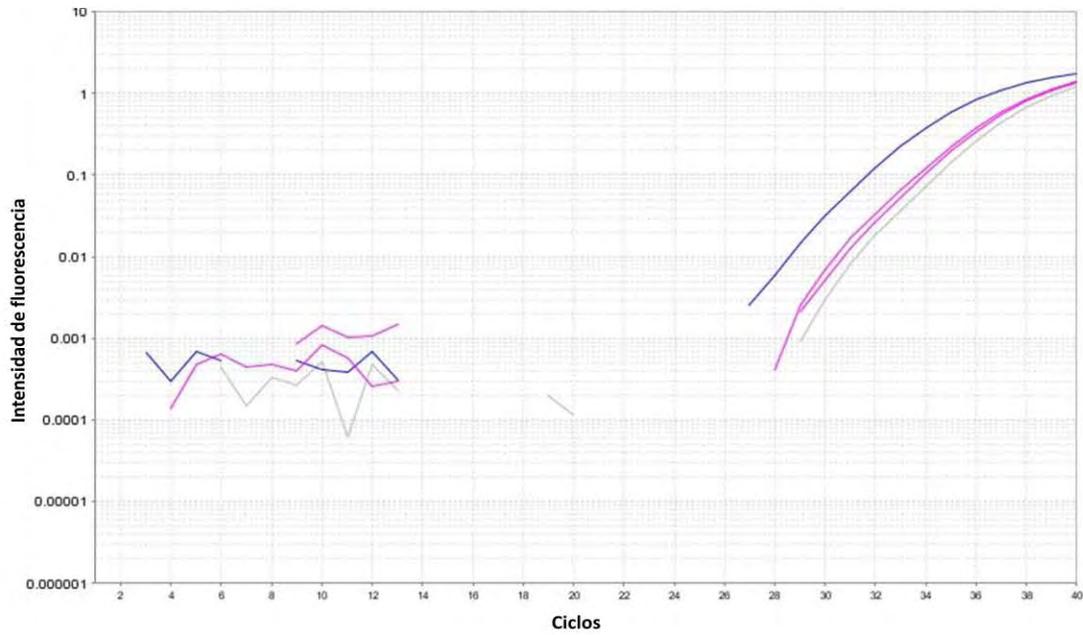
Posteriormente, se determinó la concentración óptima de cada anticuerpo realizando distintos inmuno-PCR a partir de lisados de la línea celular A-427, en la cual se ha reportado la expresión de actina.^[57] La concentración óptima de anticuerpo fue seleccionada con base en la diferencia del Ct de las muestras y el del control negativo.

En la Figuras 8 se muestran las curvas de amplificación de los inmuno-PCR realizados para la determinación de la concentración óptima del anticuerpo anti-actina. Los resultados obtenidos para los anticuerpos anti-NRF-1 y anti-NRF-2 fueron similares, obteniéndose la misma concentración óptima para los tres anticuerpos y por lo tanto, las curvas de amplificación de los NRF's no se muestran. Para asegurar que la cantidad de anticuerpo fuera mayor que la cantidad de antígeno a analizar, las concentraciones de anticuerpo probadas en la Figura 8A fueron de 50 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g/ml}$, mientras que la concentración de lisado celular se mantuvo constante (20 células/ μl). Dicha concentración de lisado es la recomendada por el fabricante; sin embargo, como se puede observar, los valores de Ct de las muestras se encuentran muy cercanos a los del control negativo por lo que se realizaron más ensayos aumentando la concentración de lisado celular a 100 células/ μl y utilizando las mismas concentraciones de anticuerpo anti-actina. Como se observa en la Figura 8B, aumentando la concentración de lisado se logró incrementar los valores de ΔCt de las muestras con respecto al control negativo. De las dos concentraciones de anticuerpo utilizadas, la mayor diferencia en ciclos de amplificación con respecto al control negativo se obtuvo con 100 $\mu\text{g/ml}$, por lo anterior se decidió utilizar esta concentración en los ensayos posteriores. La concentración de anticuerpo anti-NRF-1 y anti-NRF-2 determinada mediante los inmuno-PCR fue también de 100 $\mu\text{g/ml}$.

Finalmente, para determinar la concentración óptima de lisado celular de linfocitos T CD8⁺, se realizaron ensayos empleando diluciones seriadas de lisado celular y manteniendo la concentración de anticuerpos constante (100 $\mu\text{g/ml}$). Nuevamente, la concentración óptima de lisado fue seleccionada según el criterio de ΔCt . Inicialmente, se probaron 11 diluciones seriadas (1:2) a partir de una concentración inicial de 500 células/ μl , sin embargo, como se muestra en la Figura 9A para la determinación de actina, no se observó gran diferencia entre el valor de Ct de las muestras y el del control negativo. Por lo anterior se realizaron ensayos utilizando concentraciones mayores de lisado celular: 1500, 1000, 750 y 700 células/ μl . Como se puede apreciar en la Figura 9B, utilizando mayores concentraciones de lisado se observó mayor diferencia de ΔCt con respecto al

control negativo. Finalmente, se determinó que la concentración óptima de lisado celular a utilizar en los ensayos posteriores sería de 1500 células/ μ l.

