



**Universidad de Concepción
Facultad Farmacia**

**EFFECTO DE LA TRANSFERENCIA ARTIFICIAL DE
MITOCONDRIAS OBTENIDAS DESDE LÍNEA CELULAR
HSC3 HACIA LINFOCITOS T CD4+, COMO UN
MECANISMO IMPULSOR DE UN FENOTIPO EXHAUSTO.**

POR BÁRBARA EVELYN ANTILEF CÁCERES

Tesis presentada a la facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción para optar al grado académico/Título profesional de Bioquímico.

Profesora Guía y patrocinante:

Dra. Estefanía Nova Lamperti
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Octubre-2022
Concepción, Chile

I. PÁGINA DE DERECHO DE AUTOR

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

© 2022, BÁRBARA EVELYN ANTILEF CÁCERES

II. AGRADECIMIENTOS:

Se agradece a Dios en primer lugar por brindarme la oportunidad de estudiar educación superior y postgrado por medio de una beca. Se agradece en especial a mi familia, principalmente a mi madre que ha estado brindándome apoyo durante todo mi desarrollo como bioquímica, por aguantar mis malos ratos producto de estrés universitario y carga académica. Se agradece a mi grupo de amigos por apoyarme en mis estudios en los centralazos para las evaluaciones y quienes hicieron mi estadía en la carrera de bioquímica agradable y a mi pareja y su familia por apoyarme en los momentos finales de la tesis, dándome ánimos y ayuda en lo que necesitaba.

Se agradece en particular a mi profesora tutora, quien me brindo conocimientos, técnicas y apoyo durante el desarrollo de mi tesis, no faltaron las risas por las equivocaciones en el laboratorio, pero fue un desarrollo de tesis agradable. Se agradece a todos los integrantes del equipo de laboratorio con quienes compartimos procedimientos, duras horas de trabajo en el laboratorio, compartiendo medios de cultivo, células y protocolos, sin los cuales no se pudo haber realizado esta tesis.

III. TABLA DE CONTENIDOS:

ÍNDICE

I. AGRADECIMIENTOS:	3
V. RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1 Cáncer y respuesta inmune	13
1.1.1 Alteración de la respuesta inmune antitumoral	21
1.1.2 Moléculas de superficie	27
1.2 Metabolismo y respuesta inmune celular:	38
1.2.1 Metabolismo alterado en el microambiente tumoral	41
1.3 Transferencia mitocondrial:	49
2. PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	64
2.1 Problema de investigación:	64
2.2 Pregunta de investigación:	64
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	65
3.1 HIPÓTESIS	65
3.3 Objetivos específicos:	65
4. MATERIALES Y MÉTODOS	66
4.1 Obtención de muestras:	66
4.1.1 Aislamiento de linfocitos T CD4 ⁺	66
4.1.2 Procesamiento de línea celular de cáncer:	69
4.1.3 Aislamiento de mitocondrias de células cancerosas:	69
4.2 MitoCeption	70
4.3 Ensayo de proliferación	71
4.4 Ensayo de expresión de moléculas de superficie:	73
6. RESULTADOS	75
7. DISCUSIÓN:	88

8. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES:	94
9. GLOSARIO:	95
10. BIBLIOGRAFÍA:	98
11. ANEXO:	112
11.1 Anexo n°1: fórmula para el conteo de células a través de la cámara de neubauer:	112
11.2 Anexo n°2: manejo de residuos biológicos:	112
11.3 Anexo n°3: documento de proyecto aceptado por el comité de ética, bioética y bioseguridad de la Universidad de Concepción.	113

IV. TABLA DE ILUSTRACIONES:

Ilustración 1: Representación de las funciones del linfocito TCD4 ⁺ en la inmunidad antitumoral (Tay R et al., 2021).....	19
Ilustración 2: Representación del consumo de nutrientes por parte de células cancerosas en el microambiente tumoral (Xia L et al., 2021)..	22
30	
Ilustración 3: Expresión del receptor inhibitorio PD-1 y su relación con la función efectora en linfocitos T CD8 ⁺ y TCD4 ⁺ a través de citometría de flujo (Ahmadzadeh M et al., 2009).....	30
Ilustración 4: Representación de la secreción de citoquinas de linfocitos T CD8 ⁺ PD-1 ⁺ y TCD8 ⁺ PD-1 ⁻ . (Ahmadzadeh M et al., 2009).....	31
Ilustración 5: Histogramas de la expresión de moléculas citotóxicas y CD107-a en linfocitos T CD8 ⁺ con expresión de PD-1 (Ma J et al., 2019).	32
Ilustración 6: Representación de las vías de señalización inhibitorias inducidas por receptores inhibitorios PD-1, CTLA-4, LAG3, TIM3 y TIGIT, y su efecto en el linfocito T (McLane L et al., 2015).	36
Ilustración 7: Representación del metabolismo del linfocito T durante su diferenciación, indicando el metabolismo principal para cada tipo de linfocito T (Angajala A et al., 2018).	40
Ilustración 8: Representación de la alteración mitocondrial en linfocitos T infiltrantes de tumores (TILs) en comparación con linfocitos de bazo y ganglios linfáticos (Yu Y et al., 2020).	44
Ilustración 9: Representación de la producción de especies reactivas de oxígeno en linfocitos T de bazo e infiltrantes de tumor (Yu Y et al., 2020).	45
Ilustración 10: Representación de la masa mitocondrial y captación de glucosa en células TCD8 ⁺ de sangre periférica y de HNSCC (Scharping N et al., 2016).	47
Ilustración 11: Representación de la relación entre la masa mitocondrial y la captación de glucosa con la expresión de receptores inhibitorios en linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) y linfocitos de ganglio. (Scharping N et al., 2016).....	47
Ilustración 12: Representación del mecanismo de transferencia mitocondrial a través de nanotubo tunelizado (Sahinbegovic H et al., 2020).	54

Ilustración 13: Representación del mecanismo de transferencia mitocondrial a través de vesículas extracelulares (Torralba D et al., 2016).	55
Ilustración 14: Representación de la transferencia mitocondrial desde célula madre mesenquimal (MSC) hacia células inmunitarias (Court A et al., 2020).	60
Ilustración 15: Representación mediante imágenes de fluorescencia de la transferencia mitocondrial desde célula madre mesenquimal hacia linfocito T (Court A et al., 2020).	61
Ilustración 16: Representación de la transferencia mitocondrial artificial hacia el linfocito T CD3⁺ (Court A et al., 2020).	61
Ilustración 17: Depósito de desechos biológicos, Departamento de bioquímica clínica e inmunología, Universidad de Concepción.	113
Ilustración 18: Documento de aprobación del comité de ética, bioética y bioseguridad de la universidad de Concepción.	114

V. TABLA DE FIGURAS

Figura 1: Marcaje mitocondrial en células de cáncer oral HSC-3 a través de citometría de flujo.	76
Figura 2: Imágenes de fluorescencia del marcaje mitocondrial en células de cáncer oral HSC-3.	77
Figura 3: Resultados del proceso de Mitocepción hacia linfocitos T CD4⁺ a través de citometría de flujo	79
Figura 4: Eficiencia de la transferencia mitocondrial por número de célula dadora de mitocondrias.....	80
Figura 5: Gráfico de la eficiencia de la transferencia mitocondrial hacia linfocitos TCD4⁺	81
Figura 6: Resultados del ensayo de proliferación a través de citometría de flujo.....	83
Figura 7: Expresión de moléculas de superficie en los linfocitos TCD4⁺ a través de citometría de flujo.....	85
Figura 8: Secreción de citoquinas en linfocitos T CD4⁺ mitoceptados a través de citometría de flujo.....	87

VI. RESUMEN

El carcinoma oral de células escamosas (OSCC) es el tipo de cáncer oral más frecuente en Chile y el mundo. El microambiente tumoral del OSCC induce una alteración del linfocito T, promoviendo un fenotipo exhausto y una reprogramación metabólica. El organelo principal del metabolismo es la mitocondria y en los últimos años se ha indicado que diversas células tienen la capacidad de transferir mitocondrias, incluyendo la cancerosa. Sin embargo, a la fecha no se ha evaluado si existe la transferencia de mitocondrias desde células cancerosas hacia los linfocitos T y si tal fenómeno explica el fenotipo exhausto del linfocito T. El objetivo de este trabajo fue analizar el fenotipo exhausto en linfocitos TCD4⁺ post transferencia artificial de mitocondrias (MitoCeption) obtenidas desde la línea celular de cáncer oral HSC-3. La metodología se basó en la estandarización de la transferencia mitocondrial artificial utilizando mitocondrias aisladas marcadas con MitoTracker desde células tumorales de cáncer oral sobre linfocitos T CD4⁺ a través de MitoCeption. Luego, se analizó la expresión de moléculas de superficie, proliferación y secreción de citoquinas mediada por transferencia mitocondrial tumoral a través de citometría de flujo. En los resultados se observó que los linfocitos TCD4⁺ que adquirieron mitocondrias presentaron un alza en la expresión de 2 proteínas inhibidoras (TIGIT y CTLA4)

y 3 asociadas con fenotipo exhausto (PD-1, PLD-1 y LAG3), en comparación con el grupo control (p: 0,0184; p: 0,0299; p: 0,0088; p: 0,0205; p: 0,0232 respectivamente). Además, los linfocitos mitoceptados exhibieron una disminución significativa en la proliferación en comparación con las células control, no mitoceptadas. Para el análisis de citoquinas, se observó una disminución significativa en el grupo mitoceptado en la secreción de IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 e IL-4, citoquinas de la vía TH1 y TH2 (p: 0,0149; p: 0,0149; 0,0150; p: 0,0353 respectivamente) en comparación con el control. Por lo tanto, se concluyó que la adquisición de mitocondrias aisladas desde células cancerosas HSC-3 por el linfocito T CD4⁺ induce efectos a nivel funcional induciendo un alza en los receptores inhibitorios y de fenotipo exhausto e inhibiendo la proliferación y la secreción de citoquinas tipo TH1 y TH2. Estas características son de un fenotipo exhausto, por ende, se concluye que la transferencia de mitocondrias desde una célula cancerosa induce un fenotipo exhausto en el linfocito TCD4⁺.

