



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Análisis de la expresión de genes involucrados en  
la dinámica mitocondrial en células TCD8+  
provenientes de pacientes con cáncer pulmonar**

**T E S I S**

que para obtener el título de:

**B I Ó L O G A**

**P R E S E N T A:**

**Alicia Mariel Orozco Mora**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. Heriberto Prado García**

**CO-DIRECTORA DE TESIS:  
Dra. Aida Susana Romero García**

**Ciudad Universitaria, CDMX, 2021**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

1. Datos del alumno  
Orozco  
Mora  
Alicia Mariel  
5528794987  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
313149722
1. Datos del tutor  
Dr.  
Heriberto  
Prado  
García
2. Datos del cotutor  
Dra.  
Aída Susana  
Romero  
García
3. Datos del sinodal 1  
Dr.  
Jaime  
Zamora  
Chimal
4. Datos del sinodal 2  
Dra.  
Mayra Dinorah  
Álvarez  
Santos
5. Datos del sinodal 3  
Dr.  
Heriberto  
Prado  
García
6. Datos del sinodal 4  
Dr. Enrique  
Ortega  
Soto
7. Datos del sinodal 5  
Dra.  
Aída Susana  
Romero  
García
8. Datos del trabajo escrito  
Análisis de la expresión de genes involucrados en la dinámica mitocondrial en células TCD8+  
provenientes de pacientes con cáncer pulmonar  
58 p.  
2021



**Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Onco-Immunobiología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) “Ismael Cosío Villegas”. Bajo la dirección del Dr. Heriberto Prado García y la Dra. Aída Susana Romero García.**

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

## Índice

<b>Índice de figuras</b> .....	<b>I</b>
<b>Índice de tablas</b> .....	<b>II</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>III</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>IV</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1 Generalidades del cáncer .....	1
1.2 “Hallmarks” del cáncer .....	1
1.3 Cáncer pulmonar .....	5
1.4 Derrame pleural .....	5
1.5 Derrame pleural maligno.....	6
1.6 Activación y coestimulación de la célula T.....	7
1.7 Células TCD8+ .....	8
1.8 Células TCD8+ en cáncer pulmonar.....	9
1.9 Mitocondria .....	10
1.10 Dinámica mitocondrial.....	11
1.10.1 Genes involucrados en la fusión y fisión mitocondrial (OPA1 y DRP1).....	13
1.10.2 Genes involucrados en la biogénesis mitocondrial y mitofagia (NRF1 y PINK1) .....	15
<b>2. Antecedentes</b> .....	<b>17</b>
2.1 Dinámica mitocondrial en linfocitos T.....	17
2.2 Participación de la mitocondria en los linfocitos TCD8+ en cáncer.....	18
2.3 Análisis de la masa y el potencial de membrana mitocondrial en linfocitos TCD8+ de pacientes con cáncer pulmonar.....	20
<b>3. Justificación</b> .....	<b>21</b>
<b>4. Hipótesis</b> .....	<b>22</b>
<b>5. Objetivos</b> .....	<b>23</b>
<b>6. Materiales y métodos</b> .....	<b>24</b>
6.1 Población estudiada .....	24
6.2 Purificación de células TCD8+.....	24
6.3 Estimulación policlonal de linfocitos T.....	26
6.4 Análisis citométrico .....	28
6.5 Elección de los genes.....	30
6.6 Estandarización de la qPCR.....	30

6.6.1 Extracción de RNA total de linfocitos TCD8+ de un sujeto sano estimulados por perlas de activación .....	30
6.6.2 Retrotranscripción .....	31
6.7 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) .....	34
6.8 Análisis estadístico .....	35
<b>7. Resultados .....</b>	<b>36</b>
7.1 Purificación y activación de células TCD8+ .....	36
7.2 Estandarización de la qPCR .....	37
7.3 Expresión relativa de los niveles de expresión del mRNA de los genes OPA1, DRP1, NRF1 y PINK1 en células TCD8+ de pacientes con cáncer respecto a sujetos sanos .....	41
7.3.1 Expresión relativa del mRNA de OPA1 en células TCD8+ estimuladas respecto a las células no estimuladas de pacientes con cáncer de pulmón y de sujetos sanos .....	43
7.3.2 Expresión relativa del mRNA de DRP1 en células TCD8+ estimuladas respecto a las células no estimuladas de pacientes con cáncer de pulmón y de sujetos sanos .....	45
7.3.3 Expresión relativa del mRNA de NRF1 en células TCD8+ estimuladas respecto a las células no estimuladas de pacientes con cáncer de pulmón y de sujetos sanos .....	46
7.3.4 Expresión relativa del mRNA de PINK1 en células TCD8+ estimuladas respecto a las células no estimuladas de pacientes con cáncer de pulmón y de sujetos sanos .....	47
7.3.5 Cuantificación relativa de los niveles de expresión del mRNA de los genes OPA1, DRP1, NRF1 y PINK1 en células TCD8+ de pacientes con cáncer respecto al grupo sin estimular .....	48
<b>8. Discusión .....</b>	<b>49</b>
<b>9. Conclusiones y perspectivas .....</b>	<b>54</b>
<b>10. Referencias .....</b>	<b>55</b>

## Índice de figuras

Figura 1. Activación de la célula TCD8+.	8
Figura 2. Funciones de la dinámica mitocondrial.	12
Figura 3. Fusión mitocondrial	13
Figura 4. Fisión mitocondrial.	14
Figura 5. Biogénesis mitocondrial.	15
Figura 6. Mitofagia	16
Figura 7. Análisis citométrico para determinar el porcentaje de linfocitos TCD8+.	28
Figura 8. Análisis citométrico para determinar el porcentaje de linfocitos TCD8+ activados	29
Figura 9. Diagrama para realizar las diluciones seriadas para la curva estándar de cada uno de los genes.	34
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa 1.2% de los productos amplificados por PCR de punto final	37
Figura 11. Curvas de amplificación de las matrices de primers de cada gen	38
Figura 12. Curva de disociación	39
Figura 13. Curvas de eficiencia relativa para la amplificación de cada gen respecto al gen endógeno b2-microglobulina	40
Figura 14. Expresión del mRNA de OPA1, DRP1, NRF1 y PINK1	42
Figura 15. Análisis de la expresión del mRNA de OPA1	44
Figura 16. Análisis de la expresión del mRNA de DRP1	45
Figura 17. Análisis de la expresión del mRNA de NRF1	46
Figura 18. Análisis de la expresión del mRNA de PINK1	47

## Índice de tablas

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para la tinción de células TCD8+ purificadas y evaluadas por citometría de flujo.....	26
Tabla 2. Anticuerpos utilizados para la tinción de células TCD8+ activadas y evaluadas por citometría de flujo.....	27
Tabla 3. Concentraciones de <i>primers</i> utilizados en la matriz. ....	32
Tabla 4. Programa para llevar a cabo el qPCR.....	32
Tabla 5. Características de los primers utilizados en este ensayo .....	35
Tabla 6. Porcentajes de las células TCD8+ obtenidas de la purificación por medio de columna magnética .....	36
Tabla 7. Porcentajes de las células TCD8+CD69+ posterior al estímulo por vía TCR ( $\alpha$ CD3). ....	36
Tabla 8. Valores de la expresión relativa del mRNA de los genes OPA1, DRP1, NRF1 y PINK1 .....	48



## Abreviaturas

$\alpha$	Anticuerpo
$\Delta\psi$	Potencial de membrana
APC	Célula presentadora de antígeno
ATP	Adenosín trifosfato
BECN1	Beclin 1
BSA	Albúmina de suero bovino
CMN	Célula mononuclear
$C_T$	Ciclo umbral
DP	Derrame pleural
DRP1	Dynamamin-related protein 1
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FIS1	Fission protein 1
GTP	Guanosina trifosfato
MFF	Mitochondrial fission factor
MFN	Mitofusina
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
mtDNA	DNA mitocondrial
NRF1	Nuclear respiratory factor
NSCLC	Carcinoma pulmonar de células no pequeñas
OPA1	Optic atrophy type 1
OXPPOS	Fosforilación oxidativa
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PGC1 $\alpha$	Coactivador-1alfa del Receptor-gamma activado por el proliferador de peroxisoma
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinasa
PINK1	PTEN-induced kinase 1
PIP <sub>2</sub>	Inositol 4,5-difosfato
PIP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trifosfato
PMA	Acetato de forbol miristato
qPCR	Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
RT	Retrotranscripción
SCLC	Carcinoma pulmonar de células pequeñas
SE	Sin estímulo
SPC	Sangre periférica de paciente con cáncer
SPS	Sangre periférica de sujeto sano
TCA	Ciclo del ácido tricarbóxico
TCR	Receptor de células T
TE	Células T efectores
Tfam	Transcription factor A, mitochondrial
TM	Células T de memoria
TN	Células T naive

**VGF-A**  
**VIH**

Factor de crecimiento endotelial vascular A  
Virus de la inmunodeficiencia humana

## Resumen

La dinámica mitocondrial se conforma por los eventos antagonistas de fusión y fisión, así como la biogénesis mitocondrial y mitofagia. Estos procesos están controlados por los genes: OPA1, DRP1, NRF1 y PINK1, respectivamente, modulando la morfología de las mitocondrias, la cantidad, su tamaño y posición en el citoplasma. La dinámica mitocondrial puede afectar la funcionalidad y capacidad de respuesta antitumoral de las células TCD8+. En trabajos anteriores se observó que las células TCD8+ de pacientes con cáncer pulmonar presentan cambios en su funcionalidad, que pudieran ser causadas por alteraciones en la dinámica mitocondrial. Para evaluar la expresión de los genes antes mencionados en células TCD8+, en este trabajo se realizó la técnica de RT-qPCR. Las células TCD8+ se purificaron a partir de células mononucleares de sangre periférica de sujetos sanos y de pacientes con cáncer pulmonar, así como de derrame pleural de pacientes con cáncer pulmonar. Se estimularon con anticuerpos anti-CD3 y con anti-CD3/anti-CD28, se llevó a cabo la retrotranscripción, finalmente la q-PCR se realizó por medio de SYBR Select Master Mix de los genes anteriormente mencionados. Los datos obtenidos fueron analizados de acuerdo con el método comparativo  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . La expresión del mRNA de los genes OPA1, NRF1 y PINK1 se encontró disminuida en las células TCD8+ provenientes de derrame pleural, por el contrario, la expresión del mRNA de DRP1 incrementó en el mismo grupo, lo que demuestra que hay alteraciones en la dinámica mitocondrial. Las alteraciones en la expresión de los diferentes genes involucrados en la dinámica mitocondrial podrían provocar defectos en la activación y función antitumoral de las células TCD8+.

## **1. Introducción**

### **1.1 Generalidades del cáncer**

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracterizan por cambios en el genoma de las células que resultan en diversos eventos complejos tales como: la activación de oncogenes e inactivación de genes supresores de tumor que inducen el crecimiento anormal y descontrolado de las células transformadas (Nurmiket et al., 2019; Romero-García et al., 2011). Esta enfermedad es de importancia mundial, presenta una alta incidencia y mortalidad (WHO, 2018). Con base en estimaciones del GLOBOCAN 2018, existieron 18.1 millones de casos nuevos de cáncer, mientras que hubo 9.6 millones de muertes por esta enfermedad.

### **1.2 “Hallmarks” del cáncer**

El cáncer tiene ocho características propias o *hallmarks*, que se adquieren mientras el tumor se va desarrollando, como son: 1) señales proliferativas constantes, 2) evasión de señales supresoras de crecimiento, 3) evasión a la muerte celular, 4) invasión al tejido y metástasis, 5) inducción de angiogénesis, 6) reprogramación metabólica, 7) evasión de la respuesta inmune, 8) potencial replicativo ilimitado. Además, las características que propician el desarrollo tumoral son 1) inflamación e 2) inestabilidad genómica (Hanahan & Weinberg, 2011; Romero-García et al., 2011).

#### 1) Señales proliferativas constantes

Las células tumorales adquieren la capacidad de mantener la señalización proliferativa promoviendo la entrada al ciclo celular, modificando el número celular y por lo tanto la función y la arquitectura del tejido. Estas modificaciones alteran la homeostasis que se presenta en un tejido normal.

Las células tumorales mantienen las señales proliferativas de diversas maneras: Una de ellas es produciendo factores de crecimiento, provocando así una estimulación proliferativa autocrina. Otra manera es por sufrir mutaciones que resulten en la activación sostenida de las vías de señalización para la proliferación sin necesidad de la interacción del factor de crecimiento con su receptor. También pueden enviar señales para estimular células normales para que produzcan factores de crecimiento. Estos factores de crecimiento se unen a su receptor y estimulan

vías de señalización intracelular que permiten el crecimiento celular, la supervivencia celular y el metabolismo energético (Hanahan & Weinberg, 2011).

#### 2) Evasión de señales supresoras de crecimiento

En el ciclo celular de las células normales existen señales que controlan los pasos a través del ciclo celular, indicando a la célula que inicie o detenga la proliferación. Cuando ocurre un error en el ciclo celular pueden actuar proteínas supresoras que controlan la proliferación de las células y pueden activar programas de apoptosis y senescencia, como las proteínas pRb y p53. Por lo tanto, si las células tumorales tienen defectos en la función de pRb, que transduce señales inhibitorias del crecimiento, las células tumorales pueden seguir proliferando. Mientras que p53 puede detener el avance del ciclo celular por señales de estrés o anomalía en la célula, desencadenando la apoptosis. En células tumorales, la p53 frecuentemente no se activa (Hanahan & Weinberg, 2011).

#### 3) Evasión a la muerte celular

La apoptosis se puede desencadenar en respuesta a diversos cambios fisiológicos, que experimentan las células tumorales durante el curso de la tumorigénesis. Las células tumorales tienen diversas estrategias para limitar la apoptosis. La más común es perder la función del gen supresor de tumor TP53. Algunas veces incrementan la expresión de reguladores antiapoptóticos como Bcl-2, considerados como señales de supervivencia en las células (Hanahan & Weinberg, 2011).

#### 4) Invasión al tejido y metástasis

Los tumores malignos comienzan en zonas localizadas, con el avance de la enfermedad se produce la invasión local de tejido y la metástasis que es la invasión a tejidos lejanos. Esta migración de las células tumorales se da gracias a su interacción con otras células y con la matriz extracelular (Hanahan & Weinberg, 2011).

La invasión y metástasis es un proceso de varios pasos y cambios en la célula, comienza con la invasión local, después la invasión a los vasos sanguíneos y linfáticos cercanos. Posteriormente, las células transitan a través de los sistemas linfático y circulatorio, hasta el escape de las células tumorales del lumen de los vasos hacia el parénquima de tejidos distantes (extravasación), formación de

nódulos pequeños de células (micrometástasis) y finalmente el crecimiento de las lesiones micrometastásicas en tumores metastásicos, este último paso es llamado “colonización” (Hanahan & Weinberg, 2011).

#### 5) Inducción de angiogénesis

Al igual que en un tejido sano, los tumores requieren nutrientes y oxígeno, así como la eliminación de desechos metabólicos y dióxido de carbono. Esto se lleva a cabo por la angiogénesis donde se generan nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes. Un inductor de la angiogénesis es el factor de crecimiento endotelial vascular A (VGEF-A) (Hanahan & Weinberg, 2011).

Se ha observado que la angiogénesis es inducida en etapas tempranas del desarrollo de cánceres invasivos. Del mismo modo se ha observado que la angiogénesis crea microambientes heterogéneos en el tumor (Hanahan & Weinberg, 2011).

#### 6) Reprogramación metabólica

Las células tumorales adaptan su metabolismo para conseguir establecer su proliferación y crecimiento continuo. En condiciones aeróbicas, la célula normal transforma a la glucosa a través de la glucólisis, y el producto final es el piruvato que puede ser convertido en acetil-CoA y entrar al ciclo de Krebs. En condiciones anaeróbicas, el piruvato se convierte en ácido láctico. Las células tumorales preferencialmente incrementan la glucólisis seguida de la fermentación del piruvato en ácido láctico aún en condiciones de normoxia, a este proceso se le llama “glucólisis aeróbica” también conocido como efecto Warburg (Hanahan & Weinberg, 2011).

#### 7) Evasión de la respuesta inmune

La vigilancia inmune monitorea a las células y tejidos constantemente, es capaz de reconocer y eliminar a la mayor parte de las células tumorales incipientes y, por lo tanto, los tumores nacientes. Los tumores sólidos, de alguna manera han logrado evitar ser detectados por los diversos mecanismos del sistema inmune. En este sentido se ha observado que deficiencias en el desarrollo o la función de células del sistema inmune, como son los linfocitos TCD8+ o células NK que infiltran tumores, conducen a aumentos en la incidencia de tumores (Hanahan & Weinberg, 2011).

Uno de los mecanismos para evadir la respuesta inmune que utilizan las células tumorales es la secreción de factores inmunosupresores. Éstos impiden el funcionamiento de las células TCD8+ y NK, además pueden reclutar células inflamatorias que pueden inmunosuprimir a las células TCD8+, como las células T cooperadoras (Hanahan & Weinberg, 2011).

#### 8) Potencial replicativo ilimitado

Las células tumorales poseen un potencial replicativo ilimitado para generar tumores macroscópicos. Esto se debe a que las células tumorales tienen la capacidad de mantener expresada a la enzima telomerasa. Ésta se encarga de mantener al DNA telomérico en longitudes suficientes, para evitar que la célula entre en senescencia o apoptosis (Hanahan & Weinberg, 2011).

Las características que propician el desarrollo tumoral son:

##### 1) Inflamación

Los patólogos han reconocido durante mucho tiempo que algunos tumores están densamente infiltrados por células del sistema inmune innato y adaptativo, por lo tanto, reflejan afecciones inflamatorias que surgen en los tejidos no neoplásicos. Se pensaba que tales respuestas inmunitarias reflejaban en gran medida un intento por parte del sistema inmunitario de erradicar tumores. En la actualidad se ha observado que la inflamación puede contribuir al desarrollo tumoral, al suministrar moléculas bioactivas al microambiente tumoral. Algunas moléculas son: los factores de crecimiento que sostienen la señalización proliferativa, los factores de supervivencia que limitan la muerte celular, los factores proangiogénicos, así como las enzimas modificadoras de la matriz extracelular que facilitan la invasión y la metástasis (Hanahan & Weinberg, 2011).