A



B

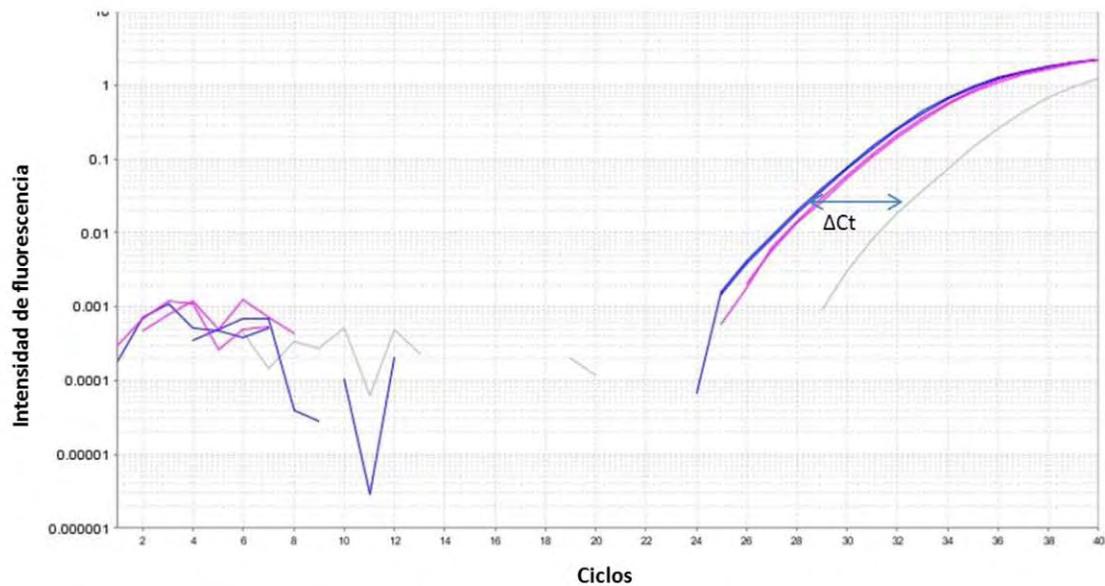


Figura 8. Inmuno-PCR para la detección de la proteína actina a partir de un lisado de la línea celular A-427 utilizando una concentración de 20 cels/ μ l (A) y 100 cels/ μ l (B). Se observan las curvas de amplificación donde se utilizaron concentraciones de anticuerpo de 100 μ g/ml (azul), 50 μ g/ml (morado) y el control negativo (gris)

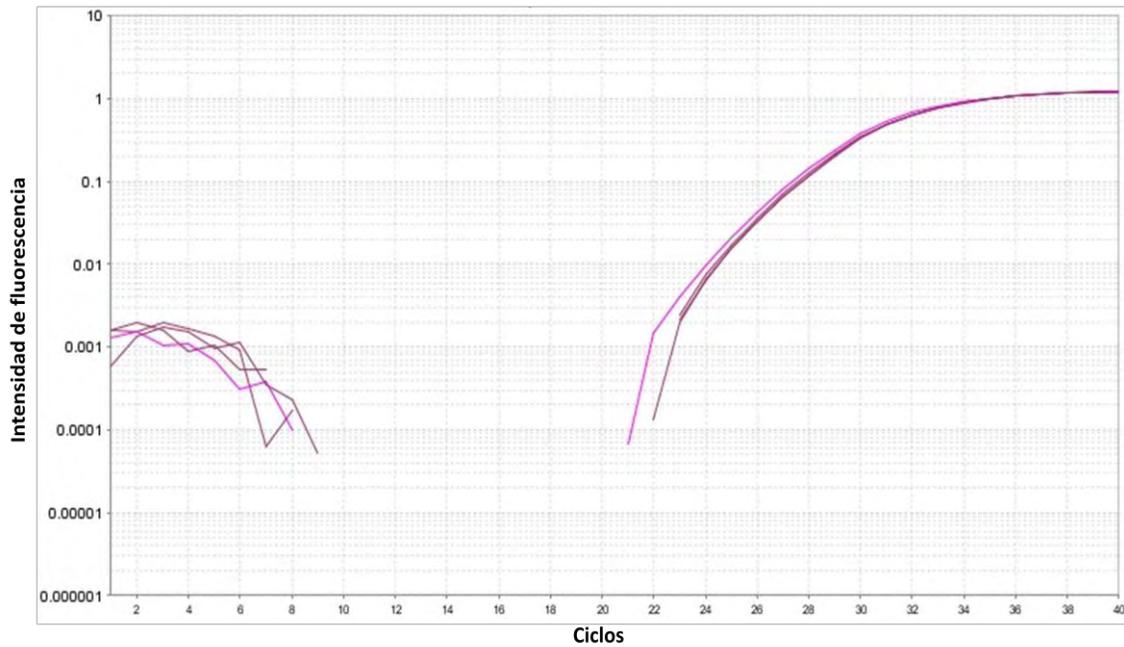
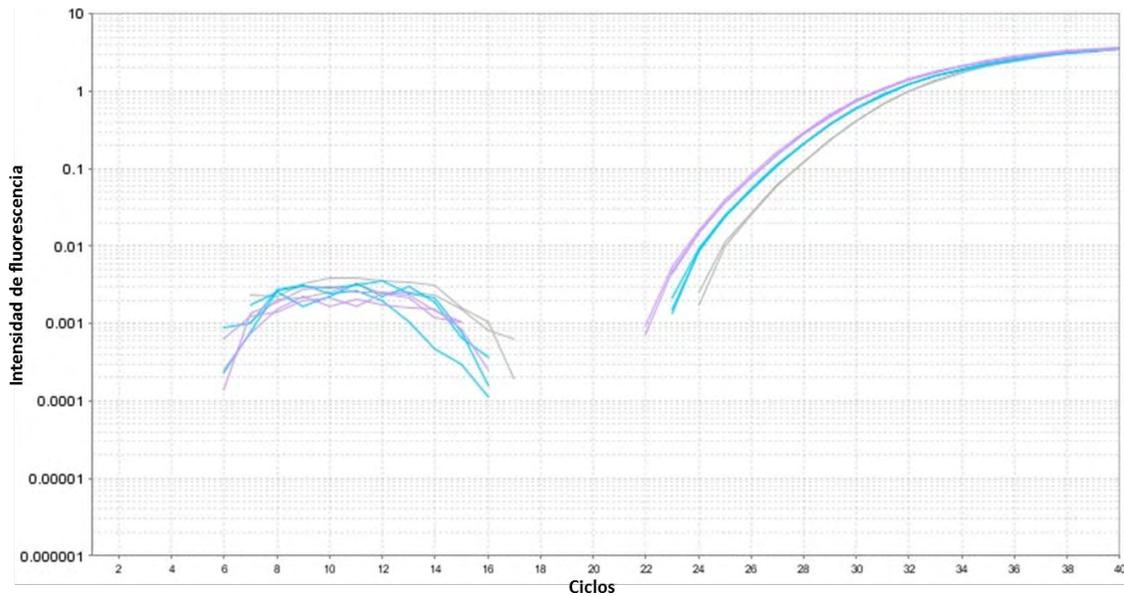
A**B**