VII. ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most frequent type of oral cancer in Chile and in the world. The tumor microenvironment of OSCC induces an alteration of the T lymphocyte, promoting an exhausted phenotype and metabolic reprogramming. The main organelle of metabolism is the mitochondrion and in recent years it has been indicated that several cells have the capacity to transfer mitochondria, including cancer cells. However, to date, it has not been evaluated whether mitochondria transfer from cancer cells to T lymphocytes exists and whether such a phenomenon explains the exhausted phenotype of the T lymphocyte. The aim of this work was to analyze the exhausted phenotype in TCD4⁺ lymphocytes after artificial transfer of mitochondria (MitoCeption) obtained from the oral cancer cell line HSC-3. The methodology was based on the standardization of artificial mitochondrial transfer using isolated MitoTracker-labeled mitochondria from oral cancer tumor cells onto CD4⁺ T lymphocytes via MitoCeption. Then, surface molecule expression, proliferation and cytokine secretion mediated by tumor mitochondrial transfer were analyzed by flow cytometry. The results showed that TCD4⁺ lymphocytes that acquired mitochondria had increased expression of 2 inhibitory proteins (TIGIT and CTLA4) and 3 proteins associated with exhausted phenotype (PD-1, PLD-1 and LAG3), compared to the control group (p: 0.0184; p: 0.0299; p: 0.0088; p: 0.0205; p:

0.0232, respectively). In addition, the mitocepted lymphocytes exhibited a significant decrease in proliferation compared to the control, non-mitocepted cells. For cytokine analysis, a significant decrease was observed in the mitocepted group in the secretion of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and IL-4, TH1 and TH2 pathway cytokines (p: 0.0149; p: 0.0149; 0.0150; p: 0.0353 respectively) compared to control. Therefore, it was concluded that the acquisition of isolated mitochondria from HSC-3 cancer cells by CD4⁺ T lymphocyte induces effects at the functional level by inducing an upregulation of inhibitory and exhausted phenotype receptors and inhibiting proliferation and secretion of TH1- and TH2-type cytokines. These characteristics are of an exhausted phenotype, thus, it is concluded that mitochondria transfer from a cancer cell induces an exhausted phenotype in the TCD4⁺ lymphocyte.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer y respuesta inmune

El cáncer es un grave problema de salud y una de las principales enfermedades que provocan morbilidad y mortalidad en el mundo (Han Y *et al.*, 2020). Corresponde a un conjunto de enfermedades que implican cambios dinámicos en el genoma y es el resultado de varios eventos complejos, donde los cambios en una célula, que dirigen la transformación hacia un fenotipo maligno, incluyen mutaciones en oncogenes, genes supresores de tumores y genes de estabilidad (Romero S *et al.*, 2011). La mortalidad de los tumores malignos está determinada, en gran parte, por su actividad proliferativa descontrolada, la resistencia de las células tumorales a la muerte apoptótica y la capacidad de las células tumorales de invadir los tejidos del anfitrión y metastatizar a distancia (Abbas. 2012). Uno de ellos es el carcinoma de células escamosas (SCC) que comprende más del 90% de los cánceres de cabeza y cuello, el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) surge del revestimiento escamoso de las superficies mucosas del tracto aerodigestivo superior, incluida la cavidad oral, la faringe, la laringe y el tracto sinonasal (Stasikowska-Kanicka O *et al.*, 2018). La incidencia de HNSCC va en aumento y se prevé que aumente un 30% (es decir, 1,08 millones de casos nuevos al año) para el 2030. Histológicamente, la progresión a HNSCC invasivo sigue una serie ordenada de pasos que comienza con hiperplasia de células epiteliales, seguida de displasia (leve, moderada y grave),

carcinoma *in situ* y, finalmente, carcinoma invasivo. Sin embargo, cabe destacar que la mayoría de los pacientes diagnosticados con HNSCC no tienen antecedentes de una lesión premaligna. La carga de HNSCC varía entre países/regiones y, en general, se ha correlacionado con la exposición a carcinógenos derivados del tabaco, el consumo excesivo de alcohol o ambos (Johnson D *et al.*, 2020). Además, para estudios de investigación en este cáncer existen diversas líneas celulares de carcinoma de células escamosas orales, una de ellas es la HSC3, que corresponde a una línea celular de carcinoma de células escamosas de lengua humana.

La respuesta antitumoral es un término general que describe la capacidad del sistema inmunológico para discernir células sanas de malignas y desencadenar respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas que contrarresten el crecimiento tumoral en huéspedes no tratados o tras intervenciones inmunoterapéuticas (Ostroumov D *et al.*, 2018). Las interacciones entre el sistema inmunológico y el cáncer se rigen por una compleja red de vías biológicas y a pesar de las expectativas de que el sistema inmunológico debería rechazar automáticamente a las células cancerosas como “extrañas”, en base a sus perfiles mutacionales únicos y a menudo extensos, el equilibrio natural primordial entre el sistema inmunológico y el cáncer es la tolerancia, en donde las células cancerosas se consideran “propias”. Esta tolerancia se mantiene mediante

múltiples mecanismos, incluidos las células inmunitarias reguladoras, las citoquinas y quimioquinas inmunosupresoras y los llamados "puntos de control inmunológico" que modulan negativamente las funciones inmunitarias (Topalian S *et al.*, 2016).

En una respuesta antitumoral efectiva, el sistema inmunológico innato proporciona la respuesta inicial del cuerpo al dirigir leucocitos preprogramados especializados, como las células asesinas naturales (NK) y los macrófagos hacia las células tumorales. El sistema inmunológico adaptativo, por otro lado, tarda más en activarse y se centra en dianas antigénicas específicas en las células tumorales. La inmunidad adaptativa se basa en los linfocitos B y T, este último tanto linfocito T citotóxico (CD8⁺ o CTL), linfocitos T colaboradoras (CD4⁺ o Th) y linfocitos T reguladores (T regs). Las células T reconocen antígenos asociados con el tumor, secretan citoquinas y lisan o destruyen directamente las células tumorales de una manera dependiente de granzima y perforina. Las células B producen anticuerpos, que pueden unirse al antígeno en la superficie de las células tumorales y mediar la lisis celular a través de células NK y macrófagos en un proceso denominado "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" (ADCC) (Bell R *et al.*, 2016).

La diferenciación de T efectoras se acompaña de una reprogramación transcripcional, epigenética y metabólica, así como la adquisición de características efectoras distintivas como la capacidad de producir citoquinas y moléculas citotóxicas (McLane L *et al.*, 2015). Una vez activadas, las células T efectoras pueden regularse mediante señales reguladoras positivas o coestimuladoras, como OX40 o 4-1BB, o señales reguladoras negativas o co-inhibidoras, como los receptores inhibitorios (RI): antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) o muerte programada 1 (PD-1) (Bell R *et al.*, 2016).

Los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTL) son células inmunes de la respuesta adaptativa especializados para atacar el cáncer (Farhood B *et al.*, 2018), su función antitumoral depende en gran medida de dos factores cruciales: en primer lugar, por la diferenciación de células T CD8⁺ y, en segundo lugar, por la infiltración de células T CD8⁺ en el microambiente tumoral (Maimela N *et al.*, 2019). Los CTL cuando se encuentran con células cancerosas producen perforina para crear poros en su membrana plasmática, los que actúan como un camino para la liberación de granzimas hacia la célula cancerígena, las que una vez ingresadas escinde sus sustratos intracelulares. También los CTL también liberan diversas citoquinas como el interferón- γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α) para inducir citotoxicidad en las células cancerosas (Farhood B *et al.*, 2018) e inducen la interacción fas-fasL donde los CTL expresan una

proteína de membrana, llamada ligando de Fas (FasL), que se une al receptor mortal Fas, que se expresa en muchos tipos celulares, lo que da lugar a la activación de las caspasas y a la apoptosis de dianas que expresen Fas (Abbas. 2012).

Los linfocitos T CD4⁺ (Th) desempeñan un papel central en el sistema inmunitario y llevan a cabo múltiples funciones, incluida la activación, coordinación, modulación y regulación de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. Estas diversas funciones de las células Th son necesarias para lograr respuestas inmunitarias efectivas contra una variedad de patógenos diferentes, manteniendo la autotolerancia y evitando ataques no deseados contra los propios tejidos (Raphael I *et al.*, 2020). Las células T CD4⁺ pueden diferenciarse en diversos subtipos funcionales en respuesta a señales dependientes del contexto, lo que a su vez les permite brindar "ayuda" a las células inmunitarias efectoras en su función principal como coordinadores centrales de la respuesta inmune. Las células T CD4⁺ median principalmente la inmunidad antitumoral al ayudar en las respuestas de las células CD8⁺ y producción de anticuerpos por las células B, así como a través de la secreción de citocinas efectoras como el IFN- γ y TNF- α y, en contextos específicos, a través de la citotoxicidad directa contra las células tumorales en el fenotipo Th1. La ayuda hacia los linfocitos CTL CD8⁺ ocurre mediante mecanismos directos, a través de la secreción de IL-2, que activa

directamente los CTL CD8⁺ que expresan la subunidad α del receptor de IL-2 de alta afinidad (CD25) impulsando su función efectora, diferenciación y proliferación. Y a través de un mecanismo indirecto, al apoyar y mantener las células dendríticas (CD) por medio de la regulación al alza del ligando CD40 que se acopla a su receptor afín CD40 en las DC para inducir y mantener el perfil tipo I de las DC (expresión de CD70 y secreción de IL-12). Estas señales inducen fuertemente funciones efectoras antitumorales en los CTL CD8⁺, como la adquisición de citotoxicidad y la secreción de citoquinas citotóxicas como el IFN- γ , y también estimulan la diferenciación fenotípica efectora y de estado de memoria de células T CD8⁺ (Ilustración 1) (Tay R *et al.*,2021). La regulación de las respuestas inmunitarias por parte de las células Th se logra a través de la secreción de citocinas específicas que, junto con un factor de transcripción regulador "maestro", definen cada subconjunto respectivo de células TCD4⁺. Los linfocitos T CD4⁺ naive específicos de antígeno (Ag) se activan primero en los tejidos linfáticos mediante células presentadoras de Ag profesionales (APC) que presentan su antígeno específico en moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y proporcionan señales coestimuladoras (Raphael I *et al.*,2020).