##### 2) Inestabilidad genómica

La adquisición de las múltiples características distintivas enumeradas anteriormente depende en gran parte de una sucesión de alteraciones en los genomas de las células neoplásicas. En pocas palabras, ciertos genomas mutados confieren una ventaja selectiva a los subclones de las células. En consecuencia, la progresión tumoral se puede representar como una sucesión de expansiones clonales, cada

una de las cuales se desencadena por la adquisición casual de un genoma habilitador (Hanahan & Weinberg, 2011).

### **1.3 Cáncer pulmonar**

El cáncer de pulmón es uno de los carcinomas con mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial con 2.1 millones de casos nuevos (11.6%), que provocó 1.8 millones de muertes por cáncer (18.4%) en el año 2018 (Bray et al., 2018). La mayoría de los casos de cáncer de pulmón ocurre en personas mayores, siendo 70 años el promedio (Testa et al., 2018).

Uno de los factores más importantes causantes de cáncer pulmonar es el tabaco que ocasiona el 80% de los casos de cáncer pulmonar. Otros factores que lo pueden provocar son la contaminación ambiental, exposición a quema de combustibles en lugares encerrados, exposición ambiental al radón, asbesto, algunos metales como, cadmio y arsénico y algunos químicos orgánicos (Testa et al., 2018).

El cáncer pulmonar comienza con la transformación maligna de células de los pulmones siendo un tumor primario. Estas células neoplásicas pueden migrar a los nódulos linfáticos y a otros órganos haciendo metástasis.

Basado en la histología, pronóstico y tipo de tratamiento, el cáncer pulmonar se divide en dos grandes grupos: carcinoma de células pequeñas (SCLC) y carcinoma de células no pequeñas (NSCLC). Específicamente, el NSCLC se subdivide en tres: adenocarcinomas, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células grandes. Siendo el adenocarcinoma el que representa un 38.5% de todos los casos de cáncer pulmonar (Reckamp et al., 2016).

### **1.4 Derrame pleural**

La pleura es una membrana serosa que al plegarse sobre si misma forma una membrana de dos capas, una de las capas es llamada visceral, la cual recubre a los pulmones; la otra capa es llamada parietal, que recubre a la caja torácica. Entre estas dos capas existe un espacio llamado cavidad pleural. En esta cavidad pleural se encuentra el líquido pleural, que lubrica a las dos membranas reduciendo la



fricción entre ellas y ayudando a los movimientos de respiración (Charalampidis et al., 2015; Karpathiou & Peoc'h, 2019).

El líquido pleural normal contiene aproximadamente  $1.716 \times 10^3$  células/mL de glóbulos blancos, donde el 75% son macrófagos, 23% linfocitos y de 1% de neutrófilos. De manera continua el líquido pleural se produce y se reabsorbe por el sistema linfático. En una persona sana, la cavidad pleural contiene alrededor de 10 a 20 mL de líquido pleural con una baja concentración de proteínas (D'Agostino & Edens, 2019).

Cuando existe un cambio en la tasa de producción y absorción de líquido o cuando uno de los mecanismos de absorción es alterado, se produce un derrame pleural que puede ser maligno o no maligno (Costello & B.S., 2019; D'Agostino & Edens, 2019; Karpathiou & Peoc'h, 2019). Existen dos tipos de derrames pleurales, los que tienen alto contenido de proteínas (exudado) o bajo contenido de proteínas (trasudado) (D'Agostino & Edens, 2019).

El derrame pleural exudativo puede ser provocado por infecciones como neumonía, tuberculosis o por otros estados inflamatorios como ciertos tipos de cáncer. El derrame pleural de tipo trasudado puede ocurrir cuando existe una insuficiencia cardiaca congestiva, cirrosis, síndrome nefrótico o desnutrición (Costello & S., 2019; D'Agostino & Edens, 2019).

### **1.5 Derrame pleural maligno**

El derrame pleural maligno se presenta mayormente en pacientes con cáncer pulmonar, seguido de cáncer de mama, linfoma y mesotelioma maligno (Skok et al., 2019). Citológicamente contienen altas concentraciones de células neoplásicas y células inflamatorias (Prado-García et al., 2012).

En cáncer de pulmón, el subtipo histológico que más produce derrame pleural es el adenocarcinoma, por la frecuente inflamación que existe y la invasión del tumor en la pleura. La acumulación de líquido en la cavidad pleural conlleva al derrame pleural que ocurre en 15%-20% de los casos primarios de cáncer pulmonar. En estos pacientes, se detecta una cantidad de 300 a 1500 mL de líquido pleural.

## 1.6 Activación y coestimulación de la célula T

La activación de las células T inicia una cascada de señales intracelulares resultando en la proliferación, expansión clonal, producción de citocinas y muerte celular (Fortner, 2017), así como un cambio en su metabolismo (Pearce et al., 2013). La célula T requiere de dos señales para activarse que provienen de las células presentadoras de antígeno profesionales (APC). La primera señal consiste en la presentación de antígeno, en la cual se forma un enlace peptídico entre las moléculas del MHC clase I o II, junto con el antígeno en forma de péptido y el TCR (Prado-García et al., 2015). La segunda señal, o señal coestimuladora, en conjunto con el antígeno estimula a la célula T (Figura 1).

El TCR es conformado por las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  a estas cadenas se les asocia el complejo proteico CD3 que forman los heterodímeros, CD3 $\gamma$ - CD3 $\epsilon$  y CD3 $\delta$ - CD3 $\epsilon$ , junto con el homodímero  $\zeta$ - $\zeta$ , todo este conjunto (TCR-CD3) ayuda al reconocimiento del antígeno y a la transducción de señales para la activación de las células T (Baniyash, 2004).

La vía de coestimulación mejor caracterizada es la del receptor CD28 expresado por las células T, que se activa por sus ligandos CD80/ CD86. CD28 es la molécula coestimuladora primaria para la célula T naive y es esencial para iniciar la respuesta por parte de la célula T. Esta vía de coestimulación desencadena la activación de la PI3K que fosforila a PIP<sub>2</sub> para generar PIP<sub>3</sub>, reclutando a AKT (Baniyash, 2004; Murphy, 2012). La coestimulación por esta vía promueve la expansión y diferenciación de las células T en efectoras y de memoria, así como la producción de diversas citocinas. Del mismo modo mantiene la supervivencia de la célula T (Porciello & Tuosto, 2016; Prado-García et al., 2015; Xia et al., 2018).

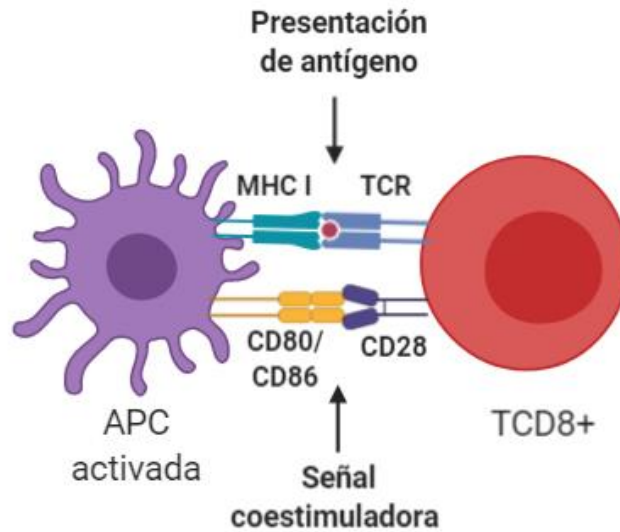


Figura 1. Activación de la célula TCD8+. La interacción del TCR/ MHC clase I con el péptido desencadena la primera señal para la activación de la célula TCD8+ (presentación de antígeno). La segunda señal es la coestimuladora, mediada por la interacción de CD80/CD86 con CD28.

### 1.7 Células TCD8+

Las células T son las vigías de la respuesta inmune adaptativa, al reconocer a su antígeno, las células T naive proliferan y se diferencian a células T efectoras para poder realizar la identificación y eliminación de patógenos (Pearce et al., 2013). Las células T se dividen en dos grupos de acuerdo con su función: las células T cooperadoras (TCD4+) y las T citotóxicas (TCD8+). Las células TCD4+ liberan una diversidad de citocinas que desencadenan diversas respuestas del sistema inmune, integrando los mecanismos de la inmunidad innata y adaptativa. Las células TCD8+ tienen la función principal de reconocer y eliminar células que estén infectadas o que estén en una transformación oncogénica (Klein-Hessling et al., 2017; Prado-García et.al., 2015).

El receptor de las células T (TCR) de las células TCD8+ y TCD4+, está formado por un dímero conformado por las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  unidas mediante un enlace disulfuro. El TCR de las células TCD8+ se une a la molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I en los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  (Murphy, 2012). Una vez que el linfocito TCD8+ reconoce su antígeno cargado con el MHC de clase I y es coestimulado por la célula presentadora de antígeno, se diferencia de célula TCD8+

naive a célula TCD8+ efectora. Las células TCD8+ efectoras generan una gran cantidad de citocinas inflamatorias y moléculas citotóxicas efectoras, como perforina y granzimas, que son almacenadas en gránulos líticos en el citosol de la célula.

En la sinapsis inmunológica, los gránulos líticos son liberados hacia la célula blanco, provocando su eliminación (Klein-Hessling et al., 2017).

Cuando se realiza la presentación antigénica a la célula TCD8+, también permite el inicio de una señalización intracelular, la cual, una vez diferenciadas las células, muchas de las células TCD8+ estimuladas mueren al realizar su función de reconocimiento y eliminación del patógeno, pero un pequeño número de células sobreviven y se diferencian a células TCD8+ de memoria (Klein-Geltink et al., 2017).

### **1.8 Células TCD8+ en cáncer pulmonar**

Las células TCD8+ tienen un papel importante en la vigilancia inmunitaria contra el cáncer, debido a que reconocen antígenos peptídicos específicos de tumores o asociados a tumores. Las células TCD8+ utilizan sus moléculas citotóxicas para destruir a las células malignas. Sin embargo, las células pueden estar agotadas o en estados de anergia impidiendo su función de reconocimiento, activación y eliminación de las células malignas, es por ello la importancia de que las células TCD8+ se encuentren infiltradas en los tumores (Choi et al., 2019).

Algunos reportes mencionan la importancia de la presencia de los linfocitos TCD8+ infiltrantes en tumores de cáncer pulmonar, debido a que mejoran la supervivencia del paciente (Fumet et al., 2018), mientras que en otros reportes indican que la presencia y función de estas células se encuentran disminuidas, debido a que reducen su tasa de proliferación y disminuyen su citotoxicidad (Prado-García et al., 2012), provocando una disfunción en la respuesta antitumoral y por ende permiten la progresión del tumor (Prado-García et al., 2005).

La disminución en el número de células TCD8+ en los sitios tumorales puede deberse a un bloqueo en el proceso de diferenciación de las células TCD8+ inducido por las células tumorales, resultado de los procesos de inmunosupresión por el microambiente tumoral, una deficiencia en la presentación de antígeno, reducción

en la producción de citocinas de activación para las células TCD8+, así como alteraciones en el complejo CD3 (Prado-García et al., 2012).

Es por ello que existen muchas modalidades inmunoterapéuticas diseñadas para aumentar la población de las células TCD8+, así como para restaurar y mejorar sus funciones en pacientes con cáncer (Choi et al., 2019; Prado-García et al., 2012).

## **1.9 Mitocondria**

Todos los organismos vivos necesitan nutrientes para sobrevivir. Las mitocondrias metabolizan estos nutrientes para generar la mayor parte de la energía requerida para que la célula pueda mantenerse y proliferar. En las células eucariontes, la mitocondria es el organelo encargado de producir la energía requerida para el metabolismo celular, en forma de ATP, por medio de la fosforilación oxidativa (OXPHOS). Así como en otros procesos fisiológicos como la apoptosis, la inmunidad innata y la transducción de señales mediadas por calcio y especies reactivas de oxígeno. Por lo anterior, alteraciones genéticas y epigenéticas que llegaran a afectar a la mitocondria en sus funciones, pueden estar vinculadas al desarrollo de diferentes patologías humanas como, el cáncer (Sedlackova & Korolchuk, 2019; Tilokani et al., 2018).

La mitocondria es un organelo de doble membrana que forma redes dinámicas. La mitocondria contiene su propio genoma y maquinaria para síntesis de proteínas, las cuales pueden satisfacer algunas de las demandas metabólicas y energéticas de la célula. La mitocondria se conforma por la membrana mitocondrial externa (MME), que está en contacto con el citosol, y la membrana mitocondrial interna (MMI) que se encuentra en la matriz mitocondrial al igual que el DNA mitocondrial (mtDNA) (Tilokani et al., 2018). La generación de energía ocurre en la MMI debido a que contiene elementos de la cadena transportadora de electrones, en los compartimentos llamados crestas (Sedlackova & Korolchuk, 2019; Tilokani et al., 2018; Westermann, 2010).

### **1.10 Dinámica mitocondrial**

Desde 1950 se había considerado que la mitocondria tenía una morfología arriñonada y que esta morfología era constante en diferentes estirpes celulares y durante el ciclo celular (Detmer & Chan, 2007; Westermann, 2010). En 1980, se demostró que la mitocondria era un organelo dinámico que podía formar grandes redes o fragmentarse en diversas esferas, así mismo se demostró que las mitocondrias se movían constantemente a través del citoesqueleto.

La dinámica mitocondrial se conforma de los eventos antagonistas de fusión y fisión, estos procesos regulan el número de mitocondrias, la morfología de la mitocondria, así como su distribución intracelular (Detmer & Chan, 2007). El proceso de fusión involucra la unión de dos o más mitocondrias, en donde se fusionan las cuatro membranas y permite que las mitocondrias formen grandes redes. Estas redes son importantes debido a que ayudan a la disipación de energía a través de la transmisión del potencial de membrana entre ellas y la complementación del mtDNA en células heteroplasmáticas al juntarse las matrices mitocondriales que es donde se encuentra el mtDNA (Aryaman et al., 2019), para contrarrestar la disfunción de funciones respiratorias por envejecimiento (Figura 2) (Tilokani et al., 2018; Westermann, 2010). En la fisión mitocondrial, la red mitocondrial se fragmenta en varias mitocondrias más pequeñas. Este proceso se incrementa cuando la célula entra en quiescencia y cuando se deben degradar mitocondrias dañadas por autofagia (mitofagia) o cuando la célula se encuentra en situación de estrés oxidativo (Tilokani et al., 2018; Westermann, 2010). La fisión mitocondrial también es requerida cuando se lleva a cabo la división celular, para generar nuevas mitocondrias (biogénesis mitocondrial). También es requerida para la liberación de factores pro-apoptóticos, así como para la distribución de mitocondrias a través del citoesqueleto y para llevar a cabo el proceso de mitofagia (Figura 2) (Westermann, 2010).

Algunas proteínas que permiten la fusión de las mitocondrias son: OPA1, MFN1, MFN2 (Tilokani et al., 2018). Estas proteínas se reclutan a la membrana interna mitocondrial (OPA1) o a la membrana externa mitocondrial (MFN1 y MFN2) (Sedlackova & Korolchuk, 2019). Por parte de las moléculas involucradas en la fisión

mitocondrial, se encuentran: DRP1, FIS1, MFF, estas proteínas se reclutan a la membrana mitocondrial externa (Westermann, 2010).

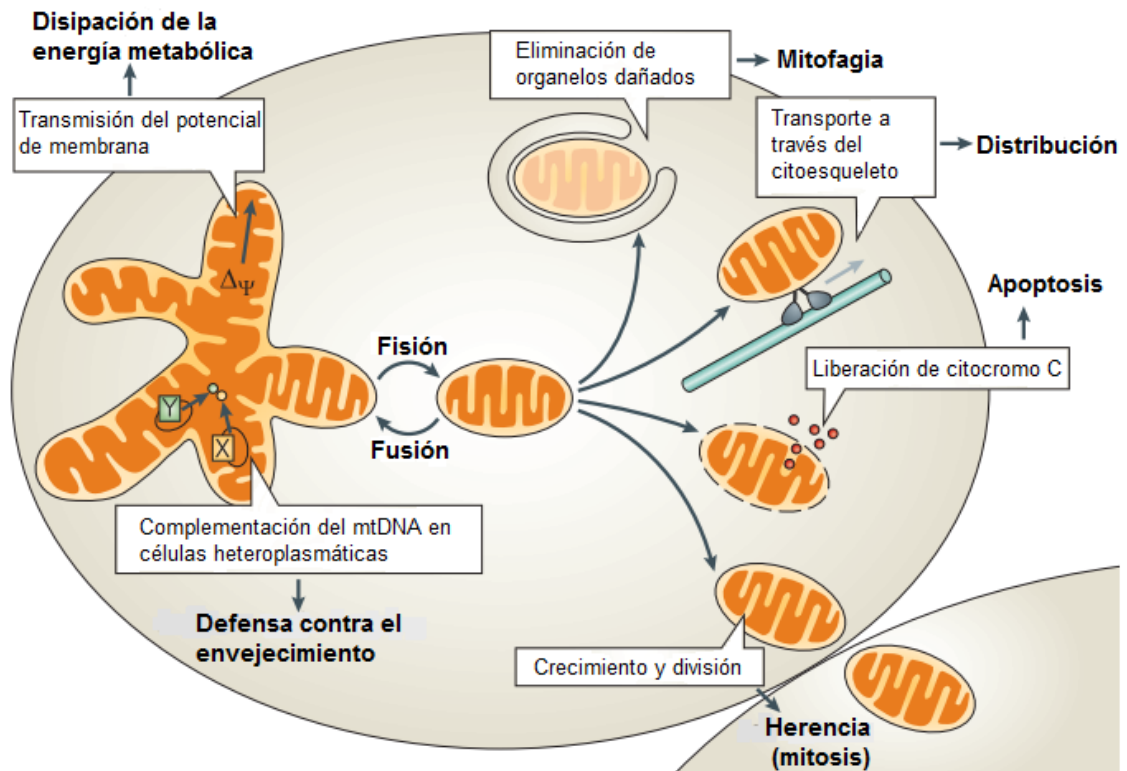


Figura 2. Funciones de la dinámica mitocondrial. La dinámica mitocondrial es importante para diversas funciones biológicas. La fisión de las mitocondrias se lleva a cabo para la distribución de éstas durante la mitosis, la liberación de factores pro-apoptóticos, el transporte y dispersión de las mitocondrias y la mitofagia. La formación de las redes son importantes para la disipación de energía metabólica a través de la transmisión del potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ) así como la complementación de DNA mitocondrial (mtDNA). Modificada de Westermann, 2010.