Figura 9. Inmuno-PCR para la determinación de la concentración óptima de lisado celular proveniente de derrame pleural de paciente con adenocarcinoma pulmonar. La concentración de anticuerpo anti-actina utilizada fue de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en todos los ensayos. A) Se observan las curvas de amplificación donde se utilizaron concentraciones de lisado celular de 125 $\text{cél}/\mu\text{l}$ (morado), 32 $\text{cél}/\mu\text{l}$ (rojo vino) y el control negativo (gris). B) Se observan las curvas de amplificación donde se utilizaron concentraciones de lisado de 1500 $\text{cél}/\mu\text{l}$ (morado) y 750 $\text{cél}/\mu\text{l}$ (azul) y el control negativo (gris).

8.4 Cuantificación relativa de las proteínas NRF-1 y NRF-2 en muestras de derrame pleural y sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma pulmonar y sangre periférica de sujeto sano.

Utilizando las concentraciones óptimas tanto de anticuerpos como de lisado celular, se realizaron varios ensayos de inmuno-PCR para la cuantificación relativa de las proteínas NRF-1 y NRF-2 en lisados de linfocitos T CD8⁺ purificados (sin estímulo y estimulados), con el fin de determinar las diferencias en la expresión de dichos factores de transcripción después de la activación del complejo CD3-TCR.

Para determinar la expresión relativa de las proteínas NRF-1 y NRF-2 en linfocitos T CD8⁺ sin estímulo se realizó una cuantificación relativa por el método de Δ Ct, ajustando los valores obtenidos para las proteínas de interés con respecto a los valores obtenidos para la proteína actina proveniente de la misma muestra. En la Figura 10 se muestran los resultados obtenidos para la cuantificación relativa de las proteínas NRF-1 y NRF-2 en linfocitos T CD8⁺ sin estimular, provenientes de sangre periférica de sujetos sanos (control), así como de linfocitos T CD8⁺ provenientes de sangre periférica y derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar. En las gráficas de barra se muestra el valor promedio de las veces de cambio en la expresión de la proteína con respecto a la expresión de actina. Como se puede observar al comparar los niveles de expresión de ambas proteínas en el grupo control, se encontró que a nivel basal la proteína NRF-1 se encuentra mayormente expresada en comparación con NRF-2. En cambio, los niveles de expresión relativa de ambas proteínas fueron muy similares en los grupos de sangre periférica y derrame pleural de pacientes con cáncer pulmonar.

Con respecto a NRF-1, se encontró una tendencia a disminuir la expresión de dicha proteína en los linfocitos T CD8⁺ de los grupos de sangre periférica y derrame pleural de pacientes en comparación con el grupo control. En el caso de NRF-2, el valor promedio de expresión basal encontrada para los linfocitos T CD8⁺ provenientes de sangre periférica de pacientes fue muy similar al encontrado en el grupo control. Por otro lado, en el grupo de derrame pleural maligno se observa

una tendencia de disminución de la expresión de NRF-2 con respecto al grupo de sangre periférica de pacientes.