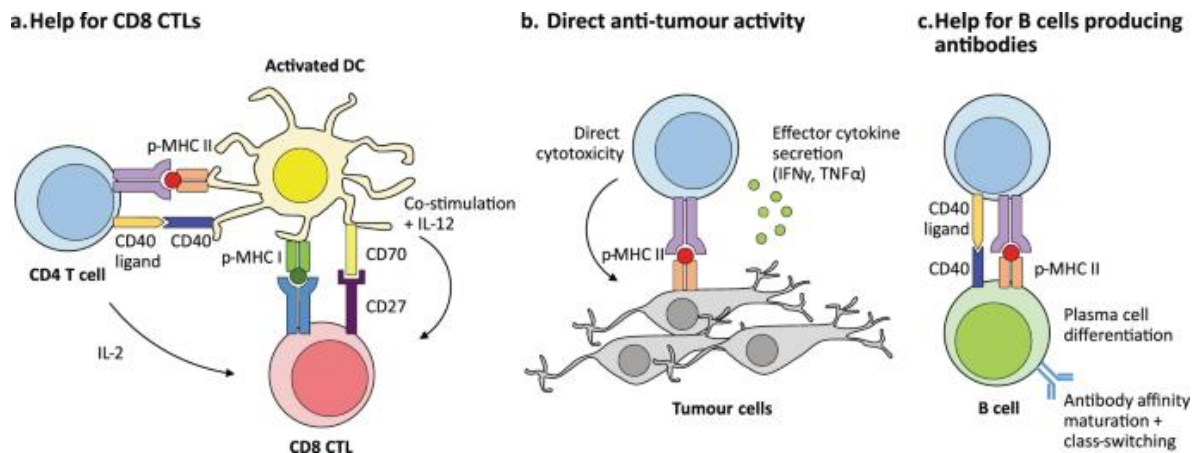


Ilustración 1: Representación de las funciones del linfocito TCD4⁺ en la inmunidad antitumoral. Figura a representa mecanismo indirecto de ayuda mediante interacción con célula dendrítica y mecanismo directo mediante la liberación de IL-2 hacia el CTL CD8⁺. Figura b representa actividad antitumoral directa mediante la liberación de citoquinas efectoras. Figura c representa la ayuda hacia células B productoras de anticuerpos, mediante la interacción CD40-CD40 ligando, entre el linfocito TCD4⁺ y célula B (Tay R et al., 2021).

Existe una población de linfocitos TCD4⁺ que corresponden a los linfocitos Tregs, una población celular que tienen un papel importante en la auto-tolerancia y la homeostasis inmunológicas durante las respuestas inmunitarias patológicas y fisiológicas. Los linfocitos Tregs expresan el factor de transcripción Foxp3 y

también algunas moléculas asociadas con la activación de las células T: CD25, CTLA-4 y LAG-3. Al igual que se han descrito algunos mecanismos de supresión utilizados que incluyen la modulación de la expresión de moléculas coestimuladoras, secreción de citoquinas inmunosupresoras, privación de IL-2, inducción del catabolismo de triptófano y citotoxicidad (Olguín J *et al.*, 2018). Los linfocitos Tregs pueden suprimir la activación, proliferación y funciones efectoras de numerosos tipos de células, incluidos los linfocitos T CD4⁺ (principalmente Th1, 2, 17 y Th foliculares), CD8⁺, CD, los linfocitos B y las NK (Kanicka O *et al.*, 2018).

1.1.1 Alteración de la respuesta inmune antitumoral

A pesar de la respuesta antitumoral de los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺, muchos tumores continúan creciendo, incluso con la presencia de células T específicas al antígeno tumoral infiltradas en el estroma tumoral (Ahmadzadeh M *et al.*, 2009). Esto puede deberse al alto consumo de glucosa y oxígeno por parte de las células tumorales que proliferan rápidamente e inhibe la actividad glucolítica de los linfocitos infiltrantes de tumores (TILs) privándolos de nutrientes y conduciéndolos a una función efectora y citotóxica amortiguada (ilustración 2), la disminución del metabolito corriente abajo fosfoenolpiruvato (PEP) que es necesario para mantener la señalización de Ca²⁺-NFAT en las células T, lo que media las respuestas antitumorales disminuidas en el TME pobre en glucosa, además, el pH bajo reprogramado en el TME conduce a la anergia de los efectores antitumorales seguida de apoptosis y se relaciona con los Tregs inmunosupresores (Xu Y *et al.*, 2021).

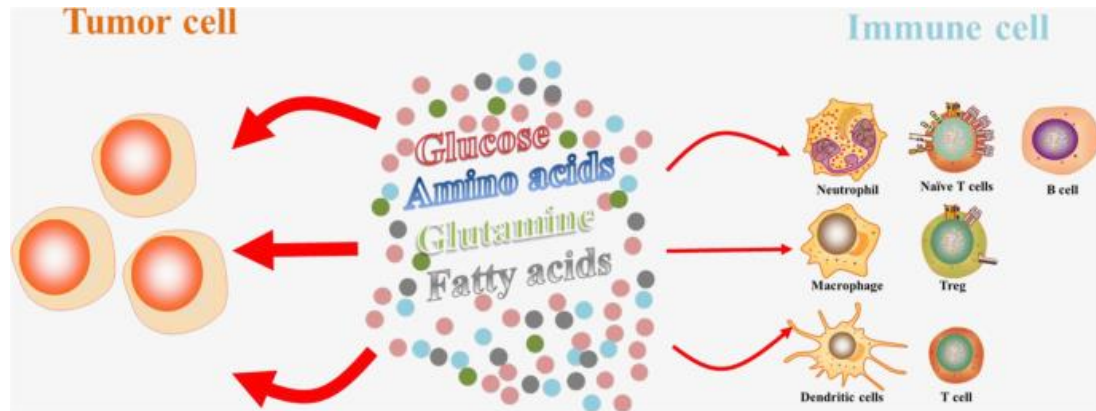


Ilustración 2: Representación del consumo de nutrientes por parte de células cancerosas en el microambiente tumoral (Xia L et al.,2021).

Con relación al HNSCC, el TME consta de una mezcla compleja y heterogénea de células tumorales y células del estroma, que incluyen células endoteliales, fibroblastos asociados al cáncer (CAF) y células inmunitarias. Las células tumorales y los CAF producen factores de crecimiento, como VEGF, que reclutan células endoteliales, estimulando la neovascularización y el suministro de oxígeno y nutrientes al tumor. A su vez, las células endoteliales secretan factores que favorecen la supervivencia y autorrenovación de las células madre cáncer (CSC). Los tumores HNSCC evaden la vigilancia inmunológica por varios mecanismos diferentes, ya sea por el alza de crecimiento inmunosupresores y citoquinas que promueven el reclutamiento o la actividad de células supresoras

derivadas de mieloides (MDSC), linfocitos Tregs y macrófagos M2 mientras inhiben los efectos antitumorales de las células T efectoras (Teff) y las células NK, de las cuales IL-6, IL-10, VEGF y TGF- β son particularmente importantes. Factores, incluyendo IL-10 y TGF β , también promueven la polarización de macrófagos al fenotipo inmunosupresor M2. Las alteraciones genéticas y epigenéticas provocan una disminución de los niveles de antígeno leucocitario humano (HLA) en las células tumorales y defectos en el procesamiento del antígeno, lo que conduce a una disminución del reconocimiento y la citólisis de las células tumorales. El componente inmunitario del TME consta de TILs, incluidas los linfocitos T, B y células NK y células de linaje mieloide (incluidos macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y MDSC). En general, los tumores HNSCC están altamente infiltrados por células inmunes, aunque la extensión y composición del infiltrado de células inmunes varía según el subsitio anatómico y el agente etiológico. La inmunidad antitumoral en el TME está mediada en gran medida por las células T eff y las células NK, mientras que la supresión inmune y el crecimiento de las células tumorales están mediados por las Tregs, MDSC y macrófagos M2. Los niveles elevados de células T eff CD8⁺ y células NK en el TME se asocian con una mejor supervivencia, por el contrario, los niveles elevados de linfocitos Tregs, MDSC, neutrófilos o macrófagos M2 se asocian con HNSCC en etapa avanzada o con mal pronóstico. Además, los tumores HNSCC, particularmente los cánceres en etapa avanzada muestran una regulación al alza de PDL1, que atenúa la actividad citolítica de las células T. De manera similar,

las MDSC y los linfocitos Tregs reclutados en TME de HNSCC expresan PDL1 y el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA4) (Johnson D *et al.*,2020). Entre los antecedentes de la alteración inducida en linfocitos T, hay un estudio que evidencia esta disfunción de los linfocitos T en HNSCC, donde se observa niveles reducidos de linfocitos TCD8⁺, así como una disminución en la expresión de complejos mayores de histocompatibilidad o inducción de la apoptosis ya que se ha demostrado que las células SCC orales contienen vesículas membranosas positivas para FasL, que desencadenan la inducción de la apoptosis de las células T, eludiendo la respuesta citotóxica. Además, la respuesta citotóxica puede amortiguarse por supresión, donde las células T CD8⁺ citotóxicas intratumorales en HNSCC muestran una mayor expresión de muerte programada-1 (PD-1), donde su ligando el PDL-1 es una proteína de superficie que bloquea la función de linfocitos T y se expresa en las células SCC y también en CAF (Curry J *et al.*,2014).

Las células tumorales pueden secretar factores solubles que promueven la inducción, expansión y reclutamiento de linfocitos Tregs en el microambiente tumoral (Kanicka O *et al.*,2018). Se encontró que los subconjuntos de células T de pacientes con OSCC diferían significativamente de los donantes sanos, donde se observó una disminución de los linfocitos T CD8⁺ y un aumento de los Tregs (CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low}). Los linfocitos T/Tregs también se redujeron en los

pacientes en comparación con los donantes sanos. La presencia de Tregs estuvo acompañada por una disminución en la secreción de IL-10 pero no de TGF- β en pacientes con OSCC en comparación con los donantes (Lim K *et al.*, 2014). En otro estudio se observó en células T CD4⁺ y CD8⁺ la expresión de PD-1 y TIM-3, así como la frecuencia de células Tregs Foxp3⁺CD4⁺ en OSCC (Dong Y *et al.*, 2021).

El agotamiento de los linfocitos T es un estado de disfunción que ocurre comúnmente durante las infecciones crónicas y el cáncer debido a la persistencia del antígeno y la inflamación. La falta de eliminación del antígeno se asocia con una pérdida progresiva de las funciones efectoras de las células T, un metabolismo alterado y un programa transcripcional único en comparación con las células T efectoras funcionales (Teff) y de memoria (Tmem) (Pauken K *et al.*, 2015). Las células T agotadas expresan altos niveles de receptores inhibitorios (RI), incluida la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1), la proteína del gen de activación de linfocitos 3 (LAG-3), inmunoglobulina de células T que contiene dominio de mucina-3 (TIM-3), antígeno de linfocitos T citotóxicos-4 (CTLA-4), atenuador de linfocitos T de banda (BTLA) y dominio de motivo inhibidor basado en inmunoglobulina de células T e inmunorreceptores de tirosina (TIGIT). Otra característica principal de las células T agotadas es la pérdida de función de forma jerárquica, funciones tales como la producción de IL-2 y la

capacidad de destruir en la etapa temprana del agotamiento, mientras que la producción del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) se pierde en la etapa intermedia, la producción de IFN- γ y granzima B (GzmB) se pierden en la etapa avanzada del estado de agotamiento (Jiang Y *et al.*, 2015), es decir, presentan una menor capacidad proliferativa, supervivencia y función efectora (Lim A *et al.*, 2020). Una de las causas como se planteo es la expresión de moléculas se superficie que inducen señales reguladoras positivas y negativas a la función efectora del linfocito T.