### 1.10.1 Genes involucrados en la fusión y fisión mitocondrial (OPA1 y DRP1)

#### a) Fusión mitocondrial

Para llevar a cabo la fusión mitocondrial, uno de los genes que participa en este proceso es OPA1, (Optic atrophy type 1). OPA1 es una GTPasa, que fue descrita originalmente en el modelo de la levadura (Mgm1p), se conserva evolutivamente y es una proteína que tiene 8 isoformas identificadas. OPA1 participa en la fusión de la membrana interna de las mitocondrias. Las isoformas de OPA1 larga y corta, nombradas así por el tamaño del dominio transmembranal (Del Dotto et al., 2018) se deben de expresar en la MMI y en el espacio intermembranal para que se lleve a cabo la fusión. OPA1 también interactúa con las mitofusinas 1 y 2 (MFN1 y MFN2) que forman un puente entre la membrana externa e interna para que puedan fusionar ambas membranas (Figura 3) (Nisoli & Carruba, 2006; Sedlackova & Korolchuk, 2019; Tilokani et al., 2018; Westermann, 2010).

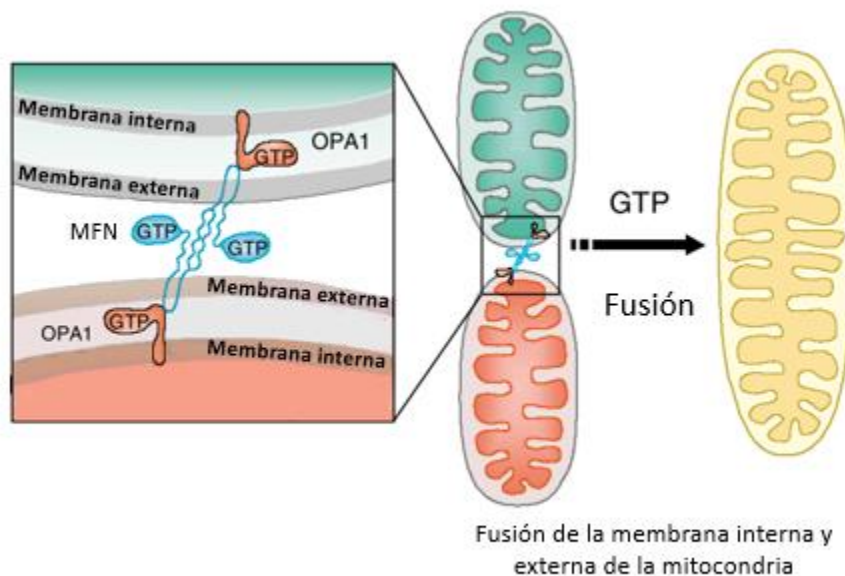


Figura 3. Fusión mitocondrial. La fusión de la mitocondria requiere de la interacción de la membrana interna y de la membrana externa, para esto las mitofusinas (MFN) enganchan a la membrana externa de dos mitocondrias proximales. Las mitofusinas interactúan con OPA1, que se encuentra en la membrana interna de la mitocondria y realiza la fusión de las dos membranas. Modificada de Nisoli & Carruba, 2006.



## b) Fisión mitocondrial

Dynamin-related protein 1 (DRP1) es el gen regulador de la fisión de la mitocondria en la mayoría de los organismos eucariontes. DRP1 se encuentra soluble en el citosol en forma de dímeros o trímeros que contienen una GTPasa N-terminal, un dominio medio y un dominio efector de GTPasa c-terminal que está implicado en el autoensamblaje.

Al ocurrir una fosforilación en SER616, DRP1 se traslada a la membrana externa de la mitocondria donde se une a otras proteínas adaptadoras (MFF y FIS1). En la membrana externa, DRP1 experimenta un cambio conformacional y se ensambla con otras proteínas formando un anillo alrededor de la mitocondria. La hidrólisis de GTP provoca la constricción del anillo y la división de la membrana externa e interna de la mitocondria (Figura 4)(Nisoli & Carruba, 2006; Sedlackova & Korolchuk, 2019; Tilokani et al., 2018; Westermann, 2010)

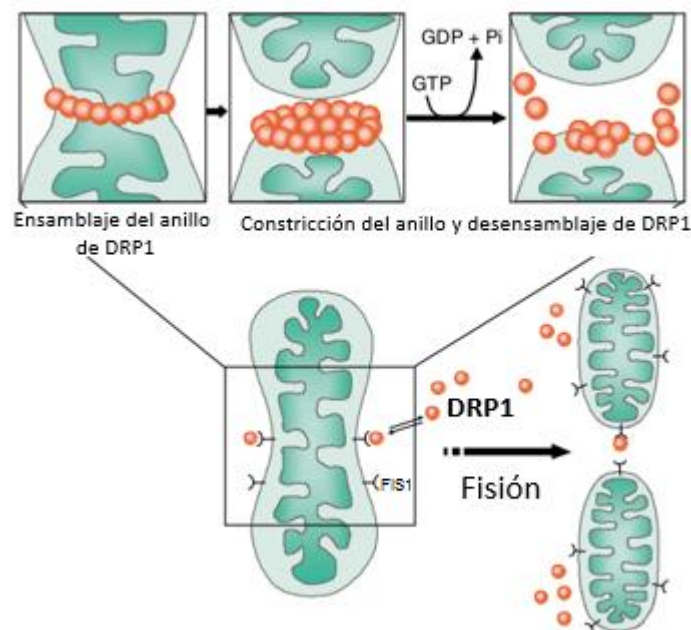


Figura 4. Fisión mitocondrial. DRP1, se encuentra soluble en el citosol, se une a proteínas adaptadoras como fission protein 1 (FIS1), que se encuentra en la membrana de la mitocondria, una vez que DRP1 se une a la mitocondria forma un anillo. La hidrólisis de GTP provoca la constricción del anillo, dividiendo la membrana externa e interna. Modificada de Nisoli & Carruba, 2006.

### 1.10.2 Genes involucrados en la biogénesis mitocondrial y mitofagia (NRF1 y PINK1)

#### a) Biogénesis mitocondrial

El factor de transcripción NRF1 (nuclear respiratory factor 1), ayuda a la activación de genes requeridos para la biogénesis mitocondrial y la función respiratoria, de la misma forma juega un papel importante en el crecimiento celular y proliferación (Kiyama et al., 2018). NRF1 promueve la expresión de Tfam (mitochondrial transcription factor A) que dirige a la transcripción y replicación del mtDNA (Figura 5) (Austin & St-Pierre, 2012).

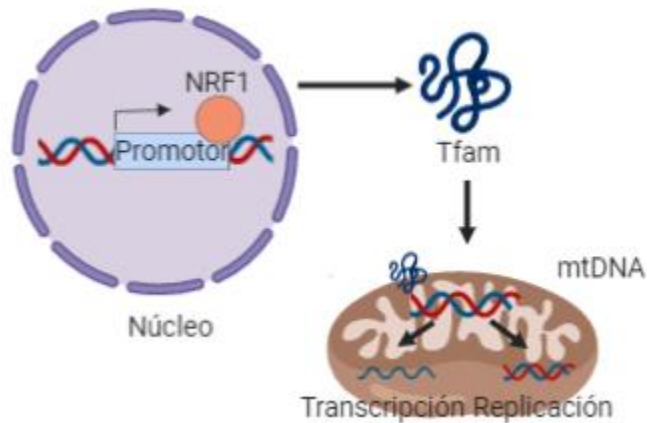


Figura 5. Biogénesis mitocondrial. El factor de transcripción NRF1 activa la expresión de genes que regulan la biosíntesis, transcripción y replicación del DNA mitocondrial, como el gen Tfam.

## b) Mitofagia

PTEN-induced kinase 1 (PINK1) es una proteína crítica en el proceso de la mitofagia. PINK1 es una proteína cinasa de serina/treonina, que fosforila a proteínas mitocondriales y ayuda a proteger a la mitocondria de una disfunción durante elevados niveles de estrés celular (Chang et al., 2018). Cuando se pierde el potencial de membrana mitocondrial o al expresarse DRP1, PINK1 se activa y se recluta a Parkin; al reclutarse Parkin se fosforila y recluta más moléculas, iniciando el proceso de la mitofagia. Al iniciarse el proceso de mitofagia se reclutan otras proteínas como BECN1 (beclin 1) que forma las vacuolas autofágicas (Riley & Tait, 2016) (Figura 6).

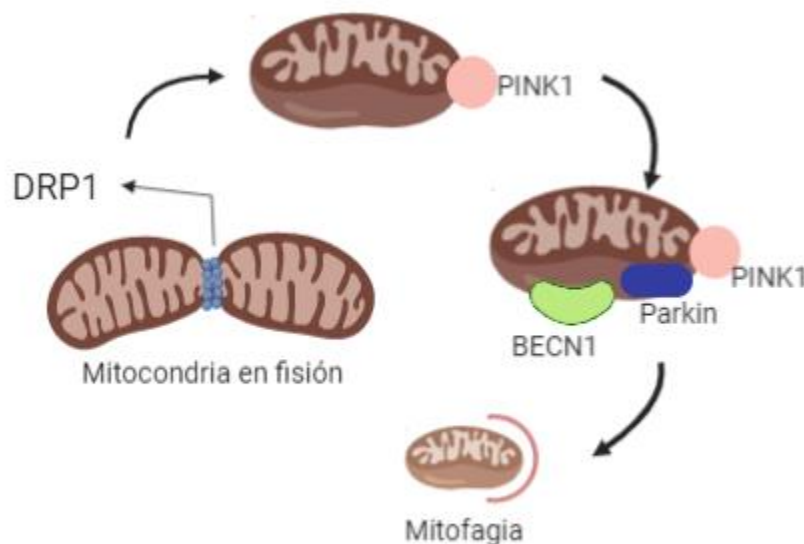


Figura 6. Mitofagia. Al perderse el potencial de membrana o expresarse DRP1, PINK1 se activa en la membrana mitocondrial y recluta a la proteína Parkin que recluta a proteínas como BECN1 que forma las vacuolas autofágicas para la mitofagia.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Dinámica mitocondrial en linfocitos T

Además de ser el centro metabólico de la célula, la mitocondria también es importante para la activación y diferenciación de los linfocitos T, debido a que se realizan reprogramaciones metabólicas para llevar a cabo el crecimiento celular, diferenciación y expansión clonal. Se ha reportado que los linfocitos T de memoria (T<sub>M</sub>) tienen mayor masa mitocondrial que los linfocitos T efectores (T<sub>E</sub>) o naive (T<sub>N</sub>). Buck et. al. emplearon un modelo en el que infectaron ratones con *Listeria monocytogenes* que expresa ovoalbumina. Los autores observaron las mitocondrias de las subpoblaciones antes mencionadas, encontrando que a las 24 horas después de la activación, la mitocondria se encuentra fusionada. Del segundo día al sexto, las mitocondrias de la subpoblación T<sub>E</sub> se encuentran fisionadas, mientras que las células T<sub>M</sub> se encuentran fusionadas formando redes. Los autores también examinaron la expresión de las proteínas que regulan la dinámica mitocondrial y encontraron que, en el sexto día, los mediadores de la fusión como OPA1 y MFN2 se encuentran con menor expresión en las células T<sub>E</sub> comparadas con las T<sub>M</sub>. Por parte de la fisión, DRP1 se encuentra fosforilada en las células T<sub>E</sub>. Lo anterior sugiere que las mitocondrias en las células T<sub>E</sub> sufren una fisión activa mientras que en las células T<sub>M</sub>, las mitocondrias se encuentran fusionadas en redes (Buck et al., 2016).

Por otro lado, se ha reportado que la dinámica mitocondrial puede modular el proceso de diferenciación de células T<sub>E</sub> y T<sub>M</sub>. Las células T<sub>E</sub> poseen mitocondrias fragmentadas que ayudan a la glucólisis aeróbica. Durante la activación por TCR, DRP1 es fosforilado facilitando la fisión mitocondrial, obteniendo ATP por la glucólisis aeróbica. Por el contrario, OPA1 promueve la formación de células T<sub>M</sub> y presenta un metabolismo oxidativo (Chao et al., 2017).

Además, se ha observado que las células T<sub>N</sub> tienen mitocondrias fragmentadas y durante la activación de las células T<sub>E</sub> hay un incremento en la tasa de fisión mitocondrial; posteriormente, el número de mitocondrias aumenta, pero la cantidad de crestas se encuentra disminuida en las mitocondrias. En contraste, las células

T<sub>M</sub> tienen mitocondrias de gran tamaño y elongadas como resultado de un decremento en la tasa de fusión (Pustylnikov et al., 2018).

Ron-Harel et al., realizaron experimentos en células TCD4+, provenientes de ratón, estimulándolas con  $\alpha$ CD3 (vía TCR) y  $\alpha$ CD28 (moléculas de coestimulación), evaluaron la biogénesis mitocondrial por medio de microscopía de células vivas. En las células TCD4+ después de cuatro, nueve, y 24 horas de estímulo, encontraron un incremento en la masa mitocondrial desde las cuatro horas postestimulación. También observaron que las células TCD4+ naive tienen mitocondrias fragmentadas, después de nueve horas la mitocondria se encuentra hiperfusionada y a las 24 horas las mitocondrias se vuelven a fragmentar.

En el caso de células TCD8+ provenientes de tumores de pacientes con carcinoma de células renales de células claras, Siska et al. (2017) evaluaron las mitocondrias por medio de microscopía confocal de alta resolución y microscopía electrónica, después de estimular a las células con  $\alpha$ CD3. Se observaron que las mitocondrias se encuentran fisionadas, con un tamaño pequeño y una morfología redonda y dispersas en la célula, al contrario de lo observado en las células control, que eran células TCD8+ provenientes de células mononucleares de sangre periférica de sujetos sanos, donde las mitocondrias estaban fusionadas en redes. También se analizó la expresión de un promotor de la biogénesis mitocondrial el coactivador gamma del receptor activado por el proliferador de peroxisoma 1- alfa (PGC1 $\alpha$ ), ya que la deficiencia de este puede disminuir el contenido mitocondrial. Sin embargo, la expresión de PGC1 $\alpha$  permaneció normal en las células TCD8+ provenientes de tumor. Por lo tanto, las células TCD8+ infiltrantes de tumor, tienen una dinámica mitocondrial alterada (Siska et al., 2017).

## **2.2 Participación de la mitocondria en los linfocitos TCD8+ en cáncer**

Como ya se mencionó, la mitocondria tiene un papel muy importante para las células. En las células T, se requiere un cambio metabólico para su activación, cuando las células T se activan por medio de la vía de TCR y moléculas de coestimulación, OXPHOS pasa a glucólisis. El cambio de metabolismo ayuda al

incremento de la función efectora y aumentar la producción de células de memoria (Prado-García et al., 2020; Siska et al., 2017).

El ambiente tumoral puede afectar la función y desarrollo de las células T, debido a la deficiencia de nutrientes, así como el exceso de productos de desecho del metabolismo provenientes de las células tumorales que favorecen la acidosis, como son el lactato y otros metabolitos. Esto promueve una disfunción en la mitocondria y por lo tanto una deficiencia metabólica (Menk et al., 2018).

Se ha visto que, en enfermedades virales, la limitación de glucosa en etapas tempranas de la diferenciación de las células TCD8+ efectoras, promueve el agotamiento de las células. En estas células la masa mitocondrial, el potencial de membrana mitocondrial y especies reactivas de oxígeno (ROS), están alteradas (Deguit et al., 2019) y las células son incapaces de proliferar o producir moléculas efectoras (Chao et al., 2017). Algunas alteraciones mitocondriales están relacionadas con el agotamiento de las células TCD8+ en infecciones virales como el VIH (Deguit et al., 2019). Si la limitación de glucosa es crónica, el fenotipo de agotamiento persiste y puede promover la expresión de la molécula de muerte programada 1 (PD-1) (Prado-García et al., 2020). Esto también se ha observado en células TCD8+ infiltrantes de tumor, provenientes de pacientes con carcinoma de células renales de células claras (Siska et al., 2017).

Cuando hay niveles altos de ácido láctico en el microambiente contribuye a que haya una disfunción metabólica de las células T, disminuyendo la producción de citocinas por las células TCD8+ estimuladas con PMA hasta un 50%, mientras que la proliferación disminuye un 95%. La acidosis láctica también decrementa la actividad citolítica de las células TCD8+ *in vitro*. También se ha demostrado que la acidosis promueve la inhibición de la actividad citotóxica en las células TCD8+ contra las células tumorales. De la misma forma, la acidosis inhibe la desgranulación citolítica, la producción de citocinas y bloquea la inducción de células TCD8+ antígeno específicas *in vitro* (Prado-García et al., 2020).

### **2.3 Análisis de la masa y el potencial de membrana mitocondrial en linfocitos TCD8+ de pacientes con cáncer pulmonar**

Sandoval (2018) realizó un estudio en linfocitos TCD8+ provenientes de pacientes con cáncer pulmonar y demostró que las células TCD8+ provenientes de derrame pleural de pacientes con cáncer pulmonar tienen alteraciones mitocondriales.