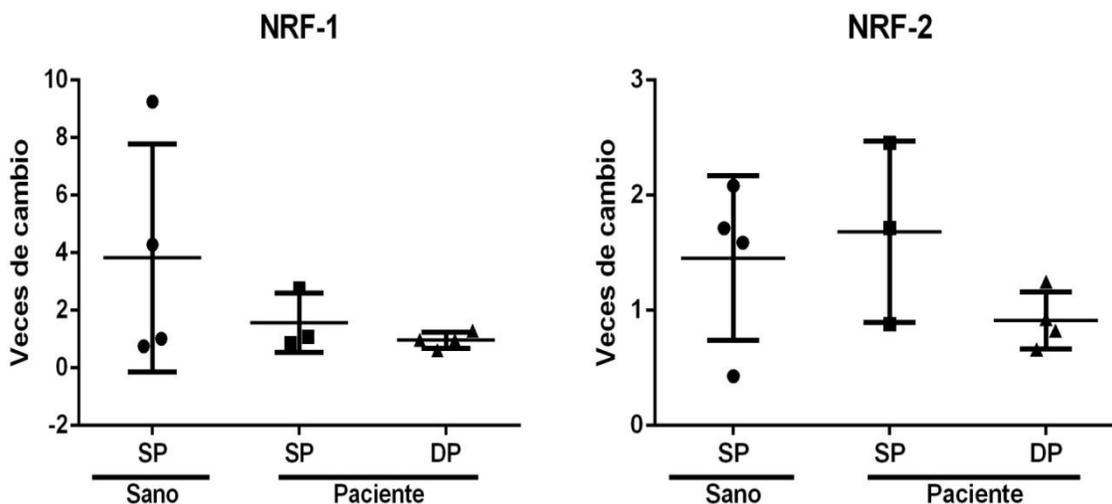


Figura 10. Expresión relativa de las proteínas NRF-1 y NRF-2 en linfocitos T CD8⁺ sin estímulo. Las barras representan el valor promedio de las veces de cambio en la expresión de NRF-1 y NRF-2 con respecto a la expresión de la proteína endógena actina. En los gráficos también se muestra la desviación estándar de los grupos de estudio: sangre periférica (SP) de sujeto sano o control (n=4), derrame pleural (DP) de pacientes con adenocarcinoma pulmonar (n=4) y sangre periférica de pacientes (n=3).

Posteriormente, para determinar el cambio en la expresión de NRF-1 y NRF-2 en linfocitos T CD8⁺ después de la estimulación policlonal con anticuerpo anti-CD3, se realizó una cuantificación relativa por el método de $\Delta\Delta Ct$, normalizando los valores obtenidos para las muestras de interés (linfocitos estimulados) con respecto a la condición sin estímulo. En la Figura 11 se muestran los resultados obtenidos para la cuantificación relativa de las proteínas NRF-1 y NRF-2 en linfocitos T CD8⁺ de los distintos grupos de estudio. En los gráficos de dispersión se muestra el valor promedio de las veces de cambio en la expresión de la proteína con respecto a su expresión en linfocitos no estimulados.

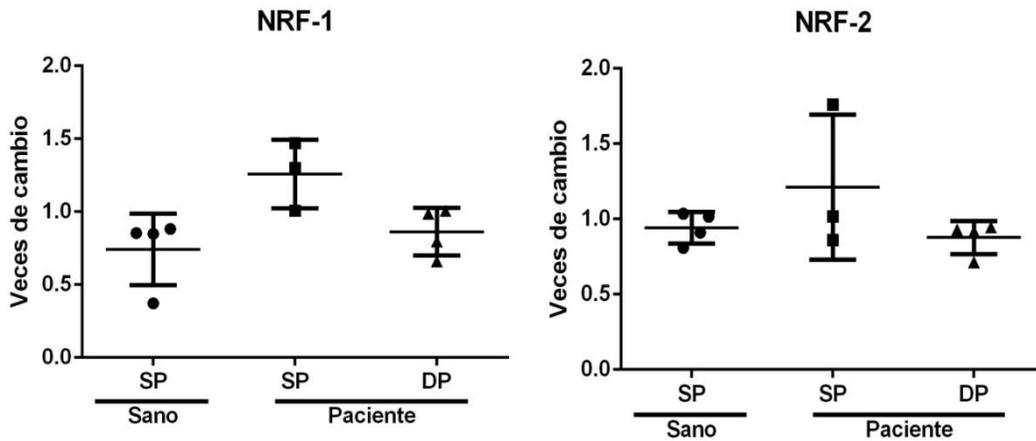


Figura 11. Expresión relativa de las proteínas NRF-1 y NRF-2 en linfocitos T CD8+ estimulados con anti-CD3. Se presenta el valor promedio de las veces de cambio en la expresión de NRF-1 y NRF-2 y las desviaciones estándar de las muestras provenientes de sangre periférica de sujeto sano o control (n=4), de derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar o DP (n=4) y de sangre periférica de pacientes o SP Paciente (n=3).

Como se puede observar en la Figura 11, después de la estimulación con anticuerpo anti-CD3, en los linfocitos T CD8⁺ provenientes de sujetos sanos los niveles de expresión de NRF-1 disminuyen ligeramente en comparación con su expresión basal. Por otro lado, en los linfocitos T CD8⁺ provenientes de sangre periférica de paciente se observa un ligero aumento en la expresión de NRF-1 en comparación con los otros grupos de estudio, mientras que en los linfocitos provenientes de derrame pleural maligno no se observó cambio en los niveles de expresión de esta proteína.

En cuanto a NRF-2, se observa que en los linfocitos T CD8⁺ provenientes del grupo control y derrame pleural de paciente, la expresión de esta proteína se mantiene ligeramente por debajo de su expresión basal. Por otro lado, en dos de las tres muestras de linfocitos T CD8⁺ provenientes de sangre periférica de pacientes se observó que los niveles de expresión de NRF-2 permanecieron similares a los basales, mientras que en la tercera muestra se observó un incremento en la expresión de esta proteína.