1.1.2 Moléculas de superficie

Las células T expresan una amplia gama de receptores coestimuladores y coinhibidores que pueden proporcionar señales positivas que impulsan la activación de las células T o señales inhibitorias que atenúan la función y/o diferenciación de las células T. Se cree que los receptores inhibitorios (RI) han evolucionado para prevenir la sobreactivación de las células inmunitarias durante una respuesta inmunitaria y/o para ayudar a terminar las respuestas inmunitarias después de la activación del efector. Sin embargo, durante la infección crónica y el cáncer donde persiste el antígeno, los RI se expresan en niveles altos y sostenidos, y tienen efectos nocivos sobre la capacidad de las células T específicas de antígeno para montar o mantener respuestas sólidas (McLane L *et al.*, 2015).

PD-1: El receptor co-inhibidor de muerte programada-1 (PD-1), también conocido como CD279, es una proteína transmembrana de 55 kDa con 288 aminoácidos de la familia B7-CD28 que se expresa en una variedad de células incluidos los macrófagos, linfocitos B, células NK, monocitos, CD y linfocitos T, especialmente aquellos que están constantemente expuestos al antígeno (Salmaninejad A *et al.*, 2020). El factor de transcripción importante que promueve la inducción de la expresión de PD-1 luego de la activación de las células T se denomina NFATc1 (Oestreich K *et al.*, 2008). Los ligandos de PD-1 (PD-L1 y PD-L2) son

glicoproteínas transmembrana tipo I, que contienen dominios IgC e IgV (Bardhan K *et al.*, 2016). PD-1 trabaja en conjunto con sus ligandos para regular negativamente las funciones de las células T, incluida la proliferación, la secreción de citoquinas y supervivencia (Tkachev V *et al.*, 2015), por ende, se considera un punto de control inmunológico que protege contra respuestas autoinmunes a través de la inducción de apoptosis en células T específicas de antígeno e inhibiendo la apoptosis en células T reguladoras (Salmaninejad A *et al.*, 2020). Sin embargo, PD-1 además de tener un efecto protector en procesos autoinmunes también tiene efectos desfavorables en el contexto del cáncer al promover la proliferación de las células malignas al interferir con la respuesta inmunitaria protectora, ya que las células tumorales expresan PD-L1 como un "mecanismo inmunitario adaptativo" para escapar de las respuestas antitumorales esto se debe a que actúa como factor pro-tumorigénico en las células cancerosas mediante la unión a sus receptores y activando las vías de señalización proliferativas y de supervivencia. La expresión de PDL-1 está presente en varios tumores sólidos incluidos melanoma, cáncer colorrectal, cánceres de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, carcinoma pancreático y carcinoma hepatocelular (Kanicka O *et al.*, 2018). La vía PD-1/PD-L1 controla la inducción y el mantenimiento de la tolerancia inmunitaria dentro del microambiente tumoral (Han Y *et al.*, 2020). La expresión de PDL-1 es inducida por inflamación en el microambiente tumoral dando como resultado el agotamiento de las células T mediado por PD-1, lo que inhibe la respuesta de las

células T citotóxicas antitumorales (Ribas A *et al.*, 2018). Tras la estimulación de TCR (receptor del linfocito T), los residuos de tirosina en los motivos ITIM e ITSM en la cola citoplásmica de PD-1 se fosforilan, reclutando SHP-1 y SHP-2, que a su vez desfosforilan las moléculas de señalización proximal cascada abajo del TCR y CD28. Por ende, cuando la vía PD-1/PD-L1 está activa en el TME, promueve la supervivencia de las células cancerosas a través de señales antiapoptóticas mediadas por PD-L1 e inhibe la activación de las vías de señalización, que son fundamentales para la supervivencia, la expansión y diferenciación de células T que reconocen antígenos tumorales. La activación desequilibrada de los eventos de señalización en las células T da como resultado la tolerancia tumoral al inhibir la generación de células T efectoras y de memoria y promover la diferenciación de las células T exhausta o agotada y Treg (Bardhan K *et al.*, 2016) (Ilustración 6).

En un estudio se observó un aumento de la expresión de PD-1 en CD8⁺ TIL característico de un estado agotado, como se ha sugerido por la disminución de la producción de citoquinas en PD-1⁺ frente a PD-1⁻ TIL de melanomas (Pardoll D, 2012) (Gros A *et al.*, 2014). En otro estudio se comparó las características fenotípicas y funcionales de linfocitos T CD8⁺ y TCD4⁺ en lesiones de melanoma metastásico con células T de sangre periférica (PBL), cuyo resultado reveló una frecuencia y un nivel significativamente más alto de expresión de PD-1 en TIL en

comparación con los de PBL (ilustración 3), asociando esta alta expresión de PD-1 con un fenotipo agotado y función efectora deteriorada, con niveles disminuidos de IFN- γ e IL-2, citoquina importante para la proliferación de linfocitos T (ilustración 4) (Ahmadzadeh M *et al.*, 2009).

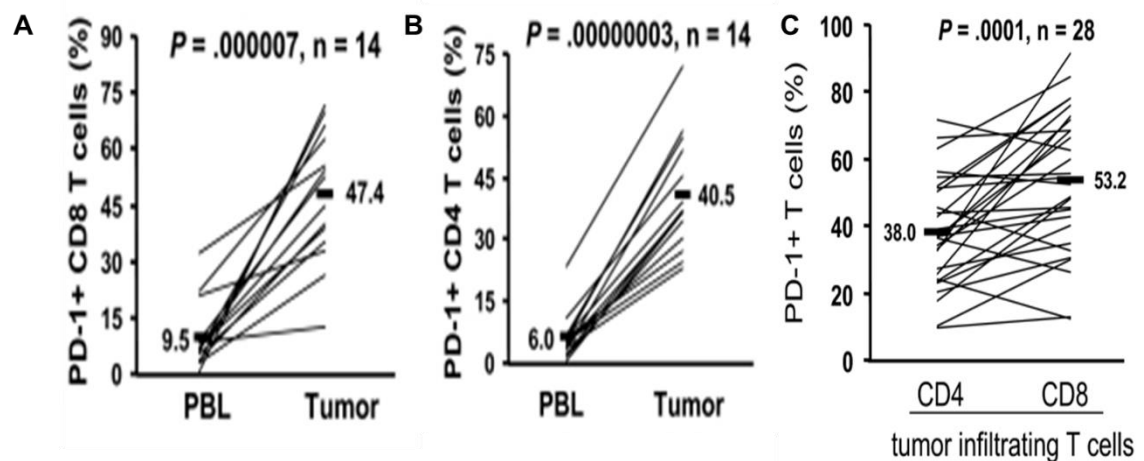


Ilustración 3: Expresión del receptor inhibitorio PD-1 y su relación con la función efectora en linfocitos T CD8⁺ y TCD4⁺ a través de citometría de flujo. En el gráfico de la figura A se observa la expresión de PD-1 en linfocitos T CD8⁺ en tumor y en sangre periférica (PBL). En el gráfico de la figura B representa la expresión de PD-1 en linfocitos T CD4⁺ en tumor y en sangre periférica (PBL) y en el gráfico de la figura C representa la expresión de PD1 tanto en linfocito TCD4⁺ y TCD8⁺ (Ahmadzadeh M *et al.*, 2009).

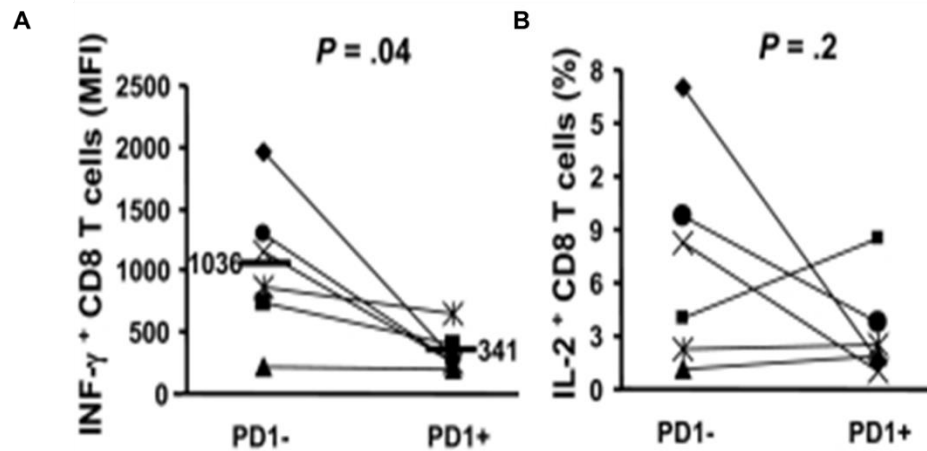


Ilustración 4: Representación de la secreción de citoquinas de linfocitos T CD8⁺PD-1⁺ y TCD8⁺PD-1⁻. En el gráfico de la figura A y B representan la secreción de IFN- γ e IL-2 en linfocitos T CD8⁺PD-1⁺ y TCD8⁺PD-1⁻ respectivamente (Ahmadzadeh M et al., 2009).

Así como en otro estudio se evaluó la producción de citoquinas y moléculas citotóxicas efectoras como granzima, perforina y marcadores de desgranulación citotóxica de superficie (CD107a) de linfocitos T CD8⁺ con PD-1⁻ y PD-1⁺ (expresión intermedia (^{int}) y alta (^{hi}) en carcinoma hepatocelular. Los resultados obtenidos indicaron una disminución de producción de citoquinas proinflamatorias y un aumento de antiinflamatorias en PD-1^{hi} y expresión disminuida de las moléculas efectoras y CD107a considerablemente menor que las células TCD8⁺PD-1^{int} tras estimulaciones anti-CD3/CD28 (Ilustración 5) (Ma J et al., 2019).