En linfocitos TCD8+ de memoria provenientes de derrame pleural maligno hay una mayor proporción de células con alto contenido de masa mitocondrial, así como despolarización mitocondrial, asociándose con mitocondrias fragmentadas disfuncionales. El aumento de la masa mitocondrial también se ha observado en células TCD8+ de memoria en estado de senescencia al tener mitocondrias de un tamaño mayor al normal y con la pérdida total o parcial de la estructura de las crestas (Sandoval, 2018).

Estas alteraciones incrementan al momento de estimular a las células por medio de la vía TCR y coestimulación. Sandoval (2018) encontró que el contenido de masa mitocondrial y potencial de membrana disminuye ante esos estímulos, por lo cual estas células son incapaces de sostener el metabolismo oxidativo, afectando el proceso de activación.

### **3. Justificación**

El cáncer pulmonar es uno de los tipos de cáncer con mayor frecuencia y mortalidad a nivel mundial. En México se encuentra en séptimo lugar de incidencia; sin embargo, se encuentra en primer lugar de muerte por cáncer.

Las células TCD8+ tienen un papel importante en la respuesta inmune contra el cáncer. Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que la población de los linfocitos TCD8+ que infiltran derrames pleurales de pacientes con cáncer de pulmón, presentan alteraciones en su funcionalidad. Además, su masa mitocondrial disminuye ante los estímulos policlonales con los anticuerpos  $\alpha$ CD3 y  $\alpha$ CD28, por lo cual puede haber una alteración en la dinámica mitocondrial.

Por este motivo, en este estudio nos enfocamos en el análisis de la expresión de genes que participan en la dinámica mitocondrial de linfocitos TCD8+, ante los estímulos policlonales con los anticuerpos  $\alpha$ CD3 y  $\alpha$ CD28, lo que servirá para comprender si existe una alteración en la dinámica mitocondrial, particularmente un aumento de mitofagia, y fisión mitocondrial en las células TCD8+ procedentes de derrame pleural y de sangre periférica de pacientes con cáncer pulmonar respecto a los linfocitos TCD8+ procedentes de sangre periférica de sujetos sanos.



#### **4. Hipótesis**

Si las células TCD8+, provenientes de derrame pleural de pacientes con cáncer pulmonar, son estimuladas por medio de moléculas de coestimulación ( $\alpha$ CD28) y por la vía del TCR ( $\alpha$ CD3), la expresión de los genes que promueven la fisión mitocondrial (DRP1) y la mitofagia (PINK1), aumentarán. Asimismo, la expresión de los genes que promueven la fusión (OPA1) y biogénesis mitocondrial (NRF1) disminuirán promoviendo una alteración en la dinámica mitocondrial.

## 5. Objetivos

### Objetivo general

Analizar los niveles de expresión de los genes OPA1, DRP1, NRF1 y PINK1 en linfocitos TCD8+, activados por medio de TCR y de moléculas de coestimulación, obtenidos del derrame pleural y de sangre periférica de pacientes con cáncer pulmonar, así como de sangre periférica de sujetos sanos.

### Objetivos particulares

- Estandarizar la técnica de PCR en tiempo real (RT-qPCR) para la determinación de la expresión de los genes OPA1, DRP1, NRF1 y PINK1 en linfocitos TCD8+, utilizando como gen endógeno  $\beta$ -2-microglobulina.
- Determinar el porcentaje de linfocitos TCD8+ purificados y activados, obtenidos a partir de las muestras de derrames pleurales, de sangre periférica de pacientes con cáncer pulmonar y de sujetos sanos.
- Evaluar si existen diferencias en la expresión del mRNA de los genes OPA1, DRP1, NRF1 y PINK1 en linfocitos TCD8+ en los grupos estudiados.

## **6. Materiales y métodos**

### **6.1 Población estudiada**

En este estudio se purificaron los linfocitos TCD8+ de muestras de líquido pleural de cuatro pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar, estadio IV, y muestras de sangre periférica de tres pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar y carcinoma epidermoide, estadio IV y IIIB, respectivamente, sin tratamiento antitumoral previo.

Además, se purificaron los linfocitos TCD8+ de sangre periférica de tres sujetos sanos.

Las muestras se obtuvieron de pacientes que asistieron a consulta en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” y que dieron su consentimiento para utilizar las muestras biológicas con fines de investigación. El Comité de Investigación y Ética en Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” aprobó el protocolo para la obtención de estas muestras biológicas con el número B07-13. Las muestras fueron tomadas y almacenadas antes del inicio de la pandemia provocada por el virus SARS-CoV-2.

### **6.2 Purificación de células TCD8+**

La purificación de células TCD8+ se llevó a cabo descongelando viales de células mononucleares de derrame pleural o sangre periférica provenientes de pacientes o sujetos sanos previamente almacenadas en tanques de nitrógeno líquido. Las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 y posteriormente se lavaron por centrifugación. El botón obtenido se resuspendió en buffer PBS/BSA 0.05% con EDTA. Las células se contaron utilizando una cámara de Neubauer distinguiendo células vivas de muertas por medio de un colorante supravital (azul tripano), obteniendo la concentración celular y el porcentaje de viabilidad. Se tomó una alícuota para evaluar el porcentaje de células TCD8+ antes de purificar, dicha alícuota se reservó en hielo.

El tubo con el resto de las células se lavó y se resuspendió en 80  $\mu$ L de buffer PBS/BSA 0.05% con EDTA, se le añadió 20  $\mu$ L de CD8 MicroBeads (Miltenyi Biotec,

CA, USA) que consistían en perlas ferromagnéticas conjugadas con anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -CD8 (lo que hay que incluir es la clona, si es que la indica, no el isotipo). Se dejaron incubar 15 minutos en hielo, pasado ese tiempo se les agregó 2 mL de buffer PBS/BSA 0.05% con EDTA, para realizarles un lavado, las células se resuspendieron en 500  $\mu$ L de buffer PBS/BSA 0.05% con EDTA, para realizar la purificación de las células.

La purificación de las células se realizó utilizando una columna magnética MACS humedeciendo la columna con el buffer PBS/BSA 0.05% con EDTA, posteriormente se añadió la suspensión de CMN, primero se recuperó la fracción negativa, que correspondió a las células que son TCD8<sup>-</sup>, lavando cuatro veces la columna. Se añadió a la columna buffer PBS/BSA 0.05% con EDTA, se retiró la columna del magneto y se recuperó la fracción positiva que corresponde a las células TCD8<sup>+</sup>.

Ambas fracciones se lavaron y resuspendieron en buffer PBS/BSA 1%. Se contaron las células de cada fracción utilizando una cámara de Neubauer y se tomaron alícuotas de ambas fracciones para proseguir con la inmunofenotipificación para analizar el porcentaje de células TCD8<sup>+</sup> obtenidas de la purificación.

#### - Inmunofenotipificación de células TCD8<sup>+</sup>

Para realizar la inmunofenotipificación por citometría de flujo y evaluar la pureza de la población purificada, se preparó una mezcla de los anticuerpos acoplados a diferentes fluorocromos:  $\alpha$ CD3 (1:600),  $\alpha$ CD4 (1:300) y  $\alpha$ CD8 (1:300) (Tabla 1). Se agregó 2.5  $\mu$ L del mix de anticuerpos a las células TCD8<sup>+</sup>, en un volumen final de 300  $\mu$ L y se incubó 20 minutos a temperatura ambiente. Después de ese tiempo se lavó el pozo con las células con PBS/BSA 1%, para eliminar el exceso de anticuerpos. Las células se fijaron con paraformaldehído al 1%. Posteriormente se realizó la lectura en el citómetro de flujo BD FACSCanto II (Becton Dickinson, CA, USA). Se analizaron las gráficas de puntos, en el software FlowJo v10.6.1 de Becton Dickinson.

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para la tinción de células TCD8+ purificadas y evaluadas por citometría de flujo.

Anticuerpo	Clona	Casa comercial
$\alpha$ CD3 PE-flour 610	UCHT1	Thermo Fisher Scientific, USA
$\alpha$ CD4 PE	OKT4	BioLegend, CA, USA
$\alpha$ CD8 PECy5	HIT8a	BioLegend, CA, USA

### 6.3 Estimulación policlonal de linfocitos T

La estimulación policlonal de las células TCD8+ se llevó a cabo estimulando con el anticuerpo  $\alpha$ CD3 (Ultra- LEAF Purified anti-human CD3 antibody, clona HIT3A, BioLegend, CA, USA). El anticuerpo  $\alpha$ CD3 se incubó en una placa de 96 pozos a 37° C durante 90 minutos, a una concentración de 10 $\mu$ g/mL en un volumen final de 50  $\mu$ L por pozo. Posteriormente, se lavó el pozo con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo y las células fueron cultivadas a una concentración de 1x10<sup>6</sup> células/mL en un volumen final de 100  $\mu$ L por pozo.

Para realizar el estímulo del TCR y de moléculas de coestimulación, se utilizaron perlas de activación, las que consistían en (anticuerpos  $\alpha$ CD2,  $\alpha$ CD3 y  $\alpha$ CD28 adsorbidos a perlas de látex (kit T Cell Activation/Expansion, Miltenyi Biotec CA, US). Se colocaron 2.5  $\mu$ L de perlas de activación en 50  $\mu$ L (dilución 1:20) de medio RPMI 1640 y se mezcló con una concentración celular de 5x10<sup>6</sup>/mL en un volumen final de 50  $\mu$ L de medio RPMI 1640, para sembrar las células con las perlas en un volumen final de 100  $\mu$ L por pozo. Como control negativo se sembró la misma concentración de células en un pozo al que no se añadió anticuerpo  $\alpha$ CD3. La placa se incubó a 37° C con una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas.

- Inmunofenotipificación de la activación de las células TCD8+

Para evaluar si las células TCD8+ fueron estimuladas, se sembraron dos pozos, uno sin estimular y otro estimulado con el anticuerpo  $\alpha$ CD3, como se mencionó anteriormente. Los pozos se recuperaron en tubos de citometría y se preparó una mezcla de los anticuerpos conjugados a diferentes fluorocromos:  $\alpha$ CD69 (1:150),  $\alpha$ CD45 (1:150) y  $\alpha$ CD8 (1:150) (Tabla 2), con un volumen final de 300  $\mu$ L por tubo, se incubó 30 minutos a 4°C. Después de ese tiempo se lavó con PBS/BSA 1%, para eliminar el exceso de anticuerpos. Las células se fijaron con paraformaldehído al 1%. Posteriormente se realizó la lectura en el citómetro de flujo BD FACSCanto II. Se analizaron las gráficas de puntos en el software FlowJo v10.6.1.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para la tinción de células TCD8+ activadas y evaluadas por citometría de flujo.

Anticuerpo	Clona	Casa comercial
$\alpha$ CD69 Alexa Fluor 647	FN50	BioLegend, CA, USA
$\alpha$ CD45 FITC	HI30	BioLegend, CA, USA
$\alpha$ CD8 APC/Cy7	SKI	BioLegend, CA, USA

## 6.4 Análisis citométrico

### a) Purificación de células TCD8+

Los tubos obtenidos se leyeron en el citómetro de flujo, se elaboraron gráficas de tamaño (FSC) vs granularidad (SSC), para discriminar la zona en donde se encuentran los linfocitos (no mostrado). A partir de esa región, se realizó una gráfica de los parámetros CD3 ( $\alpha$ CD3 PE-flour 610) vs (SSC), para seleccionar a la población CD3+ (linfocitos T). De la región CD3+ se elaboró la gráfica CD8 ( $\alpha$ CD8 PECy5) vs CD4 ( $\alpha$ CD4 PE) para obtener los porcentajes de células TCD8+ purificadas (Figura 7).

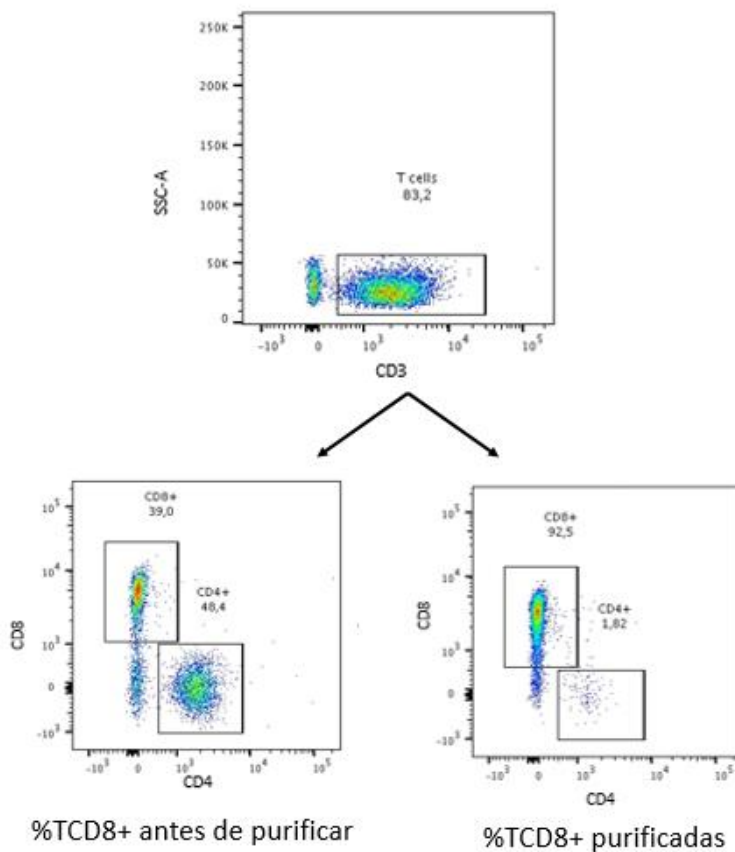


Figura 7. Análisis citométrico para determinar el porcentaje de linfocitos TCD8+, a partir de una muestra de células mononucleares provenientes de sangre periférica de un sujeto sano.

b) Activación de células TCD8+

Las muestras obtenidas, se leyeron en el citómetro de flujo, para el análisis de la activación de las células TCD8+ se elaboraron las gráficas de tamaño (FSC) vs granularidad (SSC), para discriminar la zona en donde se encuentran los linfocitos (no mostrado), a partir de esa región, se realizó una gráfica de los parámetros CD45 ( $\alpha$ CD45 FITC) vs granularidad (SSC), para obtener a las células CD45+, por último se elaboró un gráfico de los parámetros SSC vs CD69 para obtener el porcentaje de células TCD8+ activadas previamente purificadas (Figura 8).

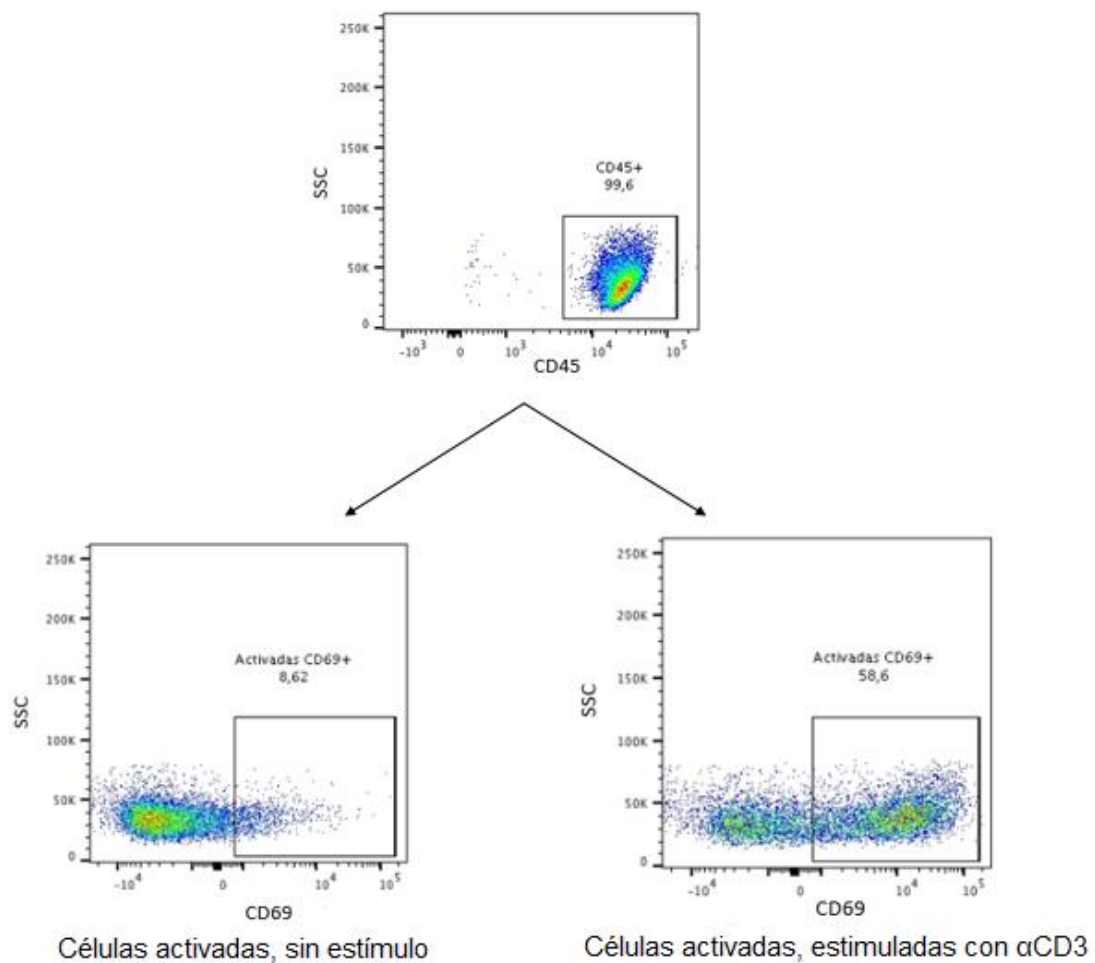


Figura 8. Análisis citométrico para determinar el porcentaje de linfocitos TCD8+ activados, estimulados con  $\alpha$ CD3 y sin estimular.