9. DISCUSIÓN

Los linfocitos T CD8⁺ tienen un papel importante en la respuesta inmune antitumoral^[29]. Sin embargo, las células tumorales han desarrollado distintos mecanismos para evadir la actividad de estas células del sistema inmune. Particularmente, nuestro grupo de trabajo ha reportado que en derrames pleurales de pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), la subpoblación de células T CD8⁺ se encuentra reducida en comparación con los valores encontrados en sangre periférica y que dicha subpoblación es susceptible a sufrir muerte celular inducida por activación (AICD).^[22, 53] Lo anterior limita la cantidad de muestra biológica e impide la implementación de inmunoensayos convencionales en la determinación de proteínas de interés. Por esto, en el presente trabajo se estandarizó la técnica de inmuno-PCR para la cuantificación de las proteínas de estudio. Sobre esta técnica se han reportado incrementos en el límite de detección desde 100 hasta 10⁵ veces comparado con ELISA.^[58, 59] La mayor sensibilidad de esta técnica a su vez, disminuye la cantidad de muestra biológica requerida para la realización del ensayo.^[58]

Después de optimizar la concentración de anticuerpos, lisado celular y volumen de los reactivos empleados, se logró la detección de las proteínas NRF-1, NRF-2 y actina en lisados de linfocitos T CD8⁺ de sangre periférica y derrame pleural maligno. Sin embargo, contrario a lo descrito anteriormente para la técnica, nuestros resultados indican que el inmuno-PCR presenta una sensibilidad limitada en la detección de estas proteínas en linfocitos T CD8⁺, ya que se necesitó utilizar una concentración de 1500 células/μl para poder detectar las proteínas. Dicha concentración es mucho mayor a la reportada por otros autores que han utilizado esta técnica en diferentes tipos celulares.^[60] Por otro lado, nuestros resultados coinciden con lo reportado por Gehwolf R. y cols.^[61] quienes utilizaron una modalidad del inmuno-PCR en la detección de homodímeros receptores en la superficie de linfocitos T totales. Los autores reportaron que la sensibilidad de la técnica no fue tan convincente ya que se necesitó utilizar más de 10⁴ células para la detección de los receptores.

A pesar de lo anterior, la utilización de la técnica inmuno-PCR permitió el análisis de la expresión de las moléculas NRF-1 y NRF-2, lo cual no habría sido posible mediante otras técnicas como Western Blot o ELISA ya que la cantidad de células T CD8⁺ requerida para dichas técnicas es mayor a la presente en las muestras de derrame pleural de pacientes con cáncer pulmonar.

Por otro lado, se ha reportado que en NSCLC los linfocitos T citotóxicos provenientes tanto de TILs como de derrame pleural se encuentran funcionalmente dañados y presentan baja o nula respuesta al estímulo de activación de la célula T.^[22]

Una parte central en el proceso de activación de la célula T es el cambio en el metabolismo celular. Se ha comprobado que las mitocondrias participan activamente en la señalización celular y que tienen un rol crítico en la regulación de la activación de la célula T.^[51] Lo anterior se logra mediante cambios dinámicos en la cantidad y actividad de estos organelos durante el proceso de activación.

Para estudiar la activación de la biogénesis mitocondrial se ha evaluado la expresión de NRF-1 y NRF-2, factores de transcripción que regulan la expresión de proteínas críticas involucradas en la biogénesis mitocondrial.^[62] Se ha reportado la inducción de la expresión del mRNA de NRF-1 y NRF-2 en distintos tipos celulares como respuesta a programas de proliferación y diferenciación mitocondrial.^[18, 33, 37] Sin embargo, no se ha estudiado la expresión de estos factores en linfocitos T CD8⁺ y los cambios en su expresión durante el proceso de activación. En el presente trabajo se analizó la expresión de NRF-1 y NRF-2 en linfocitos T CD8⁺ provenientes de sangre periférica y derrame pleural de pacientes con adenocarcinoma pulmonar, así como en linfocitos T CD8⁺ de sangre periférica de sujetos sanos. Adicionalmente, también se evaluaron los niveles de expresión de estos factores tras la estimulación policlonal de las células T CD8⁺ con anticuerpo anti-CD3 en los distintos grupos de estudio para determinar el efecto que tiene la activación del complejo TCR-CD3 en la expresión de dichos factores de transcripción.

Se encontró que en condiciones basales, los linfocitos T CD8⁺ provenientes de sangre periférica de sujetos sanos (grupo control) expresan mayores niveles de NRF-1 que NRF-2. Lo anterior podría estar relacionado con diferencias en la regulación de la actividad de ambos factores. Mientras que miembros de la familia PGC-1 como PGC-1 α y PRC pueden unirse y activar directamente a NRF-1 para promover la expresión de proteínas involucradas en la biogénesis mitocondrial, existe evidencia de que éstos requieren de proteínas intermediarias como el factor de la célula huésped (HCF) para interactuar con NRF-2.^[42] Lo anterior hace que la regulación de la actividad de NRF-2 sea más estricta que la de NRF-1 y puede sugerir que otro tipo de condiciones son requeridas para la expresión de este factor. Adicionalmente, se ha reportado un mayor número de promotores con sitios de reconocimiento para NRF-1 que para NRF-2, involucrando al primero en la expresión de un mayor número de proteínas y funciones mitocondriales.^[33]

Por otro lado, la disminución de los niveles de expresión de NRF-1 y NRF-2 encontrada en los linfocitos T CD8⁺ de derrame pleural maligno, así como la disminución de NRF-1 en los linfocitos provenientes de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma pulmonar, podría indicar que en estas células existe una reducción tanto de la actividad de la cadena transportadora de electrones, como de la biogénesis mitocondrial. Nuestros resultados sugieren que de los tres grupos analizados, los linfocitos T CD8⁺ provenientes de derrame pleural realizan biogénesis mitocondrial y fosforilación oxidativa en menor grado, ya que en éstos se encontraron los menores niveles de expresión de NRF-1. Sin embargo, en estudios previos de nuestro grupo de trabajo se ha reportado que los linfocitos T CD8⁺ de derrame pleural poseen mayor contenido de masa mitocondrial que los linfocitos T CD8⁺ de sangre periférica de pacientes,^[63] lo cual sugiere que los primeros realizan la biogénesis mitocondrial en mayor grado.