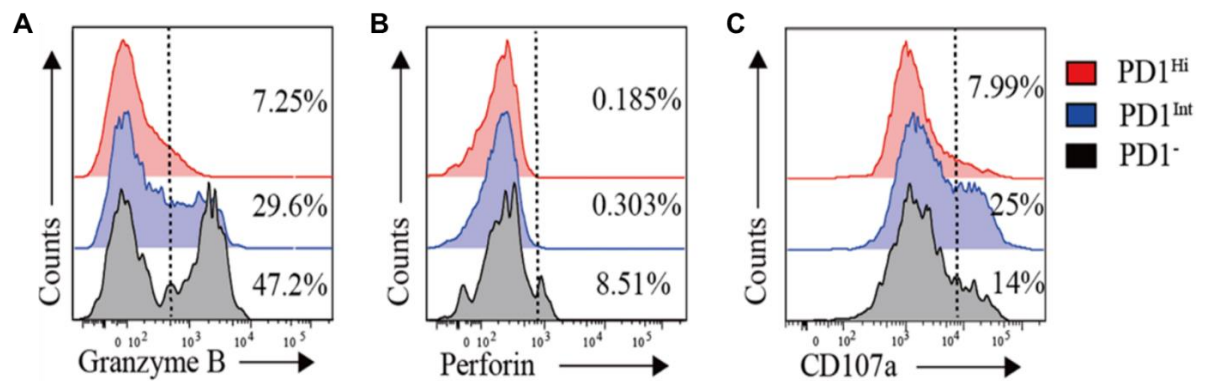


Ilustración 5: Histogramas de la expresión de moléculas citotóxicas y CD107-a en linfocitos T CD8⁺ con expresión de PD-1. En los gráficos A, B y C representan la secreción de granzima B, perforina y CD107-a respectivamente entre linfocitos TCD8⁺PD-1⁻, TCD8⁺PD-1^{Hi} y TCD8⁺PD-1^{Int} en carcinoma hepatocelular obtenidos a partir de citometría de flujo (Ma J et al., 2019).

Además, se observó un aumento de la expresión de PD-1 en linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺ infiltrantes de tumores en cáncer de pulmón a diferencia de tejidos sanos (Lipp J et al., 2022). En un estudio se observó que en OSCC, la expresión de PD-1 se asoció positivamente con el estadio clínico y la expresión de PD-1 fue mayor entre los pacientes con metástasis en los ganglios linfáticos, similar al resultado de la expresión de PDL-1 donde la expresión de PD-L1 y CD86 se asoció positivamente con el estadio clínico y el grado de diferenciación tumoral, indicando que la expresión de PD-L1 y CD86 fue mayor entre los pacientes con metástasis en los ganglios linfáticos (Dong Y et al., 2021), lo que se asoció con un estudio realizado años anteriores donde se observó un incremento en la

expresión de PDL-1 en muestras de pacientes con OSCC de peor pronóstico en comparación con OSCC de mejor pronóstico y control (Kanicka O *et al.*,2018). En un estudio se demostró que los TILs CD3⁺ y CD4⁺ estuvieron presentes en el 100% de las muestras de pacientes con HNSCC y que cuyos tumores que estaban infiltrados por un alto número de células T CD4⁺ exhibieron una supervivencia general (SG) y supervivencia libre de enfermedad (DFS) significativamente mejores en comparación con los pacientes que exhibieron una infiltración tumoral deficiente. Además, se observó expresión de PDL-1, medido como expresión de proteína y ARNm en las muestras de pacientes y se asoció dicha expresión con un SG y DFS desfavorables (Fu Z *et al.*,2022).

TIGIT es un receptor de la superfamilia Ig (inmunoglobulinas) que se expresa en las células T efectoras como, así como células Treg y NK y se une a dos ligandos, CD155 y CD112, que se encuentra en varios tipos de células, incluidas las células tumorales, lo que da como resultado la inhibición de la respuesta inmunitaria antitumoral producto de motivos ITIM en su cola citoplasmática. Juega un papel fundamental en la limitación de la inmunidad adaptativa e innata, participando en una red reguladora compleja que involucra múltiples RI, existiendo una cierta similitud con la vía CD28/CTLA-4/CD80/CD86, por la cual los receptores inhibidores y coestimuladores compiten por unirse a los mismos ligandos (Chauvin J *et al.*,2020). TIGIT ejerce su efecto inmunosupresor al suprimir la activación de las células T CD8⁺, proliferación, producción de citoquinas y

metabolismo, mejorar la actividad supresora de Tregs y mediar en las células NK agotamiento (Tang S *et al.*, 2020), además de impedir directamente la función de las células T al interrumpir su activación al unirse al CD155 en las CD o uniéndose directamente a CD226 (receptor coestimulador expresado en células inmunitarias) (Chauvin J *et al.*, 2020). TIGIT está regulado positivamente en las células T en una amplia gama de tumores y se correlaciona con un mal pronóstico. Adicionalmente, la coexpresión de TIGIT y PD-1 en las células T se asocia con fenotipo disfuncional y menor expresión de citoquinas (Tang S *et al.*, 2020). La interacción TIGIT-CD155 induce simultáneamente la producción de IL-10 y reduce la producción de IL-12 por parte de las CD, lo que promueve aún más el desarrollo de T agotada (McLane L *et al.*, 2015) (Ilustración 6).

CTLA4: En las células T en reposo, CTLA-4 es una proteína intracelular; sin embargo, después de la participación del receptor de células T y una señal coestimuladora a través de CD28, CTLA-4 se transloca a la superficie celular donde supera a CD28 para unirse a moléculas coestimuladoras críticas (CD80, CD86) y media la señalización inhibidora en la célula T, lo que resulta en detención tanto de la proliferación como de la activación (Ribas A *et al.*, 2018). CTLA-4 ejerce actividad inmunosupresora a través de múltiples mecanismos: transmisión de señalización inversa, lo que induce la producción de indoleamina-2, 3-dioxigenasa (IDO) para inhibir T proliferación celular; supresión mediada por CTLA-4 de la formación de ZAP 70 (proteína asociada a zeta de 70 kDa) o

regulación ascendente de Cbl (proteína de linfoma b de linaje B de Casitas), las cuales inhiben la activación de células T; e inhibición mediada por CTLA-4 de la señalización de NF- κ B, PI3K/Akt, CDK4/CDK6 y ciclina D3 (Tang S *et al.*, 2020) (Ilustración 6).

LAG3: Lag-3 es un RI no ITIM que puede funcionar a través de un motivo KIEELE en su cola intracelular para regular negativamente la progresión del ciclo y otras funciones celulares. Lag-3 es altamente expresado por las células Tex durante infecciones crónicas y por TIL en muchos tipos de cáncer (McLane L *et al.*, 2015) (Ilustración 6).

TIM3: inmunoglobulina de células T que contiene dominio de mucina-3 (TIM-3) está regulado por el factor de transcripción T-bet y se expresa en varios subconjuntos de células T, incluidos Th1, CD8⁺, Tregs, pero también en CD, macrófagos y monocitos. Aunque se cree que TIM-3 exhibe funciones supresoras, no contiene un motivo ITIM en su dominio intracelular como PD-1 o TIGIT. Se une a la molécula soluble lectina tipo S galectina-9 (Gal-9), que está regulada positivamente por IFN- γ , lo que lleva al reclutamiento corriente abajo de la familia Src de tirosina quinasa Fyn y el adaptador p85 fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). Como resultado, la inmunidad mediada por Th1 se ve afectada por la reducción de la producción de IFN- γ , el aumento de la apoptosis en Th1 y

las células T CD8⁺ citotóxicas *in vitro*. Otros ligandos para TIM3 son la molécula de adhesión celular del antígeno carcinoembrionario 1 (CEACAM1), HMGB1 y fosfatidilserina (Catakovic K *et al.*, 2017) (Ilustración 6).

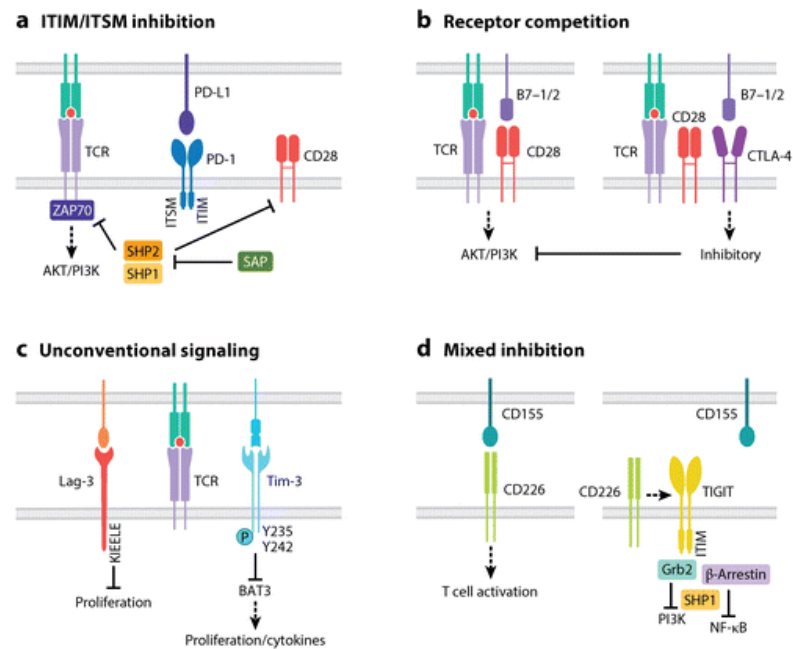


Ilustración 6: Representación de las vías de señalización inhibitorias inducidas por receptores inhibitorios PD-1, CTLA-4, LAG3, TIM3 y TIGIT, y su efecto en el linfocito T (McLane L *et al.*, 2015).

Otra vía asociada a la alteración de los linfocitos son los estados metabólicos, que están estrechamente vinculados y son reguladores críticos de las funciones efectoras de las células T, de modo que, los cambios en la disponibilidad de

nutrientes pueden afectar la actividad de las células T. Por lo tanto, los efectos de las células cancerosas y el metabolismo de las células cancerosas en la TME pueden modular directamente las rutas y actividades metabólicas esenciales de las células T (Sugiura A *et al.*, 2018).

1.2 Metabolismo y respuesta inmune celular:

Recientemente la dependencia de las células T en la detección de nutrientes y el flujo a través de varias vías metabólicas han demostrado que el metabolismo representa un mecanismo clave mediante el cual se puede regular el sistema inmunitario. El destino y la función de las células T están intrínsecamente ligados a su metabolismo ya que requiere la maquinaria para generar intermediarios bioenergéticos para apoyar la proliferación y la función efectora (Scharping N *et al.*, 2016).