## **6.5 Elección de los genes**

Para elegir los genes de este estudio se analizó la expresión de cada uno de los genes involucrados en la dinámica mitocondrial (OPA1, MFN1, MFN2, DRP1, FIS1, MFF, PINK1, BECN1, PARKIN, NRF1, NRF2, PGC1 y TFAM) en tres líneas celulares dos de carcinoma pulmonar (A-549, A-427) y una de fibroblastos provenientes de tejido pulmonar (MRC-5) mediante PCR de punto final y electroforesis. Los genes fueron elegidos de acuerdo a la detección de una sola banda de amplificación (resultados no mostrados).

## **6.6 Estandarización de la qPCR**

Para llevar a cabo la estandarización de la técnica qPCR, se llevó a cabo lo siguiente:

### **6.6.1 Extracción de RNA total de linfocitos TCD8+ de un sujeto sano estimulados por perlas de activación**

La extracción de RNA total, se realizó por medio del kit RNeasy Micro Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), cuya metodología se describe a continuación. El primer paso fue recuperar los linfocitos TCD8+ de los pozos de cultivo. Posteriormente se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos, el pellet celular obtenido se resuspendió en 350  $\mu$ L del Buffer RLT para lisar las células. Después se adicionaron 350  $\mu$ L de etanol al 70%, la mezcla se transfirió a la columna RNeasy MinElute con un tubo colector, se centrifugó a 14 000 rpm durante 15 segundos; a continuación, se le agregó 350  $\mu$ L de Buffer RW1 y se volvió a centrifugar a las mismas condiciones.

Posteriormente, se realizó un tratamiento con DNasa (QIAGEN, Hilden, Germany) de la siguiente manera: primero se mezcló 10  $\mu$ L de DNasa con 70  $\mu$ L de Buffer RDD, esta mezcla se agregó a la columna y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se le agregó 350  $\mu$ L del buffer RW1, se centrifugó a 14 000 rpm durante 15 segundos y se adicionó 500  $\mu$ L de buffer RPE, se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. Posteriormente, se le agregó a la columna 500  $\mu$ L de etanol al 80% y se centrifugó a 14000 rpm durante 2 minutos, subsecuentemente se volvió a centrifugar a la misma velocidad durante 5 minutos.

Se colocó la columna en un tubo colector, se le adicionaron 14  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNAsas, DNAsas y estéril, por último, se centrifugó a 14000 rpm durante 1 minuto. Para la cuantificación del RNA total purificado se realizó una dilución con agua desionizada 1:5 del RNA extraído. La cuantificación se llevó a cabo en el equipo de NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). El RNA obtenido se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 6.6.2 Retrotranscripción

Para realizar la retrotranscripción y obtener el DNA complementario (cDNA) se emplearon 13 a 47  $\text{ng}/\mu\text{L}$  de RNA total y se le adicionó 2  $\mu\text{L}$  de Oligo(dT)<sub>12-18</sub>Primer (Invitrogen, CA, USA). Usando el termociclador (Mastercycler EP, Eppendorf, Germany), esta mezcla se incubó a  $70^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos para que ocurra la hibridación el Oligo (dT), con la cola poli(A) del mRNA mensajero. Después de este tiempo se le adicionó la siguiente mezcla: 4.63  $\mu\text{L}$  5x First Strand Buffer (Invitrogen), 2  $\mu\text{L}$  DTT 0.1 mM (Invitrogen), 1  $\mu\text{L}$  dNTPs 25 mM, 0.3  $\mu\text{L}$  Inhibidor de RNAsa (Invitrogen), y 1  $\mu\text{L}$  enzima RT (Invitrogen). El programa del termociclador (Mastercycler EP) para realizar la síntesis del cDNA consistió en un ciclo de  $22^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos y un ciclo a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 60 minutos. El cDNA obtenido se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su uso posterior.

Para corroborar que las reacciones de retrotranscripción se llevaron a cabo de la forma correcta, se hizo el PCR de punto final de  $\beta$ -2-microglobulina, observando los amplicones en un gel de agarosa al 1.2%, observando la banda correspondiente de las muestras analizadas.

Posteriormente con el cDNA obtenido se realizó lo siguiente:

#### a) Matriz de *primers*

Se realizó una matriz de *primers* para conocer la concentración adecuada de *primers* para cada reacción. Se realizó una matriz de *primers* 2x2 en la cual se probaron dos concentraciones de cada *primer*: 180 nM y 300nM como se muestra en la Tabla 2. Cada reacción de PCR fue de un volumen total de 13  $\mu\text{L}$ , que contenía 6.5  $\mu\text{L}$  de SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems), los volúmenes

correspondientes para la matriz de *primers* (Tabla 3), 2.5  $\mu$ L de cDNA y H<sub>2</sub>O cuanto baste para 13  $\mu$ L. Cada reacción de PCR se realizó por duplicado, mediante el programa de reacción establecido en el termociclador ABI Prism 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems) (Tabla 4).

Tabla 3. Concentraciones de *primers* utilizados en la matriz.

<i>Primer forward</i>	<i>Primer reverse</i>		
	Concentración	180nM	300nM
	180nM	180nM/180nM (0.47 $\mu$ L/0.47 $\mu$ L)	180nM/300nM (0.47 $\mu$ L/0.78 $\mu$ L)
	300nM	300nM/180nM (0.78 $\mu$ L/0.47 $\mu$ L)	300nM/300nM (0.78 $\mu$ L/0.78 $\mu$ L)

Tabla 4. Programa para llevar a cabo el qPCR.

	Temperatura	Tiempo en minutos	Número de ciclos
Activación de la enzima	50°C	2:00	1
Pre-desnaturalización	95°C	10:00	1
Desnaturalización	95°C	1:00	40
Alineamiento	60°C	0:15	
Elongación			

#### b) Curva de disociación

Para corroborar la especificidad de los *primers*, se incluyó una curva de disociación en el programa de qPCR en tiempo real para cada par de *primers*: DRP1, OPA1, PINK1, NRF1 y  $\beta$ -2-microglobulina. La curva de disociación consistió en aumentar la temperatura gradualmente hasta los 95°C, con la finalidad de desnaturalizar la doble cadena de los productos obtenidos durante el PCR. Posteriormente, se disminuyó la temperatura de la reacción hasta 60°C, lo que renaturaliza las cadenas de DNA con el propósito de ver cuántos picos de disociación se forman en esa reacción. Para un par de *primers* específicos para un gen, deben generar un solo producto observándose un pico de disociación, comprobando la especificidad de los *primers*.

#### c) Determinación del rango dinámico.

Se realizó la curva estándar para obtener el rango dinámico indicando el rango de concentraciones entre las cuales la amplificación de ambos genes, el gen de interés y el control endógeno fue óptima. Al obtener el rango dinámico también se determinaron los ciclos umbrales en los cuales la reacción de PCR del gen de interés y del gen endógeno se llevó a cabo a la misma velocidad.

Se realizaron 5 diluciones seriadas a partir de cDNA de células TCD8+ estimuladas, partiendo de una dilución 1:100 (utilizando 1  $\mu$ L de cDNA en 99  $\mu$ L de agua desionizada libre de RNasa y DNasa) para los genes OPA1, DRP1 y NRF1 y una dilución inicial 1:33 (1.82  $\mu$ L de cDNA y 58.18  $\mu$ L de agua desionizada libre de RNasa y DNasa) para el gen PINK1. Posteriormente, se realizaron cuatro diluciones 1:3 para todos los genes. De cada dilución se tomó 8.5  $\mu$ L (Figura 9).

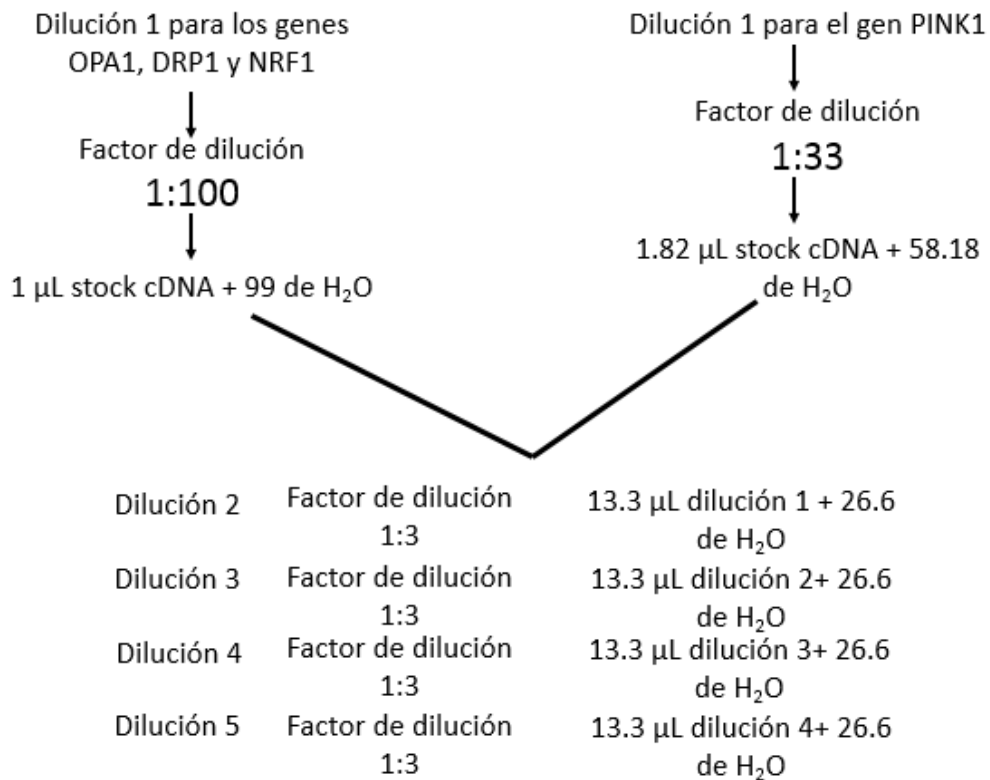


Figura 9. Diagrama para realizar las diluciones seriadas para la curva estándar de cada uno de los genes.

### 6.7 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Una vez estandarizada la técnica, se realizó la extracción de RNA total como se explicó con anterioridad, al igual que la reacción de retrotranscripción.

La amplificación de PCR en tiempo real se llevó a cabo en placas de 96 pozos (Applied Biosystems), se utilizó SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems) y *primers* específicos para cada gen de interés, los cuales fueron diseñados por la Dra. Susana Romero y sintetizados en el Instituto de Biotecnología, UNAM (Tabla 5).

Tabla 5. Características de los primers utilizados en este ensayo. DRP1: Dynamine 1 like, OPA1: mitochondrial dynamin like GTPase, PINK1: PTEN induced kinase 1, NRF1: Nuclear respiratory factor 1 y  $\beta$ -2-M:  $\beta$ -2 microglobulina.

	Secuencia sentido	Longitud	Secuencia antisentido	Longitud
DRP1	5' CTGTCACTGCTGCTAATACAG	21	5' TAGCTGGCTCCTGTAACTAC	21
OPA1	5' GGCTCGTCTCAAGGATACTG	20	5' GTTCTTCCGGACTGTGGTTAT	21
PINK1	5' GCTGCAGTGCTGCTGTGTAT	20	5' CTGGAGGAACCTGCCGAGAT	20
NRF1	5' ATGAAGACTCGCCTTCTTCTC	21	5' TTGTTGCCTCTTCCGGATAGA	21
$\beta$ -2-M	5' TTCCTGAAGCTGACAGCATT	21	5' CAATGTCGGATGGATGAAACC	21

### 6.8 Análisis estadístico

La expresión de los genes se normalizó respecto al gen endógeno  $\beta$ -2-microglobulina. La expresión relativa de los genes de interés se llevó a cabo utilizando el método comparativo  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . En este método primero se normalizan los datos respecto al gen endógeno. Posteriormente, utilizando los datos procedentes de la normalización se compara la expresión del gen de interés en las células con estímulos respecto a las células sin estímulo (Romero-García et al., 2014).

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prims 8.4.1. Para determinar si había diferencias significativas entre los diferentes estímulos se utilizó la prueba de ANOVA de una vía y como prueba post hoc, se empleó la prueba de Dunnett's. El valor que se consideró para significancia estadística fue de  $p \leq 0.05$ .

## 7. Resultados

### 7.1 Purificación y activación de células TCD8+

Se realizó la purificación de células TCD8+ a partir de células mononucleares provenientes de derrame pleural (DP) (n=4), sangre periférica de pacientes con cáncer pulmonar (SPC) (n=2) y sangre periférica de sujetos sanos (SPS) (n=3), obteniendo un porcentaje de pureza superior al 88% (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentajes de las células TCD8+ obtenidas de la purificación por medio de columna magnética.

Muestra	Antes de purificar ( $\pm$ SD)	Purificadas ( $\pm$ SD)
SPS	42.1 $\pm$ 2.454	94.03 $\pm$ 2.980
SPC	54.45 $\pm$ 13.85	97.08 $\pm$ 3.018
DP	21.475 $\pm$ 3.386	89.025 $\pm$ 1.084

Para comprobar si las células TCD8+ fueron estimuladas vía TCR ( $\alpha$ CD3), se analizó la expresión de la molécula CD69, que deben expresar las células activadas por el estímulo TCR ( $\alpha$ CD3). De esta forma se analizaron las células TCD8+ provenientes de SPS (n=2), DP (n=2) y SPC (n=2), obteniendo un porcentaje superior al 40% de células TCD8+ activadas (Tabla 7), por lo que el estímulo funcionó.

Tabla 7. Porcentajes de las células TCD8+CD69+ posterior al estímulo por vía TCR ( $\alpha$ CD3).

Muestra	Sin estímulo ( $\pm$ SD)	Estimuladas con $\alpha$ CD3 ( $\pm$ SD)
SPS	0.735 $\pm$ 0.145	55.45 $\pm$ 4.85
SPC	0.27 $\pm$ 0.06	40.1 $\pm$ 13.6
DP	24.11 $\pm$ 15.49	63.85 $\pm$ 5.25

## 7.2 Estandarización de la qPCR

### - Comprobación de las reacciones de retrotranscripción

Se corroboró la obtención de cDNA de las reacciones de retrotranscripción para cada sujeto de estudio. Para la corroboración se realizó el PCR de punto final de  $\beta$ -2-microglobulina, para cada una de las condiciones: sin estímulo, estimuladas con  $\alpha$ CD3 y estimuladas con perlas de activación.

Se observaron los amplicones en un gel de agarosa al 1.2%, como se muestra en la Figura 10.

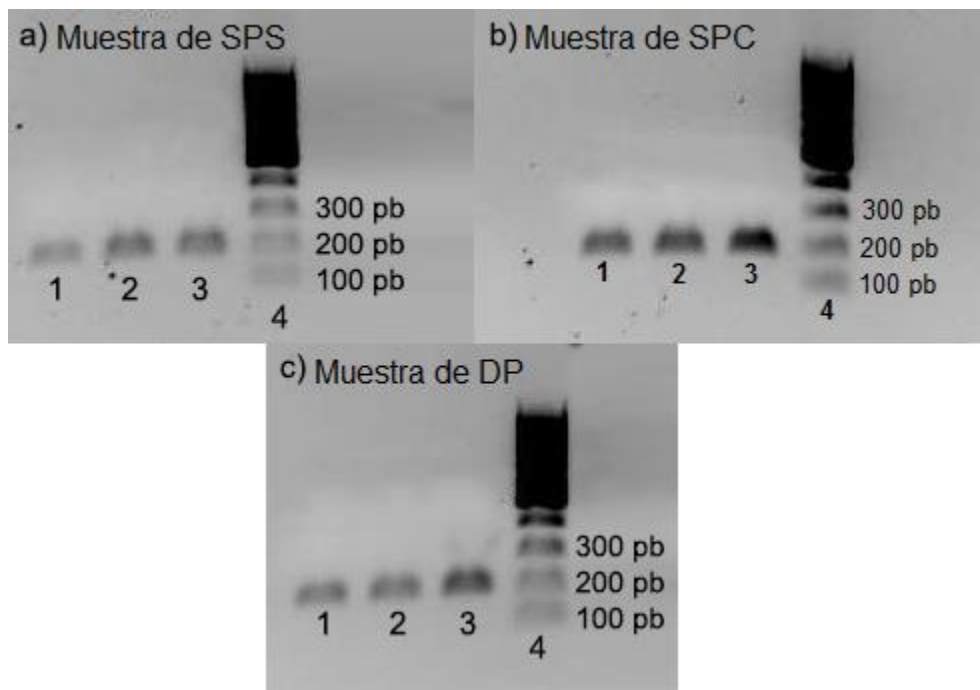


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa 1.2% de los productos amplificados por PCR de punto final del gen endógeno  $\beta$ -2-microglobulina. 1. cDNA de células TCD8+ sin estímulo. 2. cDNA de células TCD8+ estimuladas con  $\alpha$ CD3. 3. cDNA de células TCD8+ estimuladas con perlas de activación. 4. Marcador de peso molecular.

### - Elección de la concentración de los *primers*

La concentración óptima de los *primers* se eligió de acuerdo con la intensidad de la fluorescencia emitida y el ciclo umbral ( $C_T$ ) generado, lo que indica un mayor número de copias de la amplificación. Las concentraciones seleccionadas para cada par de *primers* fueron de 300nM (*Primer forward*) – 300nM (*Primer reverse*) para todos los



genes OPA1, DRP1, NRF1, PINK1 y también para el gen endógeno  $\beta$ -2 microglobulina (Figura 11).