Tomando en cuenta lo anterior, nuestros resultados sugieren que el incremento en la masa mitocondrial observado previamente en los linfocitos T CD8⁺ de derrame pleural maligno no es ocasionado por una mayor actividad de la biogénesis mitocondrial en estas células. Alternativamente, el mayor contenido de masa

mitocondrial encontrado podría deberse a un incremento en el proceso de fusión mitocondrial en dichas células. Lo anterior ha sido observado en células T de memoria por Buck y cols.^[64], quienes reportaron que en esta subpoblación, a diferencia de la efectora, las mitocondrias poseen mayor tamaño, forman túbulos elongados y poseen mayores niveles de expresión de Mfn2 y Opa1, mediadores importantes del proceso de fusión mitocondrial. Lo anterior indica que en los linfocitos de derrame pleural maligno, en donde se ha reportado que el fenotipo de células T CD8⁺ predominante es el de memoria presenten mayor contenido de masa mitocondrial sin presentar mayor actividad de biogénesis mitocondrial.^[22]

Después de la activación del TCR, se ha reportado que las células T presentan un rápido incremento en su masa mitocondrial, así como de los niveles de fosforilación oxidativa y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la mitocondria, después de lo cual ocurre la reprogramación metabólica a glicólisis aeróbica necesaria para sustentar el crecimiento, proliferación y diferenciación celular.^[51]

Se encontró que después de 48 h de estimulación con el anticuerpo anti-CD3, en los linfocitos T CD8⁺ de sangre periférica de sujeto sano los niveles de expresión de NRF-1 disminuyeron ligeramente, mientras que los de NRF-2 se mantuvieron ligeramente por debajo de su expresión basal. Lo anterior sugiere que a las 48 h de estimulación las células T CD8⁺ de este grupo han disminuido los niveles de biogénesis mitocondrial y actividad de la cadena transportadora de electrones ligeramente por debajo de los niveles basales. En este sentido, Yao y cols.^[65] reportaron que tras la estimulación de linfocitos T CD8⁺ con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 por 72 h, no se observó aumento en la masa mitocondrial de las células activadas, incluso se reportó el incremento de una población con menor contenido mitocondrial. Por otro lado, D' Souza y cols. reportaron que después de la estimulación de células T totales mediante la vía TCR, inicialmente se observó un incremento en el potencial de membrana mitocondrial, sin embargo, los autores reportaron que después de las 24 h de estímulo no se observó mayor incremento en el potencial.^[51] Nuestros resultados, son consistentes con los de los autores

mencionados anteriormente y en conjunto pueden ser atribuidos a que a las 48 h de estimulación, las células T CD8⁺ han comenzado a reprogramar su metabolismo a uno principalmente glicolítico, por lo que la mitocondria deja de ser la principal fuente de ATP para la célula. [43, 45]

Por otro lado, se observó que los linfocitos T CD8⁺ de derrame pleural mantuvieron los niveles de expresión de NRF-1 y NRF-2 prácticamente iguales a los de los linfocitos sin estimular, el que no haya ocurrido una disminución en los niveles de expresión de estos factores podría deberse a los bajos niveles de expresión basal que presentaron estas células. Con respecto a los linfocitos T CD8⁺ de sangre periférica, se observó un incremento en la expresión de ambos factores de transcripción. Lo anterior sugiere que en los linfocitos T CD8⁺ de pacientes con adenocarcinoma pulmonar existe una desregulación de estos factores de transcripción durante la activación mediada por el complejo TCR-CD3 y que las células T CD8⁺ responden de forma distinta según el compartimiento anatómico en el que se encuentren.

La desregulación en la expresión de NRF-1 y NRF-2 durante el proceso activación podría atribuirse a defectos en la señalización celular. Con respecto a lo anterior, en un estudio previo de nuestro grupo de trabajo se reportó una disminución en la expresión de la cadena ϵ del complejo CD3 en linfocitos T de pacientes con adenocarcinoma pulmonar. En dicho estudio se propuso que dicha reducción podría alterar eventos bioquímicos dependientes del TCR durante la activación. [29] Adicionalmente se ha reportado que muchas de las vías de señalización cascada abajo al TCR se encuentran implicadas tanto en la función como en la biogénesis de las mitocondrias (PKC, MAPK/ERK y aquellas vías relacionadas con el Ca²⁺). De esta forma, defectos en la expresión del complejo TCR/CD3, como el reportado en CD3 ϵ , en los linfocitos T CD8⁺ de pacientes con NSCLC podrían ser responsables de que la modificación de la expresión de NRF-1 y NRF-2 no sea al mismo nivel que en los linfocitos T CD8⁺ de sujeto sano. Aunado a lo anterior, el aumento en la expresión de ambos factores de transcripción después de la estimulación de los linfocitos de sangre periférica de pacientes podría indicar que

al no ser capaces de realizar el switch metabólico, estos linfocitos podrían estar basando su metabolismo en la fosforilación oxidativa. Sin embargo, para comprobar lo anterior es necesaria la realización de ensayos posteriores, donde se mida la expresión de estos factores después de la estimulación en otras condiciones, por ejemplo, utilizando moléculas coestimuladoras.