En la respuesta inmune adaptativa, los linfocitos T utilizan diferentes vías metabólicas para su diferenciación y estado de memoria (Rangel G, *et al.*, 2021). Las células T maduras naïve (T_n) se mantienen en bajas tasas de glucólisis y oxidan predominantemente el piruvato derivado de glucosa a través de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) o activan la oxidación de ácidos grasos (FAO) para producir ATP (Pierce E *et al.*, 2015). La activación de las células T_n con antígeno y la coestimulación adecuada genera células efectoras T (T_{eff}) con un programa metabólico que se asemeja al de las células cancerosas altamente proliferativas, en el cual, para satisfacer las demandas bioenergéticas y biosintéticas de la proliferación clonal y la función efectora, las células se someten a una reprogramación metabólica cambiando drásticamente de OXPHOS y FAO a la glucólisis y glutaminólisis que caracterizan a las células T_{eff}, en este proceso

al encontrar un antígeno afín, las células Teff absorben rápidamente glucosa y glutamina para alimentar sus necesidades bioenergéticas, generando lactato como subproducto y aunque se generan menos moléculas de ATP por molécula de glucosa, la glucólisis aeróbica permite que las células T construyan los sustratos necesarios para el crecimiento y la proliferación y es esencial para la diferenciación a efectores (Lim A *et al.*, 2020). De hecho, la coestimulación mediada por CD28 coordina la expresión y el tráfico hacia la superficie celular de numerosos transportadores de nutrientes, incluidos GLUT-1, transportadores de glutamina, aminoácidos y transportadores de lactato monocarboxilato para facilitar la eliminación del lactato producido en la glucólisis aeróbica. A diferencia de las células Teff, el programa metabólico dominante en las células Treg es la oxidación mitocondrial de piruvato y FAO ya que presenta una tasa de glucólisis mucho menor que en las células Teff. La reprogramación metabólica que se produce en la generación de Tmem (memoria) a partir de células Teff se asemeja en cierto modo al proceso inverso de activación a medida que pasan de un programa proliferativo altamente anabólico a un programa catabólico adecuado para la supervivencia celular a largo plazo, en la cual OXPHOS y FAO son las vías principales por las que se genera energía (Sugiura A *et al.*, 2018). Por ende, como se ha mencionado el metabolismo de las células T es muy dinámico, donde las células Tn, Treg y las células T estimuladas crónicamente dependen de OXPHOS como método de metabolismo principal, mientras que las células efectoras CD8 y CD4 Th1 dependen principalmente de la glucólisis (Ilustración

7). Este cambio metabólico puede ser controlado por ROS (Angajala A *et al.*, 2018).

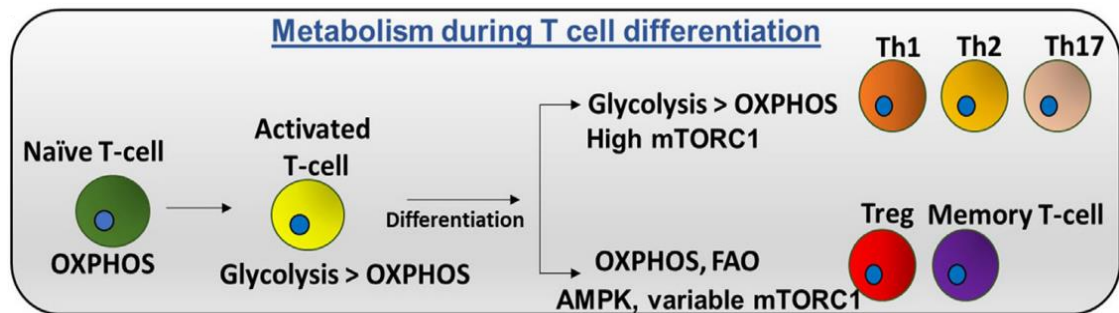


Ilustración 7: Representación del metabolismo del linfocito T durante su diferenciación, indicando el metabolismo principal para cada tipo de linfocito T (Angajala A *et al.*, 2018).

1.2.1 Metabolismo alterado en el microambiente tumoral

Ya que el metabolismo se relaciona con la función y estado de diferenciación del linfocito T, las mitocondrias, el organelo principal del metabolismo, desempeñan un papel crucial en el mantenimiento y establecimiento de las respuestas inmunitarias. Además, se ha informado que las mitocondrias experimentan cambios rápidos durante la activación de las células T, incluido el aumento de la masa, el número y el ADN mitocondrial. Esto sugiere además que el metabolismo mitocondrial puede ser crucial para la activación y proliferación de células T (Angajala A *et al.*, 2018). La dinámica mitocondrial, incluido el tráfico de mitocondrias y remodelación de la arquitectura mitocondrial, masa y actividad, son impulsores importantes para mantener la aptitud metabólica en respuesta a las perturbaciones metabólicas. Durante la privación de nutrientes, como por ejemplo en el microambiente tumoral, aumenta la fusión mitocondrial y la biogénesis permitiendo que las células respalden las demandas metabólicas. Sin embargo, durante este proceso se acumulan mitocondrias que deben ser eliminadas por mitofagia. La incapacidad operar la mitofagia da como resultado un aumento de la masa mitocondrial asociado con un potencial de membrana mitocondrial reducido, un fenotipo mitocondrial que se observa en células envejecidas. La acumulación de mitocondrias dañadas reprograma aún más el epigenoma y transcriptoma a través de señales retrógradas alteradas que son controladas por los metabolitos generados a partir de las mitocondrias, y prevenir biogénesis mitocondrial. Recientemente, la dinámica mitocondrial ha sido

sugerida para modular la generación de memoria CD8⁺. Donde en las células T con la disminución de la biogénesis mitocondrial y la producción robusta de especies reactivas de oxígeno (ROS) mitocondriales podrían promover la disfunción de las células T en infecciones virales crónicas y tumores (Yu Y *et al.*,2020). Además de apoyar la biogénesis mitocondrial, las mitocondrias son fuentes importantes de especies reactivas de oxígeno (ROS). Se ha indicado que los ROS mitocondriales (mROS), particularmente las ROS del complejo III, pueden funcionar como intermediarios de señalización (Sena L *et al.*,2014). Las especies de oxígeno reactivo metabólico (ROS) producidas durante el proceso OXPHOS también estabilizan el factor nuclear de células T activadas (NFAT) (Wang Y *et al.*,2018).

En un estudio se compararon aspectos de la calidad mitocondrial entre células T de bazo, ganglio linfáticos de drenaje (dLN) y tumores de ratones injertados con melanoma (TILs), observándose que la masa mitocondrial y el potencial de membrana, medidos a través de una tinción de mitotracker green (MG) y Deep red (MDR), fue mayor en TILs CD8⁺, sin embargo la proporción de MDR/MG, una indicación de actividad mitocondrial por masa mitocondrial, se redujo en TIL, lo que sugiere que los TILs no podrían utilizar completamente la actividad mitocondrial. El aumento de masa mitocondrial se confirmó a través microscopia electrónica y también se observó que los TILs contenían menos números de

copias de ADN mitocondrial (ADNmt), lo que sugiere que la calidad mitocondrial en los TILs podría verse comprometida. Adicional las mitocondrias en los TILs exhibieron fenotipos dañados, incluyendo estructuras de membrana rotas, estructura de crestas y disminución del número de crestas y longitud de ellas por mitocondria lo que confirma que los TIL contienen mitocondrias de mala calidad (Ilustración 8). También se observó que la alteración en membranas puede ser inducida por el estrés mitocondrial, el que era aumentado en TILs ya que se observó un aumento en las especies reactivas de oxígeno (ROS) mitocondrial (Ilustración 9) mientras que los ROS intracelulares permanecieron similares entre las células T de los bazos y tumores. Colectivamente, estos datos revelan que las células T CD8⁺ son propensas a acumular mitocondrias con potenciales de membrana mitocondrial comprometidos en el TME. También en el mismo estudio se observó que los TILs CD8⁺ poseían una mitofagia y autofagia reducida. También se observó que los TILs con MDR/MG bajas, exhibían un aumento de la expresión de PD-1 y disminución de la expresión de T-bet en conjunto con una menor secreción de IFN- γ y TNF- α (Yu Y *et al.*, 2020).