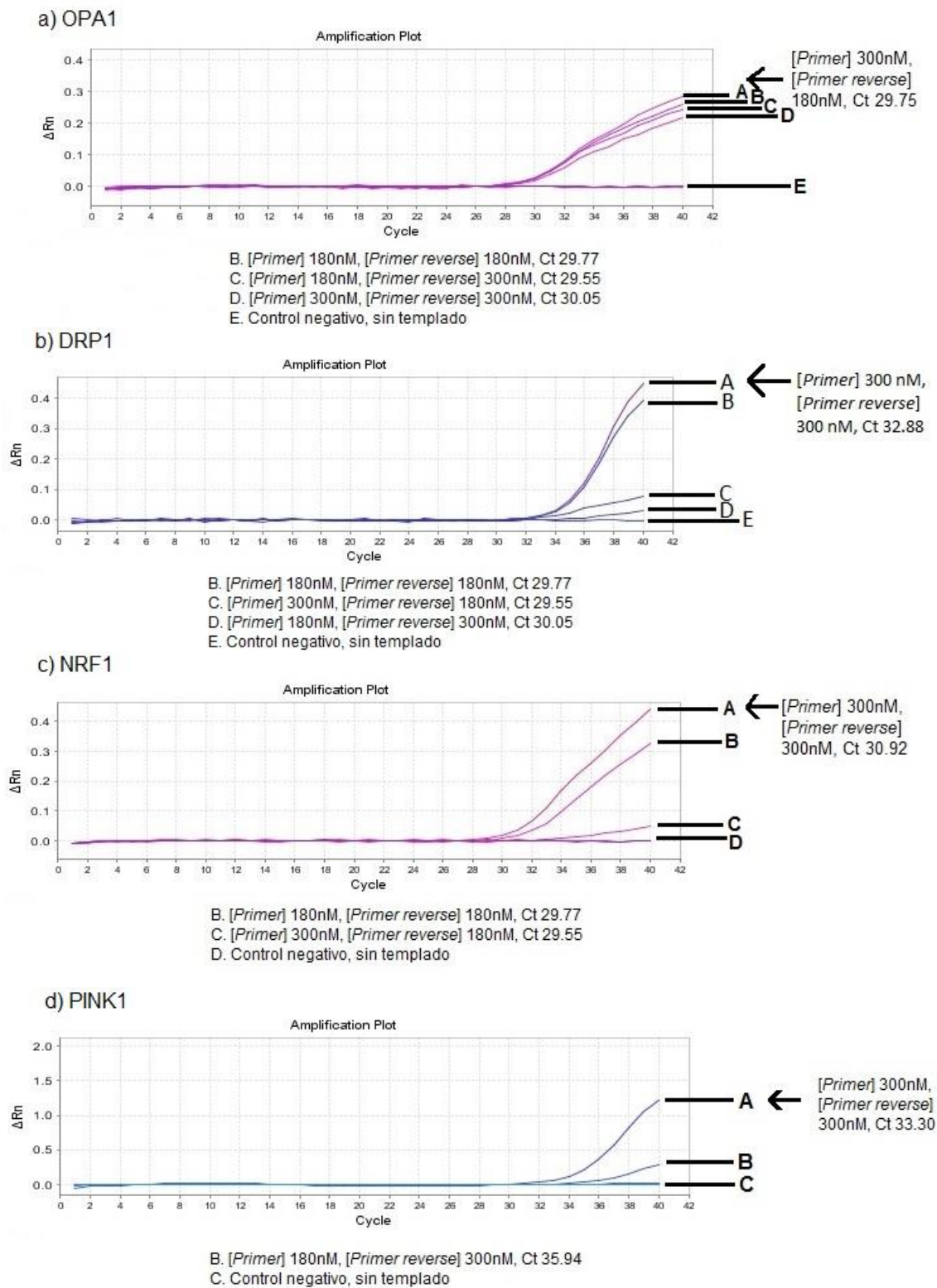


Figura 11. Curvas de amplificación de las matrices de primers de cada gen.

- **Comprobación de la especificidad de los *primers* para la reacción qPCR**  
Después de obtener la curva de disociación, la cual se explica en la sección de Materiales y Métodos. Se observó un solo pico de disociación para cada par de *primers* analizados; por lo que para cada par de *primer* evaluado no se generó ningún producto inespecífico en las reacciones de PCR (Figura 12).

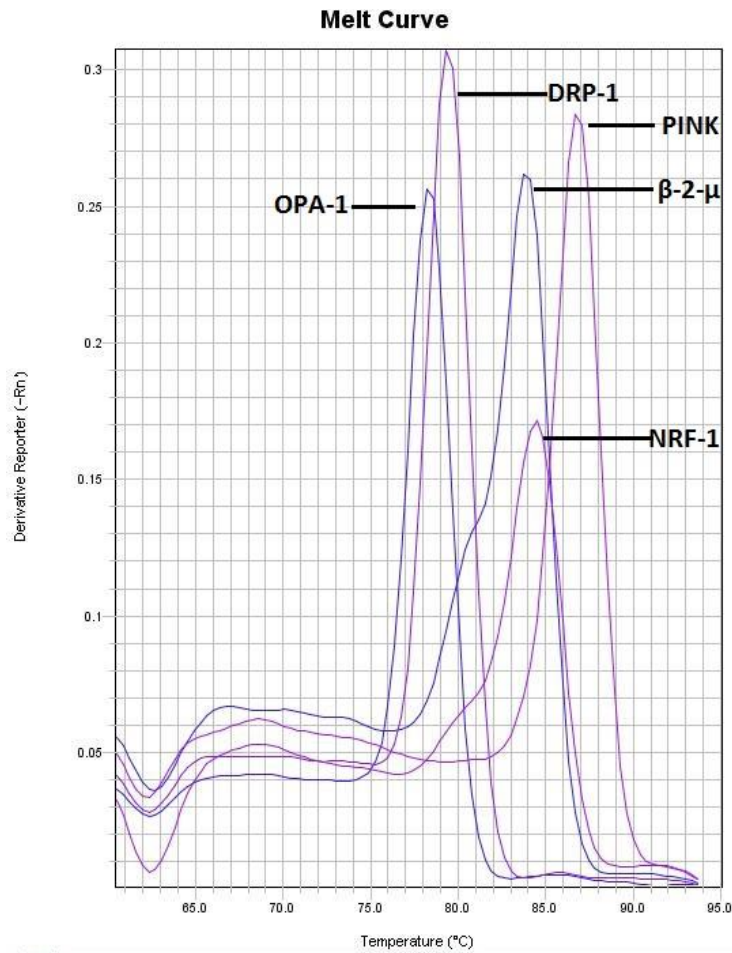


Figura 12. Curva de disociación de los productos obtenidos con los primers diseñados para la amplificación de los transcritos de los genes OPA1, DRP1, NRF1, PINK1 y β-2-microglobulina (β-2-μ).

- **Curvas estándar para la obtención del rango dinámico**

Después de correr las reacciones de PCR en tiempo real utilizando diluciones seriadas del cDNA de células TCD8+ estimuladas con las perlas de activación ( $\alpha$ CD2,  $\alpha$ CD3 y  $\alpha$ CD28) con, 300 nM de cada par de primers, se obtuvieron los valores  $C_T$  (Cycle threshold) para cada dilución de cDNA. Posteriormente, se graficó el logaritmo de la concentración de cada una de las diluciones de cDNA respecto al  $\Delta C_T$ , en donde el valor de  $\Delta C_T$ , se obtuvo restándole el promedio de  $C_T$  del gen endógeno al promedio de  $C_T$  del gen de interés para cada dilución (Figura 13).

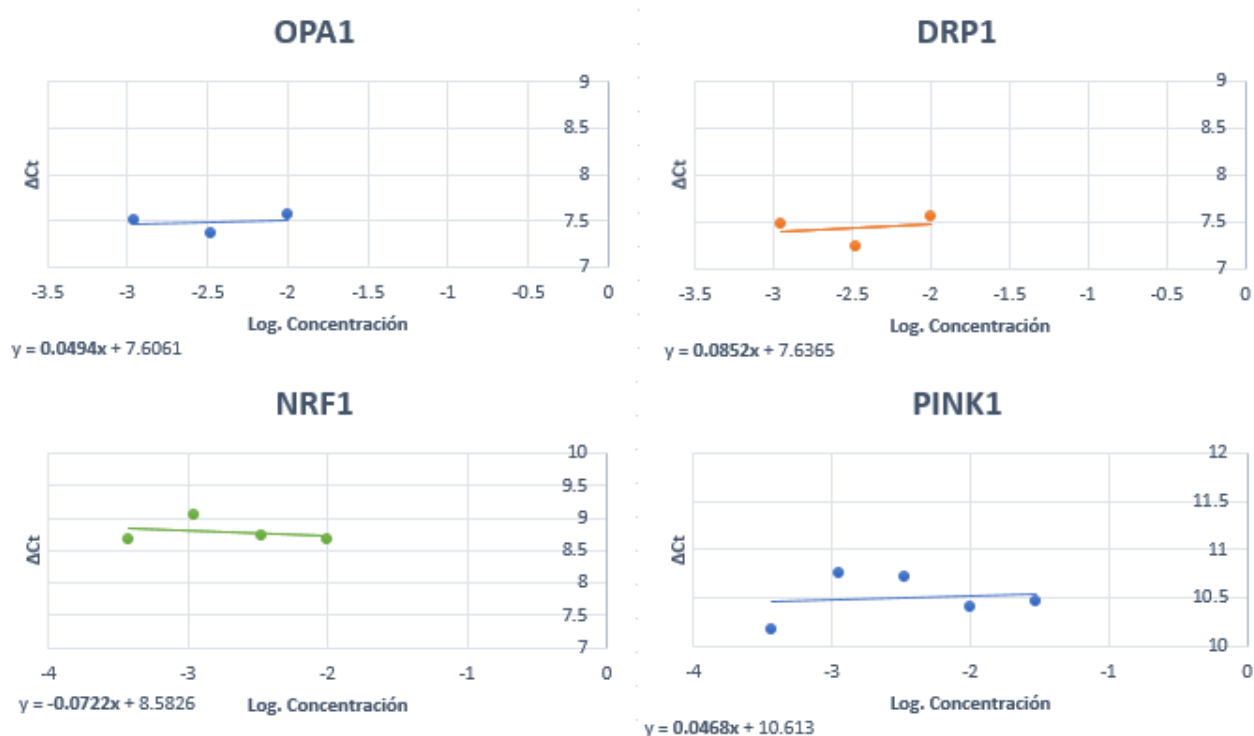


Figura 13. Curvas de eficiencia relativa para la amplificación de cada gen respecto al gen endógeno b2-microglobulina.

A partir de las curvas de eficiencia relativa se obtuvo la ecuación de la recta. La pendiente fue menor a 0.1 en todas las gráficas, lo que la valida el intervalo de concentraciones y los valores de ciclos umbrales entre los que la velocidad de las reacciones de PCR tanto del gen de interés como del gen endógeno es la misma. Se utilizó un intervalo de concentración de 400 a 900 ng/ $\mu$ L de cDNA de las muestras para obtener los valores de ciclos umbrales entre los ciclos 20 a 36.

### **7.3 Expresión relativa de los niveles de expresión del mRNA de los genes OPA1, DRP1, NRF1 y PINK1 en células TCD8+ de pacientes con cáncer respecto a sujetos sanos**

Los valores de los ciclos umbrales ( $C_T$ ) obtenidos para cada uno de los genes de interés de los diferentes grupos ante las condiciones sin estímulo y estimuladas fueron normalizados con los valores de los  $C_T$  obtenidos para el gen endógeno  $\beta$ -2-microglobulina, obteniendo el valor de  $\Delta C_T$ .

Primero, quisimos conocer cómo se encontraban los niveles de expresión de los genes analizados en las muestras de pacientes con cáncer (SPC y DP) respecto a las muestras de sujetos sanos (SPS). Para esto se utilizaron los valores de  $\Delta C_T$  de las muestras de sujetos sanos y sin estimular como calibrador. Se llevó a cabo la comparación entre los grupos por medio del método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , también llamado método  $C_T$  comparativo (Romero-García et al., 2014). Los valores del calibrador después de aplicar el método  $C_T$  comparativo adquirieron el valor de 1. Con este método se comparó la expresión relativa basal del mRNA de los genes OPA1, DRP1, NRF1 y PINK1 de las muestras de pacientes con cáncer respecto a las muestras de sujetos sanos en condiciones sin estimular (Figura 14).

Haciendo el análisis del  $C_T$  comparativo encontramos que los niveles del mRNA de OPA1 de células TCD8+ en pacientes con cáncer son diferentes a los niveles encontrados en los sujetos sanos. Los niveles del mRNA de OPA1 se encontraron significativamente disminuidos en el grupo SPC, pero significativamente aumentados en el grupo DP. En el caso de los niveles del mRNA de DRP1, éstos se encontraron significativamente aumentados en el grupo DP respecto a los niveles del mRNA de DRP1 de células TCD8+ de sujetos sanos. Por otro lado, no se observó ningún cambio significativo en la expresión de NRF1 y PINK1 entre los grupos DP y SPC y el grupo SPS (calibrador) (Figura 14).

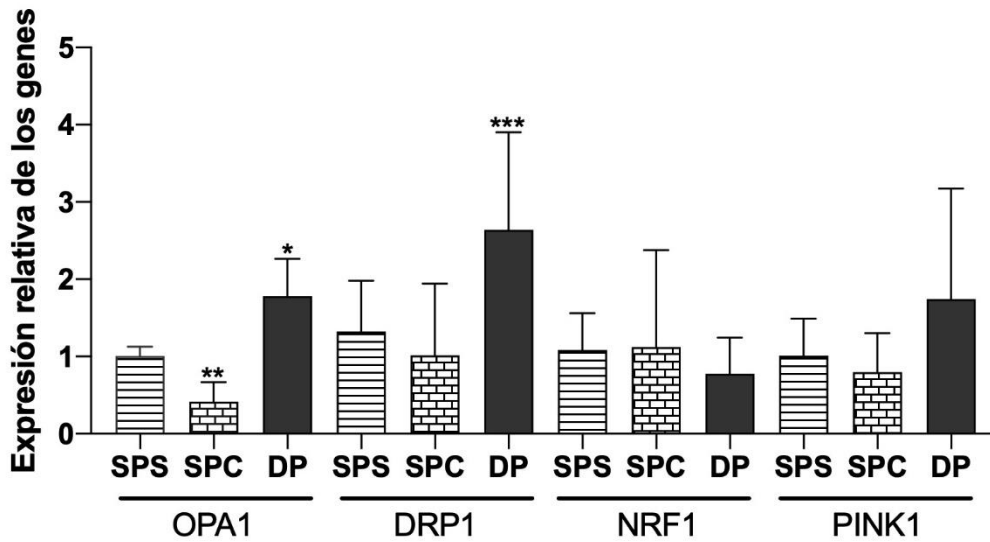


Figura 14. Expresión del mRNA de OPA1, DRP1, NRF1 y PINK1 en células TCD8+ provenientes de sangre periférica de sujetos sanos (SPS) y pacientes con cáncer pulmonar (SPC), así como de derrame pleural de pacientes con cáncer pulmonar (DP). Los valores de expresión de los sujetos sanos fueron utilizados como control para comparar la expresión del mRNA y ajustados a 1. Diferencias significativas de \* $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$  con respecto a los grupos de los sujetos sanos sin estimular. Medida de dispersión: SD.

### **7.3.1 Expresión relativa del mRNA de OPA1 en células TCD8+ estimuladas respecto a las células no estimuladas de pacientes con cáncer de pulmón y de sujetos sanos**

Se analizó la expresión del mRNA de OPA1 en las células TCD8+ obtenidas de sangre periférica de sujetos sanos (SPS) y de pacientes con cáncer pulmonar (SPC) así como de derrame pleural de pacientes con cáncer pulmonar (DP). Los tres grupos de células TCD8+ se trataron de la siguiente manera: 1) sin estímulo (SE), 2) estímulo con  $\alpha$ CD3 ( $\alpha$ CD3) y 3) estímulo con  $\alpha$ CD3 y  $\alpha$ CD28 (Perlas).

Después de hacer la normalización con  $\beta$ -2-microglobulina, se utilizaron los valores de  $\Delta C_T$  de la condición sin estímulo (SE), como calibrador. Se llevó a cabo la comparación entre los grupos por medio del método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . Los valores del calibrador después de aplicar el método  $C_T$  comparativo adquirieron el valor de 1. A partir del análisis comparativo se observó que los niveles del transcrito del gen OPA1 aumentaron significativamente cuando se estimuló con perlas de activación en los grupos SPS y SPC. En el caso del grupo SPC también aumentó significativamente cuando se estimuló con  $\alpha$ CD3. Por el contrario, en el grupo DP, no hubo cambio en la expresión del mRNA que codifica para el gen OPA1 (Figura 15). Lo que podría significar que las células TCD8+ provenientes de derrame pleural presentan deficiencias en el proceso de fusión mitocondrial.

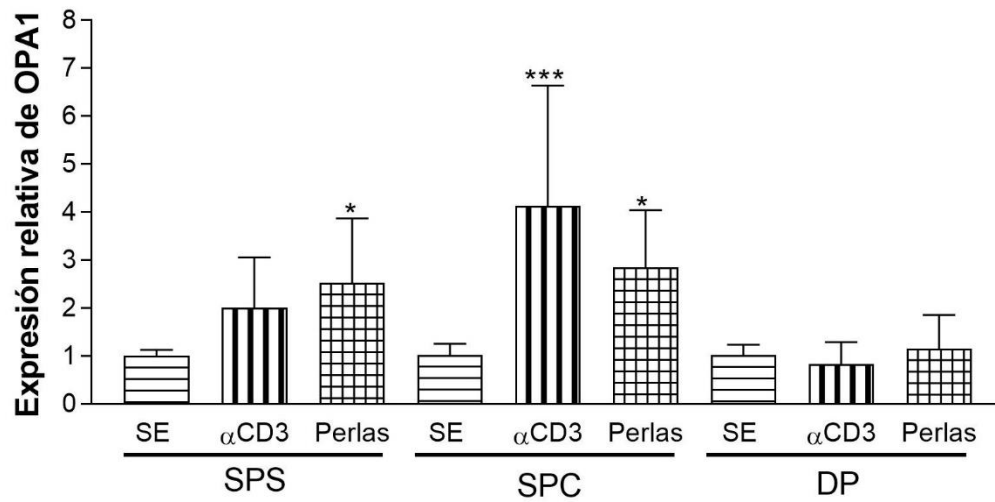


Figura 15. Análisis de la expresión del mRNA de OPA1 en células TCD8+ provenientes de sangre periférica de sujetos sanos (SPS) y pacientes con cáncer pulmonar (SPC), así como de derrame pleural de pacientes con cáncer pulmonar (DP) estimuladas con  $\alpha$ CD3 y con perlas respecto a sin estímulo (SE) mediante qPCR. Los valores de la condición SE fueron ajustadas a 1 y utilizadas como control para comparar la expresión del mRNA. Diferencias significativas de \* $p \leq 0.05$  y \*\*\*  $p \leq 0.001$  con respecto a los grupos sin estimular. Medida de dispersión: SD.