10. CONCLUSIONES

- ❖ Mediante la técnica de inmuno-PCR se logró la detección de las proteínas actina, NRF-1 y NRF-2 en lisados de linfocitos T CD8+, utilizando una concentración de 100 µg/ml de anticuerpo policlonal y una concentración de lisado celular de 1500 cels/µl
- ❖ Los linfocitos T CD8+ provenientes de SP de sujetos sanos mostraron mayores niveles de expresión basal de NRF-1 que los linfocitos T CD8+ provenientes de SP y DP de pacientes con adenocarcinoma pulmonar, encontrando los menores niveles de expresión en el grupo de DP.
- ❖ Los niveles de expresión basal de NRF-2 en linfocitos T CD8+ de DP de pacientes con cáncer pulmonar se encuentran reducidos en comparación con los de los linfocitos de SP tanto de pacientes como de sujetos sanos.
- ❖ Tras la estimulación vía TCR, los linfocitos T CD8⁺ de SP de sujetos sanos disminuyeron la expresión de NRF-1 y mantuvieron constantes los niveles de NRF-2. Dicho fenómeno no se observó en los linfocitos T CD8+ tanto de DP como de SP de pacientes con cáncer pulmonar, indicando que en estas células existe una desregulación de estos factores de transcripción durante el proceso de activación vía TCR.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, 2015. **136**(5): p. E359-86.
2. Vesely, M.D., et al., *Natural innate and adaptive immunity to cancer*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 235-71.
3. Romero-Garcia, S., et al., *Tumor cell metabolism: an integral view*. Cancer Biol Ther, 2011. **12**(11): p. 939-48.
4. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
5. Nagy, J.A., et al., *Heterogeneity of the tumor vasculature*. Semin Thromb Hemost, 2010. **36**(3): p. 321-31.
6. Yang, L., Y. Pang, and H.L. Moses, *TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression*. Trends Immunol, 2010. **31**(6): p. 220-7.
7. Jadus, M.R., et al., *Lung cancer: a classic example of tumor escape and progression while providing opportunities for immunological intervention*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 160724.
8. Minna, J.D., J.A. Roth, and A.F. Gazdar, *Focus on lung cancer*. Cancer Cell, 2002. **1**(1): p. 49-52.
9. Collins, L.G., et al., *Lung cancer: diagnosis and management*. Am Fam Physician, 2007. **75**(1): p. 56-63.
10. Rivero-Serrano, O., *Neumología*. 2009.
11. Noppen, M., *Normal volume and cellular contents of pleural fluid*. Curr Opin Pulm Med, 2001. **7**(4): p. 180-2.
12. Heffner, J.E., *Diagnosis and management of malignant pleural effusions*. Respirology, 2008. **13**(1): p. 5-20.
13. Prado-Garcia, H., et al., *Effector, memory and naive CD8+ T cells in peripheral blood and pleural effusion from lung adenocarcinoma patients*. Lung Cancer, 2005. **47**(3): p. 361-71.
14. Atanackovic, D., et al., *Characterization of effusion-infiltrating T cells: benign versus malignant effusions*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(8): p. 2600-8.
15. Prado-Garcia, H., F. Avila-Moreno, and J.S. Lopez-Gonzalez, *[Cytotoxic T lymphocytes in cancer and autoimmunity]*. Rev Invest Clin, 2004. **56**(5): p. 629-39.
16. Abbas, A.K. and A.H. Lichtman, *Inmunología celular y molecular*. 2004: Elsevier.
17. Cronin, S.J. and J.M. Penninger, *From T-cell activation signals to signaling control of anti-cancer immunity*. Immunol Rev, 2007. **220**: p. 151-68.
18. Williams, M.A. and M.J. Bevan, *Effector and memory CTL differentiation*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 171-92.
19. Kaech, S.M. and W. Cui, *Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(11): p. 749-761.
20. Vigneron, N., et al., *Database of T cell-defined human tumor antigens: the 2013 update*. Cancer Immun, 2013. **13**.
21. Yee, C., et al., *Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8(+) T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: In vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(25): p. 16168-16173.
22. Prado-Garcia, H., et al., *Tumor-induced CD8+ T-cell dysfunction in lung cancer patients*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 741741.

23. Kirkwood, J.M., et al., *Immunotherapy of cancer in 2012*. CA Cancer J Clin, 2012. **62**(5): p. 309-35.
24. Dieu-Nosjean, M.C., et al., *Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures*. J Clin Oncol, 2008. **26**(27): p. 4410-7.
25. Al-Shibli, K.I., et al., *Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(16): p. 5220-7.
26. Sharma, S., et al., *T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function*. J Immunol, 1999. **163**(9): p. 5020-8.
27. Petersen, R.P., et al., *Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients*. Cancer, 2006. **107**(12): p. 2866-72.
28. Umemura, N., et al., *Tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells are pleiotropic-inflamed monocytes/macrophages that bear M1- and M2-type characteristics*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(5): p. 1136-44.
29. Prado-Garcia, H., et al., *Lung carcinomas do not induce T-cell apoptosis via the Fas/Fas ligand pathway but down-regulate CD3 epsilon expression*. Cancer Immunol Immunother, 2008. **57**(3): p. 325-36.
30. Westermann, B., *Mitochondrial fusion and fission in cell life and death*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(12): p. 872-84.
31. Jornayvaz, F.R. and G.I. Shulman, *Regulation of mitochondrial biogenesis*. Essays Biochem, 2010. **47**: p. 69-84.
32. Weinberg, S.E., L.A. Sena, and N.S. Chandel, *Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity*. Immunity, 2015. **42**(3): p. 406-17.
33. Scarpulla, R.C., *Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1576**(1-2): p. 1-14.
34. Wallace, D.C., *A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine*. Annu Rev Genet, 2005. **39**: p. 359-407.
35. Baldelli, S., K. Aquilano, and M.R. Ciriolo, *Punctum on two different transcription factors regulated by PGC-1alpha: nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 and nuclear respiratory factor 2*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1830**(8): p. 4137-46.
36. Scarpulla, R.C., *Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(7): p. 1269-78.
37. Xia, Y., et al., *Electrical stimulation of neonatal cardiomyocytes results in the sequential activation of nuclear genes governing mitochondrial proliferation and differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(21): p. 11399-404.
38. Murakami, T., et al., *Induction of nuclear respiratory factor-1 expression by an acute bout of exercise in rat muscle*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1381**(1): p. 113-22.
39. Li, F., et al., *Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(14): p. 6225-34.
40. Kuzmin, I., et al., *Identification of the promoter of the human von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene*. Oncogene, 1995. **10**(11): p. 2185-94.
41. Zhang, H., et al., *HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity*. Cancer Cell, 2007. **11**(5): p. 407-20.
42. Vercauteren, K., N. Gleyzer, and R.C. Scarpulla, *PGC-1-related coactivator complexes with HCF-1 and NRF-2beta in mediating NRF-2(GABP)-dependent respiratory gene expression*. J Biol Chem, 2008. **283**(18): p. 12102-11.
43. Chen, H., et al., *Cellular metabolism on T-cell development and function*. Int Rev Immunol, 2015. **34**(1): p. 19-33.