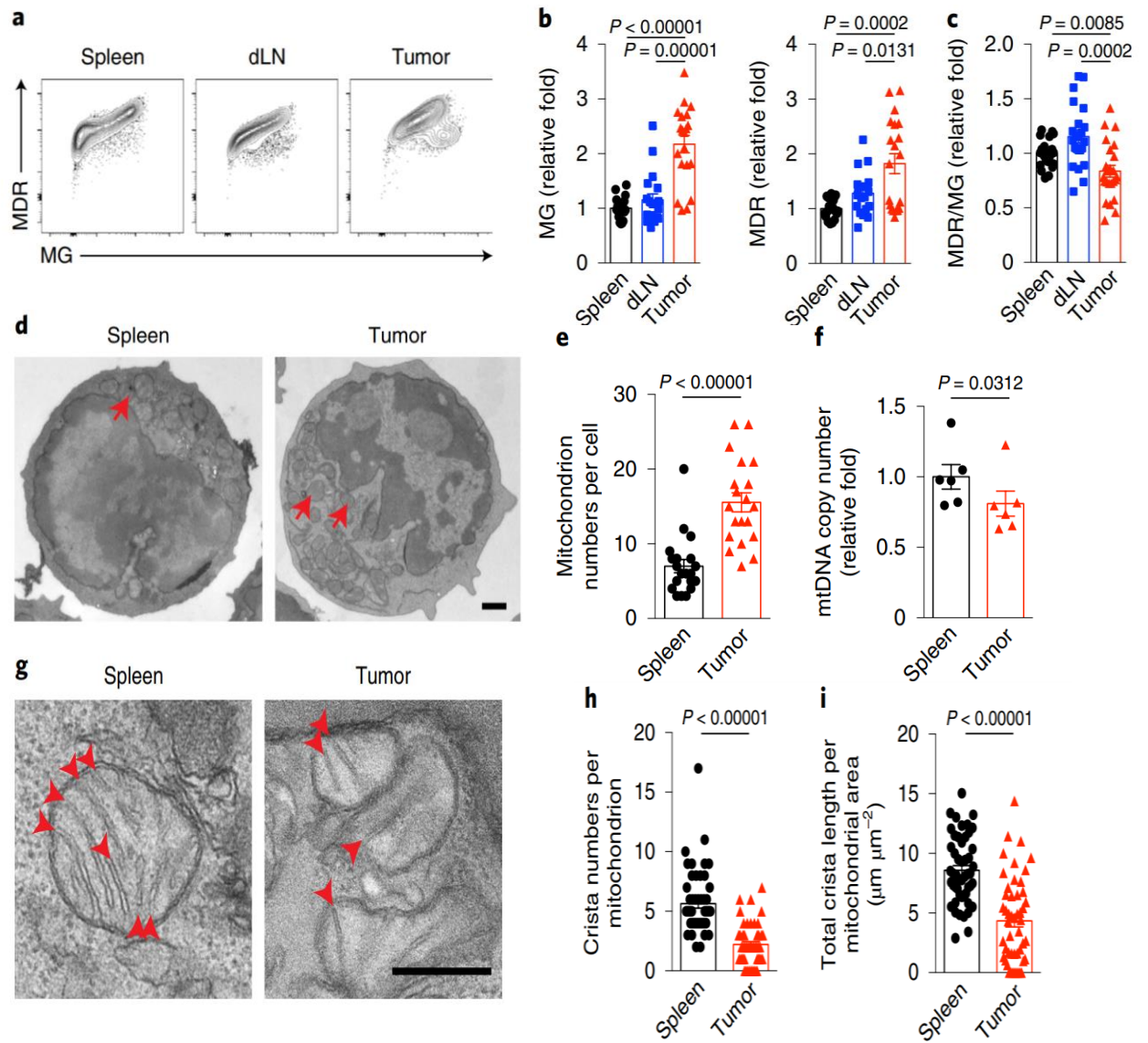


Ilustración 8: Representación de la alteración mitocondrial en linfocitos T infiltrantes de tumores (TILs) en comparación con linfocitos de bazo y ganglios linfáticos. (A) representación del marcaje con MitoTracker Deep Red (MDR) y MitoTracker Green (MG) en linfocitos del bazo, de ganglios linfáticos y tumor. (B) Gráfico de barras de las medidas individuales de MDR y MG. (C) Gráfico de barras de la relación MDR/MG, indicador de

actividad mitocondrial. (D) Visualización del n° de mitocondria por microscopia electrónica de transmisión. (E) Medición del número de mitocondrias en linfocitos T de bazo y tumor. (F) Cuantificación del ADN mitocondrial (mtADN) en linfocitos T de bazo y tumor. (G) Visualización de la morfología mitocondrial en linfocitos T de bazo y tumor por microscopia electrónica de transmisión. (H e I) Representación del número de crestas y largo en linfocitos T de bazo y tumor (Yu Y et al.,2020).

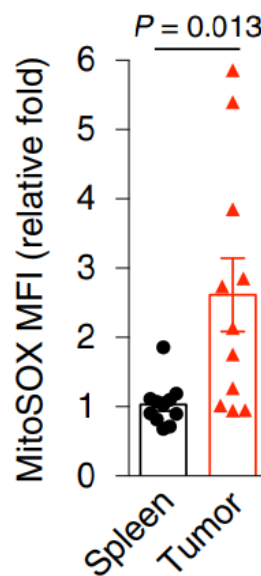


Ilustración 9: Representación de la producción de especies reactivas de oxígeno en linfocitos T de bazo e infiltrantes de tumor (Yu Y et al.,2020).

En un estudio se analizó la capacidad metabólica de los TILs al medir la función mitocondrial, la masa y la captación de glucosa mediante citometría de flujo y comparándolas con las de ganglios linfáticos, tanto los que drenan al tumor (dLN) y los que no (ndLN) (Ilustración 10). A diferencia del anterior se observó una reducción de la masa mitocondrial, así como de la capacidad de absorber glucosa en los TILs CD8⁺ de diferentes modelos de tumores incluido el melanoma, adenocarcinoma, carcinoma de pulmón de Lewis y HNSCC. La pérdida de masa fue confirmada a través de microscopia electrónica de transmisión donde también se observó una morfología mitocondrial anormal lo que concuerda con el estudio anterior. Además, se realizó un análisis del metabolismo a través de un analizador de flujo extracelular Seahorse, donde se observó que los TILs CD8⁺ exhibían un defecto en el consumo de oxígeno (OCR) y un aumento de la tasa de acidificación extracelular (ECAR), indicando una mayor dependencia al metabolismo glucídico, lo que les impide llevar a cabo funciones celulares críticas en el microambiente tumoral pobre en glucosa. También se analizó la producción de ROS y el potencial de membrana mitocondrial, observándose que las células T que respondían al antígeno en el microambiente tumoral mostraron una despolarización mitocondrial, así como una pérdida de producción de ROS en cáncer de melanoma. Este estudio también asoció la mitocondria con el fenotipo de agotamiento ya que se observó una correlación positiva con la expresión de moléculas co-inhibitorias como PD-1, LAG3 y TIM-1 en melanoma con la disminución de la masa mitocondrial (Ilustración 11) (Scharping N *et al.*, 2016).

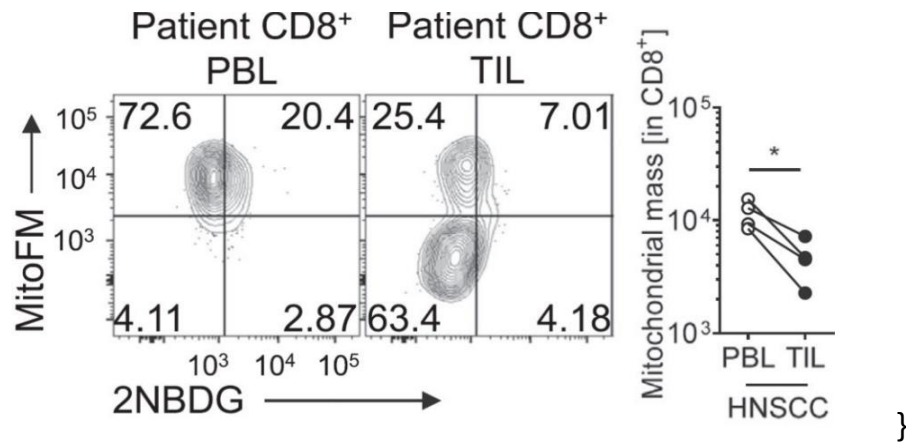


Ilustración 10: Representación de la masa mitocondrial y captación de glucosa en células TCD8⁺ de sangre periférica y de HNSCC (Scharping N et al.,2016).

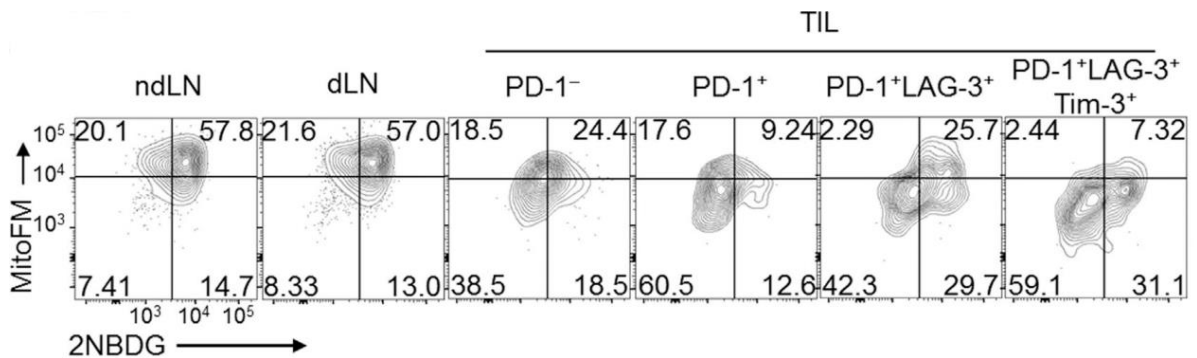


Ilustración 11: Representación de la relación entre la masa mitocondrial y la captación de glucosa con la expresión de receptores inhibitorios en linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) y linfocitos de ganglio. (Scharping N et al.,2016).

Estudios previos han demostrado que las células T CD8⁺ son metabólicamente flexibles y se someten a una reprogramación metabólica a lo largo de cada etapa de la activación de las células T, lo que incluye alterar la dependencia de las mitocondrias para la producción de energía. En un estudio se observó una correlación positiva entre la señal de TMRM (indicador de potencial de membrana mitocondrial) con la granzima B y la expresión de IFN- γ , moléculas efectoras en la respuesta antitumoral del linfocito TCD8⁺, lo que indica que el aumento en el potencial de la membrana mitocondrial puede ser importante para apoyar las funciones efectoras de las células T CD8⁺ (Amitrano A *et al.*, 2021).

1.3 Transferencia mitocondrial:

Basado en lo descrito anteriormente de la relación del metabolismo con la función efectora del linfocito T, las mitocondrias al ser el organelo principal del metabolismo, cumplen un rol importante en este proceso. Las mitocondrias son organelos dinámicos unidos de doble membrana que están presentes en la mayoría de las células eucariotas y actúan en una variedad de funciones para mantener la homeostasis celular (whitehall J *et al.*, 2019). Son conocidas como las "centrales eléctricas" de las células porque generan trifosfato de adenosina (ATP) a través de la fosforilación oxidativa (OXPHOS), albergan vías de metabolismo de lípidos esenciales (Pang Y *et al.*, 2021) y tienen funciones clave en la señalización celular, la proliferación, el metabolismo y la muerte (Qin Y *et al.*, 2021). Algunos ejemplos de las funciones celulares importantes de las mitocondrias incluyen la fosforilación oxidativa junto con el transporte de electrones, la regulación de ROS, la localización de proteínas proapoptóticas y la polarización de la membrana interna para la ATP sintasa. Las mitocondrias mantienen cada una de estas funciones a través de un equilibrio de biogénesis, degradación y eventos de fisión y fusión altamente dinámicos que dependen del entorno y las necesidades de la célula (Beckermann K *et al.*, 2017). Estos ciclos constantes de fisión y fusión promueven el entremezclado y la homogeneización de proteínas mitocondriales, lípidos y ADN entre diferentes mitocondrias dentro de la misma célula. Además, la dinámica mitocondrial permite la eliminación

selectiva de las mitocondrias a través de la mitofagia y la biogénesis mitocondrial repone la reserva mitocondrial, manteniendo así un repertorio mitocondrial saludable dentro de la célula (Shanmughapriya S *et al.*,2020). Los linfocitos T deben regular estrechamente el número y la función mitocondrial para permitir la transición metabólica de los linfocitos T vírgenes oxidativos a estados efectores de linfocitos T glucolíticos (Beckermann K *et al.*,2017). La maquinaria mitocondrial, como las vías metabólicas, el metabolismo de los aminoácidos, los sistemas antioxidantes, la dinámica mitocondrial, el ADN mitocondrial (mtDNA), la mitofagia y las ROS mitocondriales (mtROS) son cruciales para las funciones inmunitarias (Angajala A *et al.*, 2018). La fisión mitocondrial genera discreta y fragmentadas mitocondrias que pueden aumentar la producción de ROS, facilitar la mitofagia, acelerar la proliferación celular y mediar la apoptosis. La proteína relacionada con la dinamina 1 (Drp1) es una proteína citosólica que se transloca a la membrana mitocondrial externa (OMM) tras la fosforilación a mitocondrias de escisión. La fusión de mitocondrias en redes lineales o tubulares limita las mutaciones nocivas en el mtDNA, induce supercomplejos de la ETC (cadena de transporte de electrones) que maximiza la actividad de OXPHOS y mejora las interacciones para el flujo de Ca^{2+} . Además, las mitocondrias se alargan como mecanismo de supervivencia en respuesta a hambre de nutrientes y estrés, vinculando la fusión con la longevidad celular. La fusión OMM está mediada por mitofusina 1 y 2 (Mfn1, Mfn2), mientras que la fusión de la membrana interna está controlada por óptica atrofia 1 (Opa1) (Buck M *et al.*,2016).