### 7.3.2 Expresión relativa del mRNA de DRP1 en células TCD8+ estimuladas respecto a las células no estimuladas de pacientes con cáncer de pulmón y de sujetos sanos

Después de hacer el análisis comparativo, se encontró que los niveles expresión del mRNA de DRP1 aumentaron significativamente cuando las células TCD8+ se estimularon con perlas en los grupos SPS y DP, y con  $\alpha$ CD3 en el grupo SPC (Figura 16). Esto podría indicar que en las células TCD8+ provenientes de DP, al ser estimuladas con perlas de activación, las mitocondrias se fisioan.

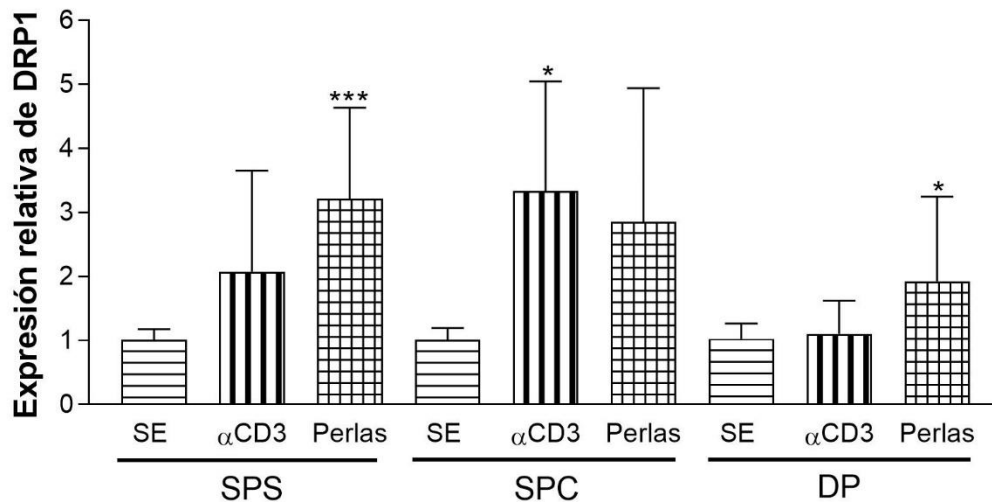


Figura 16. Análisis de la expresión del mRNA de DRP1 en células TCD8+ provenientes de sangre periférica de sujetos sanos (SPS) y pacientes con cáncer pulmonar (SPC), así como de derrame pleural de pacientes con cáncer pulmonar (DP) estimuladas con  $\alpha$ CD3 y con perlas respecto a sin estímulo (SE) mediante qPCR. Los valores de la condición SE fueron ajustadas a 1 y utilizadas como control para comparar la expresión del mRNA. Diferencias significativas de \* $p < 0.05$  y \*\*\*  $p < 0.001$  con respecto a los grupos sin estimular. Medida de dispersión: SD.



### 7.3.3 Expresión relativa del mRNA de NRF1 en células TCD8+ estimuladas respecto a las células no estimuladas de pacientes con cáncer de pulmón y de sujetos sanos

Se encontró que la expresión relativa del mRNA de NRF1 disminuyó significativamente cuando las células TCD8+ se estimularon con  $\alpha$ CD3 en los tres grupos estudiados (SPS, SPC y DP). También, la expresión de NRF1 disminuyó significativamente cuando las células TCD8+ se estimularon con perlas en los grupos SPS y DP (Figura 17). Estos resultados podrían inferir que el proceso de biogénesis mitocondrial se encuentra disminuido en las células TCD8+ de los tres grupos de este estudio al ser estimuladas con  $\alpha$ CD3 y con las perlas de activación.

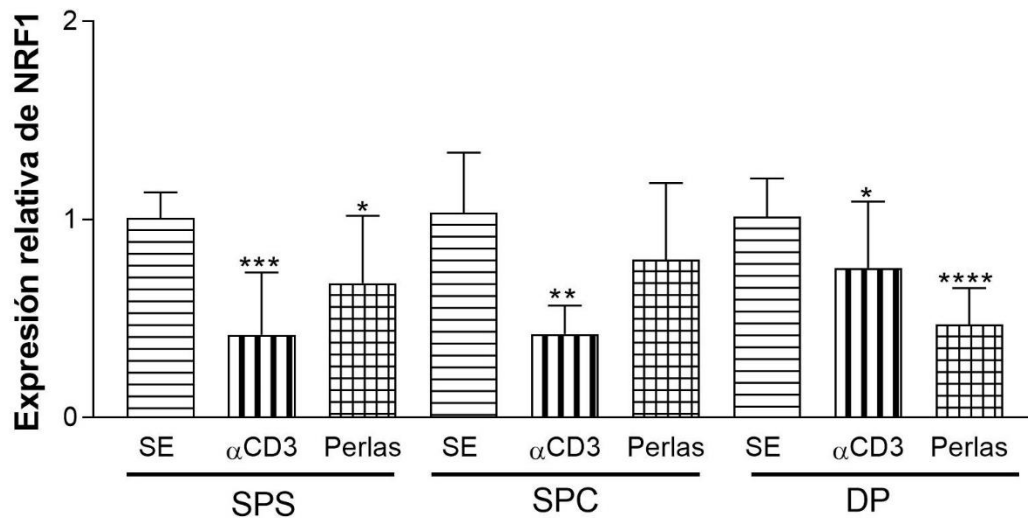


Figura 17. Análisis de la expresión del mRNA de NRF1 en células TCD8+ provenientes de sangre periférica de sujetos sanos (SPS) y pacientes con cáncer pulmonar (SPC), así como de derrame pleural de pacientes con cáncer pulmonar (DP) estimuladas con  $\alpha$ CD3 y con perlas respecto a sin estímulo (SE) mediante qPCR. Los valores de expresión de los sujetos sanos fueron ajustados a 1 y utilizados como control para comparar la expresión del mRNA. Diferencias significativas de \* $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$  y \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$  con respecto a los grupos sin estimular. Medida de dispersión: SD.

### 7.3.4 Expresión relativa del mRNA de PINK1 en células TCD8+ estimuladas respecto a las células no estimuladas de pacientes con cáncer de pulmón y de sujetos sanos

Se observó que en células TCD8+ los niveles de transcrito para el gen PINK1 disminuyeron significativamente al ser estimuladas con  $\alpha$ CD3 y con las perlas de activación, en todos los grupos. Interesantemente, se observó que el estímulo con las perlas de activación provocó una disminución mayor en los niveles del mRNA de PINK1 que el estímulo con  $\alpha$ CD3 (Figura 18). Estos resultados podrían indicar que el proceso de mitofagia se inhibe en las células TCD8+ estimuladas provenientes de SPS, SPC y DP.

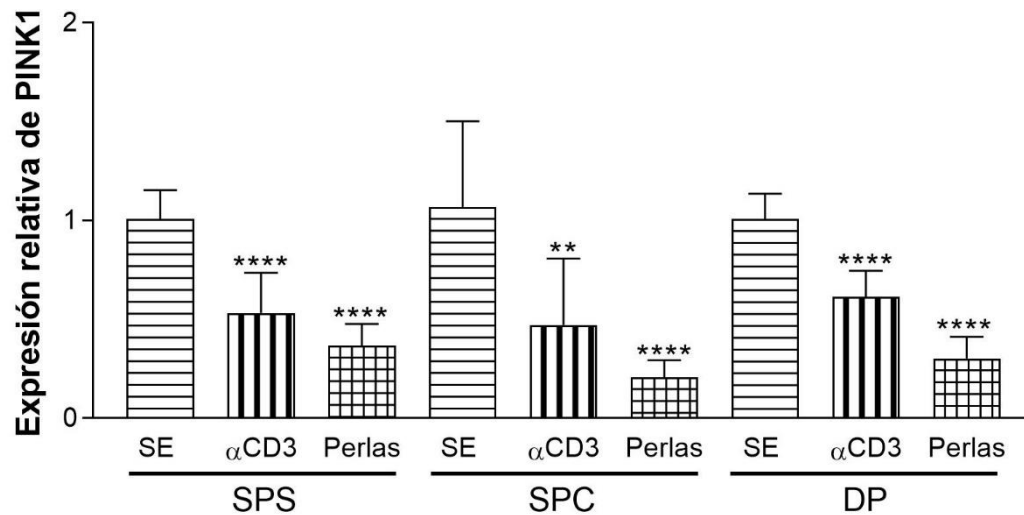


Figura 18. Análisis de la expresión del mRNA de PINK1 en células TCD8+ provenientes de sangre periférica de sujetos sanos (SPS) y pacientes con cáncer pulmonar (SPC), así como de derrame pleural de pacientes con cáncer pulmonar (DP) estimuladas con  $\alpha$ CD3 y con perlas respecto a sin estímulo (SE) mediante qPCR. Los valores de expresión de los sujetos sanos fueron ajustados a 1 y utilizados como control para comparar la expresión del mRNA. Diferencias significativas de \*\*  $p \leq 0.01$  y \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$  con respecto a los grupos sin estimular. Medida de dispersión: SD.

### 7.3.5 Cuantificación relativa de los niveles de expresión del mRNA de los genes OPA1, DRP1, NRF1 y PINK1 en células TCD8+ de pacientes con cáncer respecto al grupo sin estimular

Se obtuvieron los valores de la cuantificación relativa de cada uno de los genes OPA1, DRP1, NRF1 y PINK1 para cada uno de los grupos estudiados y los estímulos realizados. En la Tabla 8 se puede observar que en el grupo SPC y DP la expresión relativa del gen DRP1 aumenta respecto a los demás genes al ser estimuladas las células con Perlas. Lo que podría sugerir que en las células TCD8+ provenientes de SPC y DP, los procesos de fusión y fisión se están llevando a cabo de una manera desequilibrada.

Tabla 8. Valores de la expresión relativa del mRNA de los genes OPA1, DRP1, NRF1 y PINK1.

	SPS ( $\pm$ SD)		SPC ( $\pm$ SD)		DP ( $\pm$ SD)	
	$\alpha$ CD3	Perlas	$\alpha$ CD3	Perlas	$\alpha$ CD3	Perlas
OPA1	2.009 $\pm$ 1.044	2.521 $\pm$ 1.348	4.921 $\pm$ 2.398	3.307 $\pm$ 1.223	0.762 $\pm$ 0.494	1.159 $\pm$ 0.699
DRP1	1.575 $\pm$ 1.572	3.218 $\pm$ 1.418	4.076 $\pm$ 1.200	3.886 $\pm$ 1.770	0.942 $\pm$ 0.571	1.926 $\pm$ 1.321
NRF1	0.387 $\pm$ 0.316	0.680 $\pm$ 0.340	0.387 $\pm$ 0.135	0.856 $\pm$ 0.437	0.578 $\pm$ 0.416	0.471 $\pm$ 0.183
PINK1	0.413 $\pm$ 0.278	0.368 $\pm$ 0.110	0.496 $\pm$ 0.391	0.156 $\pm$ 0.050	0.463 $\pm$ 0.283	0.234 $\pm$ 0.155

## 8. Discusión

La mitocondria tiene un papel importante en las células del sistema inmune. Esto se debe a que el metabolismo energético está involucrado en el proceso de activación y en el funcionamiento de las células inmunitarias. Las células T requieren un cambio metabólico para su activación, para que lleven a cabo las funciones efectoras y para la producción de células de memoria (Prado-García et al., 2020; Siska et al., 2017).

En ambientes tumorales, las células T tienen defectos en su desarrollo y función, debido a la escasez de nutrientes y a la acidosis que se produce por metabolitos que secretan las células tumorales. También las células T infiltrantes de tumor pueden presentar un estado de agotamiento que posiblemente se produce por un mal de la mitocondria y por lo tanto el metabolismo energético también podría estar afectado (Menk et al., 2018; Prado-García et al., 2020; Scharping et al., 2016).

Las mitocondrias pueden modificar su morfología al formar redes o al encontrarse como mitocondrias aisladas. Al formar redes ayudan al metabolismo presentando un alto potencial de membrana. Pero al encontrarse las mitocondrias fisionadas son poco activas y con un potencial de membrana bajo (Dong et al., 2018; Giacomello et al., 2020; Tilokani et al., 2018; Westermann, 2010). El funcionamiento de las mitocondrias en las células TCD8+ en cáncer es poco conocido y aún menor en cáncer pulmonar. Los cambios en el potencial de membrana y masa mitocondrial han sido observados en células TCD8+ provenientes de derrame pleural de pacientes con cáncer pulmonar, después de activarlos por medio de la vía TCR y moléculas de coestimulación (Sandoval, 2018). Se demostró que el contenido de masa mitocondrial y potencial de membrana disminuye ante estos estímulos. Por lo cual, estas células son incapaces de sostener el metabolismo oxidativo, afectando el proceso de activación (Sandoval, 2018).

En este trabajo se realizó un análisis transcripcional de transcritos de genes involucrados en la dinámica mitocondrial para conocer si las mitocondrias de las células TCD8+ presentan alteraciones. Las células TCD8+ provenientes de SPC presentaron un aumento en la expresión del mRNA de OPA1 ante los estímulos con  $\alpha$ CD3 y con perlas de activación, mientras que en las células TCD8+ provenientes

de DP se encontró disminuida (Figura 15). Esto puede deberse a que las células TCD8+ de SPC, al no encontrarse en un microambiente tumoral, su activación por medio de TCR ( $\alpha$ CD3) y por moléculas de coestimulación ( $\alpha$ CD28), posiblemente induce a la fusión mitocondrial provocando un aumento en OXPHOS (Prado-García et al., 2020). Este incremento en OXPHOS estimula la fusión de la membrana mitocondrial interna por medio de la proteasa Yme1L, la cual genera la isoforma soluble (OPA1 corta) de OPA1, provocando que OPA1 pueda hacer la fusión de las membranas internas (Mishra & Chan, 2016).

Por otro lado, las células TCD8+ provenientes de DP, al estar en el microambiente tumoral, presentan un fenotipo disfuncional. Estas células TCD8+ están estresadas por estar en un ambiente hipóxico con falta de nutrientes como la glucosa (Prado-García et al., 2020). Lo anterior provoca que las células TCD8+ no utilicen OXPHOS y sean dependientes de la glucólisis aeróbica, esto puede derivar a la disminución de la expresión del mRNA de OPA1 lo que podría provocar una disminución en la fusión mitocondrial (Mishra & Chan, 2016).

Otra explicación a la disminución del mRNA de OPA1 es debido a la estimulación con perlas de activación. Estos dos estímulos ( $\alpha$ CD3 y  $\alpha$ CD28) disminuyen el potencial de membrana (Sandoval, 2018) lo que activa a la proteasa Oma1 que conduce a la inactivación y desprendimiento de la isoforma OPA1 largo de la membrana interna, por lo que la fusión mitocondrial podría no llevarse a cabo (Chao et al., 2017; Mishra & Chan, 2016).

Se ha reportado que la expresión de OPA1 promueve la formación de células T de memoria, además al generar que las crestas mitocondriales se encuentren estrechamente asociadas, favorece el mantenimiento de un mayor potencial de membrana, así como el metabolismo oxidativo. Al tener las crestas estrechamente asociadas favorecen al complejo de la cadena de transporte de electrones al mantener los complejos de igual forma (Buck et al., 2016; Chao et al., 2017; Prado-García et al., 2020).

La estrecha organización de las crestas y el mantenimiento del metabolismo oxidativo a nivel celular promueve una mejor respuesta de las células T, aumentando su longevidad y su producción de citocinas (Buck et al., 2016; Klein

Geltink et al., 2017). Además, de que la fusión mitocondrial promueve la oxidación de ácidos grasos (FAO), que también es importante para la formación y supervivencia de las células T<sub>M</sub>. Por lo cual la disminución de la expresión de OPA1 es desfavorable en la respuesta inmunitaria contra células tumorales, cumpliendo con la hipótesis que las células TCD8+, provenientes de derrame pleural de pacientes con cáncer pulmonar, estimuladas por medio de moléculas de coestimulación ( $\alpha$ CD28) y por la vía del TCR ( $\alpha$ CD3), la expresión de los genes involucrados en la dinámica mitocondrial estaría desequilibrada. Cumpliendo que el gen OPA1 disminuyó.

Los niveles de expresión del mRNA de DRP1 aumentaron cuando las células TCD8+ se estimularon con  $\alpha$ CD3 y  $\alpha$ CD28 en los grupos SPS y DP y con  $\alpha$ CD3 en el grupo SPC (Figura 16). En este sentido Siska et al., (2017) demostraron que las células TCD8+ infiltrantes de tumor provenientes del carcinoma de células claras presentan mitocondrias fragmentadas ante el estímulo con  $\alpha$ CD3. Esto se puede deber a que las células TCD8+ al ser activadas llevan a cabo el cambio del fenotipo de T<sub>N</sub> a T<sub>E</sub>. Se ha comprobado que las células T<sub>E</sub> presentan las mitocondrias fragmentadas en comparación a las T<sub>N</sub> (Buck et al., 2016; Chao et al., 2017).

DRP1 está involucrado en la activación de las células T debido a que las mitocondrias tienen que transportarse al lugar de la sinapsis inmunológica (Baixauli et al., 2011). Baixauli et al., (2011) determinaron que la fisión de las mitocondrias podría proteger a las células T de la despolarización mitocondrial y de la señalización de calcio amplificada, desencadenada por la activación de la célula.