44. Sena, L.A., et al., *Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling*. *Immunity*, 2013. **38**(2): p. 225-36.
45. Ron-Harel, N., A.H. Sharpe, and M.C. Haigis, *Mitochondrial metabolism in T cell activation and senescence: a mini-review*. *Gerontology*, 2015. **61**(2): p. 131-8.
46. Finlay, D.K., et al., *PDK1 regulation of mTOR and hypoxia-inducible factor 1 integrate metabolism and migration of CD8+ T cells*. *J Exp Med*, 2012. **209**(13): p. 2441-53.
47. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. *Science*, 2009. **324**(5930): p. 1029-33.
48. Wang, R., et al., *The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation*. *Immunity*, 2011. **35**(6): p. 871-82.
49. van der Windt, G.J., et al., *Mitochondrial respiratory capacity is a critical regulator of CD8+ T cell memory development*. *Immunity*, 2012. **36**(1): p. 68-78.
50. Schwindling, C., et al., *Mitochondria Positioning Controls Local Calcium Influx in T Cells*. *J Immunol*, 2010. **184**(1): p. 184-190.
51. D'Souza, A.D., et al., *Convergence of multiple signaling pathways is required to coordinately up-regulate mtDNA and mitochondrial biogenesis during T cell activation*. *Mitochondrion*, 2007. **7**(6): p. 374-85.
52. Trojan, A., et al., *Immune activation status of CD8+ T cells infiltrating non-small cell lung cancer*. *Lung Cancer*, 2004. **44**(2): p. 143-7.
53. Prado-Garcia, H., et al., *Activation-induced cell death of memory CD8+ T cells from pleural effusion of lung cancer patients is mediated by the type II Fas-induced apoptotic pathway*. *Cancer Immunol Immunother*, 2012. **61**(7): p. 1065-80.
54. Lynch, D.H., F. Ramsdell, and M.R. Alderson, *Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses*. *Immunol Today*, 1995. **16**(12): p. 569-74.
55. Dong, H., et al., *Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion*. *Nat Med*, 2002. **8**(8): p. 793-800.
56. Wolf, M., et al., *Activation-induced expression of CD137 permits detection, isolation, and expansion of the full repertoire of CD8(+) T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities*. *Blood*, 2007. **110**(1): p. 201-10.
57. Melguizo, C., et al., *Modulation of MDR1 and MRP3 gene expression in lung cancer cells after paclitaxel and carboplatin exposure*. *Int J Mol Sci*, 2012. **13**(12): p. 16624-35.
58. Hansen, M.C., et al., *Sensitive ligand-based protein quantification using immuno-PCR: A critical review of single-probe and proximity ligation assays*. *Biotechniques*, 2014. **56**(5): p. 217-28.
59. Niemeyer, C.M., M. Adler, and R. Wacker, *Immuno-PCR: high sensitivity detection of proteins by nucleic acid amplification*. *Trends Biotechnol*, 2005. **23**(4): p. 208-16.
60. Gillis, A.J., et al., *Expression and interdependencies of pluripotency factors LIN28, OCT3/4, NANOG and SOX2 in human testicular germ cells and tumours of the testis*. *Int J Androl*, 2011. **34**(4 Pt 2): p. e160-74.
61. Gehwolf, R., et al., *TaqManR proximity ligation technology for the detection of heterodimeric adhesion receptors on lymphocytes*. *J Immunol Methods*, 2014. **404**: p. 81-6.
62. Gutsaeva, D.R., et al., *Transient hypoxia stimulates mitochondrial biogenesis in brain subcortex by a neuronal nitric oxide synthase-dependent mechanism*. *J Neurosci*, 2008. **28**(9): p. 2015-24.
63. Sandoval-Martinez, R., *Evaluación de la masa mitocondrial en linfocitos T CD8+ provenientes de pacientes con cáncer pulmonar en Facultad de Química*. 2016, Universidad Nacional Autónoma de México.

64. Buck, M.D., et al., *Mitochondrial Dynamics Controls T Cell Fate through Metabolic Programming*. Cell, 2016. **166**(1): p. 63-76.
65. Cao, Y., J.C. Rathmell, and A.N. Macintyre, *Metabolic reprogramming towards aerobic glycolysis correlates with greater proliferative ability and resistance to metabolic inhibition in CD8 versus CD4 T cells*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e104104.