Buck et al., (2016) demostraron que al encontrarse las mitocondrias fisionadas, las crestas mitocondriales se encuentran separadas y disfuncionales debido que se asociaron, con una disminución en la transferencia de electrones, favoreciendo un aumento en la glucólisis (Baixauli et al., 2011; Klein Geltink et al., 2017; Siska et al., 2017), lo que limita la capacidad de las células TCD8+ de activarse (Siska et al., 2017). Por lo tanto, la expresión del mRNA de DRP1 podría estar desbalanceada en los diferentes grupos estudiados, debido que al incremento de la expresión no es igual que el grupo control (SPS) y los grupos SPC y DP.

Se observó que la expresión del mRNA de NRF1 disminuyó significativamente cuando las células TCD8+ se estimularon con  $\alpha$ CD3 y con perlas de activación en los tres grupos estudiados (SPS, SPC y DP) (Figura 17). Este resultado fue el esperado y acorde a la hipótesis. Aunque hay evidencia de que después de la activación de las células T hay aumento en la biogénesis mitocondrial (Dimeloe et al., 2017). Se ha demostrado que la primera división celular de las células T se produce entre las 36 y 48 horas posteriores a la activación (Fisher et al., 2018). En este trabajo se evaluó la expresión de NRF1 a las 24 horas de estimulación, lo cual sugiere que posiblemente el tiempo no fue el suficiente para observar la biogénesis mitocondrial.

Adicionalmente, se ha comprobado que células TCD8+ infiltrantes de tumor presentan defectos en la biogénesis mitocondrial por la activación crónica de las células (Chao et al., 2017; Scharping et al., 2016), mostrando que PGC1 $\alpha$ , un coactivador de la expresión de NRF1, se encuentra inhibido por la expresión de la molécula PD-1 y por la vía AKT en las células TCD8+ infiltrantes de tumor con un fenotipo de agotamiento (Austin & St-Pierre, 2012; Chao et al., 2017; Scharping et al., 2016). Lo cual, podría explicar la disminución en la expresión del mRNA de NRF1. Sin embargo, no se observaron defectos en la biogénesis mitocondrial en los tres grupos, lo que hace pensar que la disminución de la expresión del mRNA de NRF1 es un comportamiento normal.

Al no estar expresado NRF1 que es un importante regulador transcripcional, no podría llevarse a cabo la conexión entre los genes que son codificados en el núcleo y la biogénesis mitocondrial. La cual es esencial para el metabolismo energético y biosíntesis de aminoácidos, eliminación de exceso de ROS y la apoptosis (Kiyama et al., 2018), esto puede llevar a la disfunción de la célula TCD8+.

Resulta interesante que los niveles de transcrito del gen PINK1, involucrado en el proceso de mitofagia, disminuyera significativamente en células TCD8+ al ser estimuladas con  $\alpha$ CD3 y con las perlas de activación en todos los grupos estudiados (Figura 18).

La proteína PINK1 es una cinasa que se encuentra en la mitocondria, pero la despolarización de la membrana mitocondrial, la expresión de DRP1 y el estrés

celular que sufren las células T infiltrantes de tumor, podrían provocar la acumulación de PINK1 en la membrana externa desencadenando la mitofagia (Mishra & Chan, 2016). El proceso de mitofagia es un mecanismo homeostático, al estar la célula T constantemente activada, la mitofagia evitará una mayor producción de ROS y daño en las células (Gómez-Cabañas et al., 2019). Si la mitofagia no se lleva a cabo, la función mitocondrial, así como la viabilidad y diferenciación de las células inmunitarias, podrían estar alteradas (Lazarou, 2015). Los niveles obtenidos de transcrito de PINK1 en las células TCD8+ en todos los grupos estudiados, sugieren que los niveles de estrés celular no son suficientes para desencadenar el proceso de mitofagia.

Por lo anterior mencionado las células TCD8+ de SPC y DP pudieran tener una dinámica mitocondrial desequilibrada, debido a que ante los estímulos que se les realizaron los niveles de los transcritos de OPA1 y DRP1 aumentaron, en el grupo SPC. Por otro lado, en el grupo DP las células TCD8+ al ser estimuladas con  $\alpha$ CD3 y con Perlas, la expresión de los genes OPA1 y DRP1 disminuyeron. Esto podría provocar un mal funcionamiento de las células TCD8+ en su respuesta inmunitaria contra el cáncer pulmonar.



## **9. Conclusiones y perspectivas**

Los resultados presentados demuestran que la dinámica mitocondrial en las células TCD8+ provenientes de derrame pleural y sangre periférica de pacientes con cáncer pulmonar podría estar alterada. Esto es sugerido por los cambios de expresión del mRNA de los genes OPA1 y DRP1 lo que podría sugerir que las mitocondrias se encuentran fisionadas, con lo que se cumple parcialmente la hipótesis.

Por otro lado, respecto a la expresión del mRNA de los genes NRF1 y PINK1 en células TCD8+ provenientes de SPC y DP se observó una disminución ante los dos estímulos, sugiriendo que los procesos de biogénesis mitocondrial y mitofagia podrían no estarse llevando a cabo. Al no aumentar la expresión PINK1, que se encarga de regular el proceso de mitofagia, no cumple completamente la hipótesis. Sin embargo, las alteraciones en la expresión de los diferentes genes podrían estar provocando defectos en la activación y función antitumoral de las células TCD8+.

Por lo antes ya mencionado, se propone analizar la expresión de las proteínas que codifican los genes OPA1, DRP1, NRF1 y PINK1 y así asociarlas con los niveles de expresión de los transcritos.

Este trabajo permitió conocer más acerca de cómo se pudieran estar llevando a cabo los procesos que conforman la dinámica mitocondrial en cáncer pulmonar, abriendo un panorama para el estudio de más genes involucrados en la dinámica mitocondrial.

## 10. Referencias

- Aryaman, J., Johnston, I. G., & Jones, N. S. (2019, January 25). Mitochondrial heterogeneity. *Frontiers in Genetics*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00718>
- Austin, S., & St-Pierre, J. (2012). PGC1 $\alpha$  and mitochondrial metabolism - emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *Journal of Cell Science*. Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/jcs.113662>
- Baixaui, F., Martín-Cófreces, N. B., Morlino, G., Carrasco, Y. R., Calabia-Linares, C., Veiga, E., ... Sánchez-Madrid, F. (2011). The mitochondrial fission factor dynamin-related protein 1 modulates T-cell receptor signalling at the immune synapse. *EMBO Journal*, 30(7), 1238–1250. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.25>
- Baniyash, M. (2004). TCR  $\zeta$ -chain downregulation: Curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nature Reviews Immunology*, 4(9), 675–687. <https://doi.org/10.1038/nri1434>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Buck, M. D., O'Sullivan, D., Klein Geltink, R. I., Curtis, J. D., Chang, C.-H., Sanin, D. E., ... Pearce, E. L. (2016). Mitochondrial Dynamics Controls T Cell Fate through Metabolic Programming. *Cell*, 166(1), 63–76. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.05.035>
- Chang, G., Zhang, W., Ma, Y., & Wen, Q. (2018). PINK1 expression is associated with poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 245(2), 115–121. <https://doi.org/10.1620/tjem.245.115>
- Chao, T., Wang, H., & Ho, P.-C. (2017). Mitochondrial Control and Guidance of Cellular Activities of T Cells. *Frontiers in Immunology*, 8, 473. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00473>
- Charalampidis, C., Youroukou, A., Lazaridis, G., Baka, S., Mpoukovinas, I., Karavasilis, V., ... Zarogoulidis, P. (2015). Pleura space anatomy. *Journal of Thoracic Disease*, 7(Suppl 1), S27-32. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2015.01.48>
- Choi, J., Meilleur, C. E., & Haeryfar, S. M. M. (2019). Tailoring In Vivo Cytotoxicity Assays to Study Immunodominance in Tumor-specific CD8+ T Cell Responses. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 1(147), 1–9. <https://doi.org/10.3791/59531>
- Costello, A. M., & S., B. (2019). Pleural effusion. In *Salem Press Encyclopedia of Health*.
- D'Agostino, H. P., & Edens, M. A. (2019). *Physiology, Pleural Fluid*. StatPearls Publishing. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30020725>
- Deguit, C. D. T., Hough, M., Hoh, R., Krone, M., Pilcher, C. D., Martin, J. N., ... Rutishauser, R. L. (2019). Some Aspects of CD8+ T-Cell Exhaustion Are Associated with Altered T-Cell Mitochondrial Features and ROS Content in HIV Infection. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 82(2), 211–219.

- <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000002121>
- Del Dotto, V., Fogazza, M., Carelli, V., Rugolo, M., & Zanna, C. (2018, April 1). Eight human OPA1 isoforms, long and short: What are they for? *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.01.005>
- Detmer, S. A., & Chan, D. C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(11), 870–879. <https://doi.org/10.1038/nrm2275>
- Dimeloe, S., Burgener, A. V., Grählert, J., & Hess, C. (2017, January 1). T-cell metabolism governing activation, proliferation and differentiation; a modular view. *Immunology*. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/imm.12655>
- Dong, A., Yu, Y., Wang, Y., Li, C., Chen, H., Bian, Y., ... Xie, K. (2018). Protective effects of hydrogen gas against sepsis-induced acute lung injury via regulation of mitochondrial function and dynamics. *International Immunopharmacology*, 65, 366–372. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.10.012>
- Fortner, K. A. (2017). T Lymphocytes. *Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology*, 189–206. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-31696-5.00012-7>
- Fumet, J.-D., Richard, C., Ledys, F., Klopfenstein, Q., Joubert, P., Routy, B., ... Ghiringhelli, F. (2018). Prognostic and predictive role of CD8 and PD-L1 determination in lung tumor tissue of patients under anti-PD-1 therapy. *British Journal of Cancer*, 119(8), 950–960. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0220-9>
- Giacomello, M., Pyakurel, A., Glytsou, C., & Scorrano, L. (2020). The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(April). <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0210-7>
- Gómez-Cabañas, L., López-Cotarelo, P., Criado-García, O., Murphy, M. P., Boya, P., & Rodríguez-Fernández, J. L. (2019). Immunological Synapse Formation Induces Mitochondrial Clustering and Mitophagy in Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 202(6), 1715–1723. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800575>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Karpathiou, G., & Peoc'h, M. (2019). Pleura revisited: From histology and pathophysiology to pathology and molecular biology. *The Clinical Respiratory Journal*, 13(1), 3–13. <https://doi.org/10.1111/crj.12982>
- Kiyama, T., Chen, C. K., Wang, S. W., Pan, P., Ju, Z., Wang, J., ... Mao, C. A. (2018). Essential roles of mitochondrial biogenesis regulator Nrf1 in retinal development and homeostasis 06 Biological Sciences 0601 Biochemistry and Cell Biology 11 Medical and Health Sciences 1109 Neurosciences. *Molecular Neurodegeneration*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0287-z>
- Klein Geltink, R. I., O'Sullivan, D., Corrado, M., Bremser, A., Buck, M. D., Buescher, J. M., ... Pearce, E. L. (2017). Mitochondrial Priming by CD28. *Cell*, 171(2), 385–397.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.018>
- Lazarou, M. (2015). Keeping the immune system in check: A role for mitophagy. *Immunology and Cell Biology*, 93(1), 3–10. <https://doi.org/10.1038/icb.2014.75>
- Menk, A. V., Scharping, N. E., Rivadeneira, D. B., Calderon, M. J., Watson, M. J., Dunstane, D., ... Delgoffe, G. M. (2018). 4-1BB costimulation induces T cell mitochondrial function and biogenesis enabling cancer immunotherapeutic

- responses. *Journal of Experimental Medicine*, 215(4), 1091–1100. <https://doi.org/10.1084/jem.20171068>
- Mishra, P., & Chan, D. C. (2016). Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *Journal of Cell Biology*, 212(4), 379–387. <https://doi.org/10.1083/jcb.201511036>
- Murphy, K. (2012). *ImmunoBiology (Janeway's) 8e*.
- Nisoli, E., & Carruba, M. O. (2006). Nitric oxide and mitochondrial biogenesis. *Journal of Cell Science*, 119(14), 2855–2862. <https://doi.org/10.1242/jcs.03062>
- Nurmik, M., Ullmann, P., Rodriguez, F., Haan, S., & Letellier, E. (2019). In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.32193>
- Pearce, E. L., Poffenberger, M. C., Chang, C. H., & Jones, R. G. (2013). Fueling immunity: Insights into metabolism and lymphocyte function. *Science*, 342(6155). <https://doi.org/10.1126/science.1242454>
- Porciello, N., & Tuosto, L. (2016). CD28 costimulatory signals in T lymphocyte activation: Emerging functions beyond a qualitative and quantitative support to TCR signalling. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 28(2015), 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2016.02.004>
- Prado-Garcia, H., Aguilar-Cazares, D., Flores-Vergara, H., Mandoki, J. J., & Lopez-Gonzalez, J. S. (2005). Effector, memory and naïve CD8+ T cells in peripheral blood and pleural effusion from lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer*, 47(3), 361–371. <https://doi.org/10.1016/J.LUNGCAN.2004.07.046>
- Prado-Garcia, H., Romero-Garcia, S., Aguilar-Cazares, D., Meneses-Flores, M., & Lopez-Gonzalez, J. S. (2012). Tumor-induced CD8+ T-cell dysfunction in lung cancer patients. *Clinical and Developmental Immunology*. <https://doi.org/10.1155/2012/741741>
- Prado-Garcia, H., Romero-Garcia, S., & Lopez-Gonzalez, J. S. (2015). The role of exhaustion in tumorinduced t cell dysfunction in cancer. In *Cancer Immunology: A Translational Medicine Context* (pp. 61–75). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-44006-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-662-44006-3_5)
- Prado-Garcia, H., Romero-Garcia, S., Morales-Fuentes, J., Aguilar-Cazares, D., & Lopez-Gonzalez, J. S. (2012). Activation-induced cell death of memory CD8+ T cells from pleural effusion of lung cancer patients is mediated by the type II Fas-induced apoptotic pathway. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 61(7), 1065–1080. <https://doi.org/10.1007/s00262-011-1165-5>
- Prado-Garcia, H., Sandoval-Martinez, R., & Romero-Garcia, S. (2020). T-Cell Metabolism and Its Dysfunction Induced by Cancer. *Cancer Immunology*, 107–116. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-30845-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-030-30845-2_7)
- Pustynnikov, S., Costabile, F., Beghi, S., & Facciabene, A. (2018). Targeting mitochondria in cancer: current concepts and immunotherapy approaches. *Translational Research*, 202, 35–51. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.07.013>
- Reckamp, K. L., Melnikova, V. O., Karlovich, C., Sequist, L. V., Camidge, D. R., Wakelee, H., ... Gadgeel, S. (2016). A highly sensitive and quantitative test platform for detection of NSCLC EGFR mutations in urine and plasma. *Journal of Thoracic Oncology*, 11(10), 1690–1700. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.05.035>
- Riley, J. S., & Tait, S. W. G. (2016). Mechanisms of mitophagy: Putting the powerhouse into the doghouse. *Biological Chemistry*, 397(7), 617–635.

- <https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0137>
- Romero-Garcia, S., Lopez-Gonzalez, J. S., Báez-Viveros, J. L., Aguilar-Cazares, D., & Prado-Garcia, H. (2011, December 1). Tumor cell metabolism: An integral view. *Cancer Biology and Therapy*. <https://doi.org/10.4161/cbt.12.11.18140>
- Romero-Garcia, S., Prado-Garcia, H., & Lopez-Gonzalez, J. S. (2014). Transcriptional analysis of hnRNPA0, A1, A2, B1, and A3 in lung cancer cell lines in response to acidosis, hypoxia, and serum deprivation conditions. *Experimental Lung Research*, 40(1), 12–21. <https://doi.org/10.3109/01902148.2013.856049>
- Sandoval, R. (2018). *Análisis de la masa y el potencial de membrana mitocondrial en linfocitos T CD8+*. INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.
- Scharping, N. E., Menk, A. V., Moreci, R. S., Whetstone, R. D., Dadey, R. E., Watkins, S. C., ... Delgoffe, G. M. (2016). The Tumor Microenvironment Represses T Cell Mitochondrial Biogenesis to Drive Intratumoral T Cell Metabolic Insufficiency and Dysfunction. *Immunity*, 45(2), 374–388. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.07.009>
- Sedlackova, L., & Korolchuk, V. I. (2019). Mitochondrial quality control as a key determinant of cell survival. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1866(4), 575–587. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2018.12.012>
- Siska, P. J., Beckermann, K. E., Mason, F. M., Andrejeva, G., Greenplate, A. R., Sendor, A. B., ... Rathmell, J. C. (2017). Mitochondrial dysregulation and glycolytic insufficiency functionally impair CD8 T cells infiltrating human renal cell carcinoma. *JCI Insight*, 2(12). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.93411>
- Skok, K., Hladnik, G., Grm, A., & Crnjac, A. (2019, August 1). Malignant pleural effusion and its current management: A review. *Medicina (Lithuania)*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/medicina55080490>
- Testa, U., Castelli, G., & Pelosi, E. (2018, August 1). Lung cancers: Molecular characterization, clonal heterogeneity and evolution, and cancer stem cells. *Cancers*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers10080248>
- Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V., & Prudent, J. (2018). Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays in Biochemistry*, 62(3), 341–360. <https://doi.org/10.1042/EBC20170104>
- Westermann, B. (2010, December 1). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm3013>
- WHO. (2018). WHO | Key facts about cancer. WHO. Retrieved from <https://www.who.int/cancer/about/facts/en/>
- Xia, F., Qian, C.-R., Xun, Z., Hamon, Y., Sartre, A.-M., Formisano, A., ... He, H.-T. (2018). TCR and CD28 Concomitant Stimulation Elicits a Distinctive Calcium Response in Naive T Cells. *Frontiers in Immunology*, 9, 2864. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02864>