Además de estas dinámicas mitocondriales intracelulares, recientemente se demostró la transferencia horizontal de mitocondrias entre células de mamíferos, lo que desafía los conceptos actuales de segregación y herencia de mitocondrias y ADN. Esta transferencia de mitocondrias promueve la incorporación de las mitocondrias transferidas a la red endógena de las células receptoras (Shanmughapriya S *et al.*, 2020), que puede conducir a cambios significativos en el estado bioenergético del huésped y/o alteraciones relacionadas con la diferenciación celular, procesos inflamatorios, supervivencia celular o incluso farmacorresistencia (Zampieri L *et al.*, 2021). Además, también implica la transferencia horizontal de genes mitocondriales con implicancia en la fisiopatología de la función mitocondrial de la célula receptora (Shanmughapriya S *et al.*, 2020).

Las células vecinas pueden compartir mitocondrias a través de varios mecanismos, que incluyen (i) la formación de vehículos extracelulares (VE), (ii) nanotubos tunelizados (TNT) formados en los sitios de contacto físico, (iii) eyección mitocondrial, o (iv) fusión citoplásmica. Múltiples estudios han demostrado que los TNT, puentes citoplásmicos ultrafinos entre células, son el principal sistema de administración de mitocondrias en tejidos sanos y tumorales (Sahinbegovic H *et al.*, 2020). Los nanotubos tunelizadores facilitan el intercambio selectivo de orgánulos o vesículas de membrana y pequeñas

moléculas solubles citoplasmáticas y de membrana. Son estructuras nanotubulares producidas por el crecimiento de protuberancias de la membrana celular similares a los filopodios que se conectan con la célula objetivo formando así un puente que contienen un esqueleto compuesto principalmente de actina F y proteínas de transporte que facilitan el transporte activo de carga y mitocondrias a lo largo de estas estructuras (ilustración 12) (Shanmughapriya S *et al.*, 2020). La transferencia de mitocondrias a través de TNT suele ser unidireccional, desde la célula que inició la formación de TNT a la célula, sin embargo, también se ha informado de transferencia bidireccional. De manera similar, el medio hiperglucémico o acidificado, así como las citoquinas que estimulan la transición epitelial a mesenquimal, aumentan la transferencia mitocondrial a través de la formación de nanotubos tunelizados (Torralba D *et al.*, 2016).

Otro mecanismo corresponde al transporte mitocondrial a través de vesículas extracelulares (EV), que son vehículos de comunicación intercelular que participan en una serie de procesos fisiológicos y patológicos (Torralba D *et al.*, 2016), estas vesículas son poblaciones heterogéneas de vesículas de membrana que son liberadas en los espacios extracelulares por la mayoría de las células, incluidas las células tumorales (Fujita Y *et al.*, 2016), se pueden dividir en microvesículas, exosomas y cuerpos apoptóticos, según su origen, tamaño y composición molecular (ilustración 13) (Torralba D *et al.*, 2016). También se

clasifican en 3 subclases: vesículas extracelulares pequeñas (S-EV), vesículas extracelulares grandes (L-EV) y un grupo intermedio conocido como vesículas extracelulares pequeños a grandes. Los S-EV típicos son exosomas de 50 a 150 nm, caracterizados por tetraspaninas CD9, CD63 y CD81, que contienen carga mitocondrial y otros componentes celulares. Los L-EV incluyen microvesículas de 100 a 1000 nm, con un alto contenido de anexina A1, y encapsulan mitocondrias y otros componentes. Los EV autofágicos pertenecen a la subclase de EV pequeños a más grandes y tienen las características de expresar la cadena ligera 3 de la proteína 1 asociada a los microtúbulos (LC3) (Takenaga K *et al.*, 2021). Numerosos informes ahora identifican a los EV como mediadores importantes de las vías de señalización extracelular a través de la transferencia directa de su carga por membrana. La biogénesis del desprendimiento de microvesículas se estimula mediante la activación de la membrana plasmática, como la entrada de calcio intracelular (Fujita Y *et al.*, 2016).

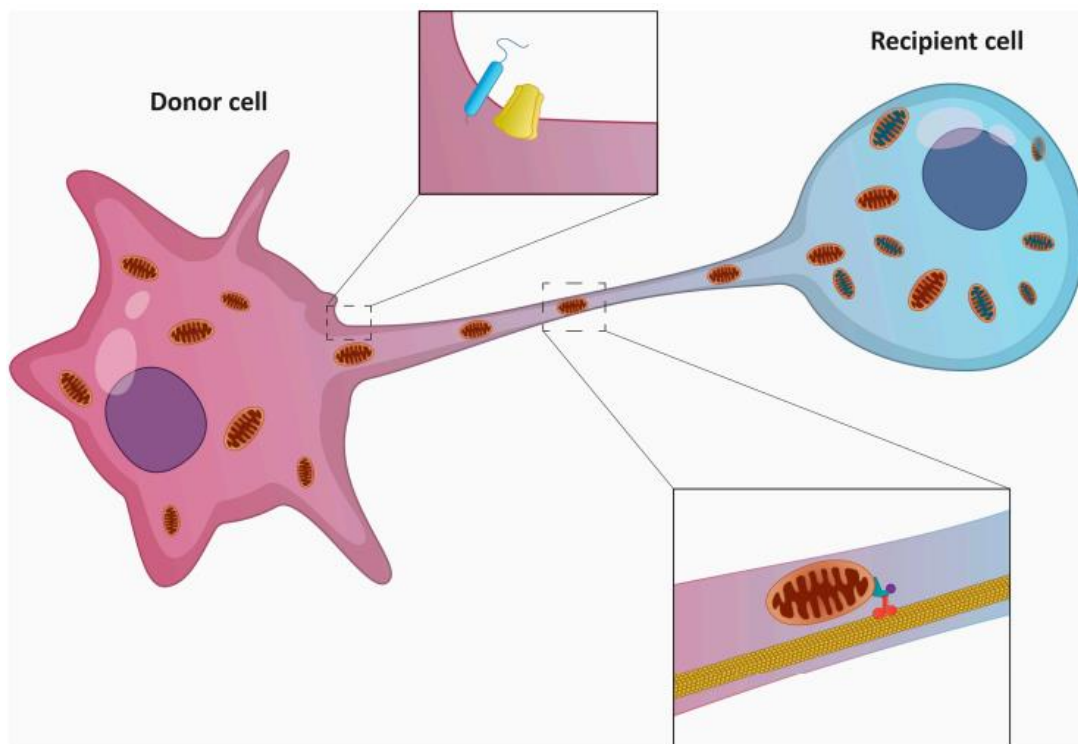


Ilustración 12: Representación del mecanismo de transferencia mitocondrial a través de nanotubo tunelizado (Sahinbegovic H et al., 2020).

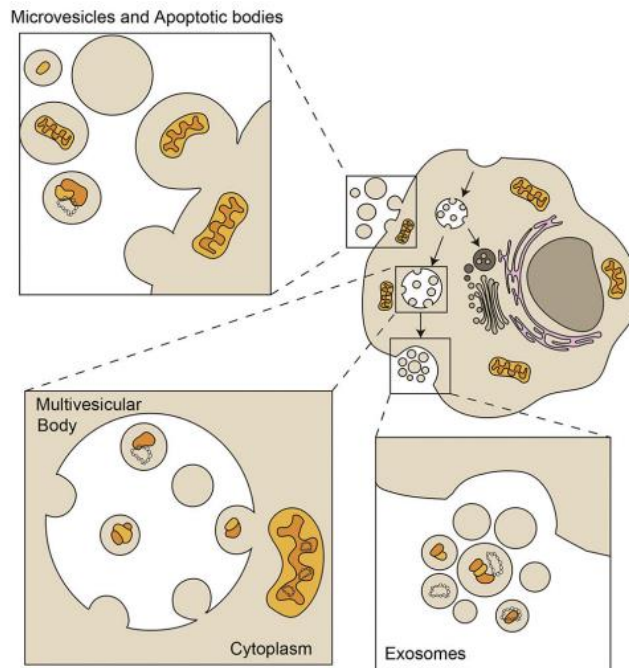


Ilustración 13: Representación del mecanismo de transferencia mitocondrial a través de vesículas extracelulares (Torralba D et al., 2016).

Las transferencias mitocondriales ocurren tanto en condiciones fisiológicas, por ejemplo, en la homeostasis tisular y el mantenimiento de la troncalidad como en condiciones patológicas como la hipoxia, la inflamación y el cáncer. Las cargas transferidas pueden contener mitocondrias sanas o dañadas. Las mitocondrias sanas se transfieren de las células donantes para proteger a las células receptoras del estrés oxidativo y la apoptosis y para mejorar su respiración mitocondrial; a diferencia de las células estresadas, que pueden transferir las

mitocondrias dañadas a las células receptoras para aliviar su carga de mitocondrias dañadas. Por ejemplo, en un accidente cerebrovascular, los astrocitos liberan mitocondrias saludables que ingresan a las neuronas para promover la viabilidad y producción de ATP (Hayakawa K *et al.*,2016) , también se ha indicado que los cardiomiocitos (CM), células de músculo liso altamente especializadas con una vida útil extremadamente larga y una baja tasa de renovación, que dependen de una gran reserva de mitocondrias para satisfacer sus demandas energéticas intensivas y recientemente se propuso la transferencia mitocondrial intercelular entre los CM y los macrófagos residentes en el corazón (cMAC) circundantes como una ruta extracelular por la cual los CM eliminan las mitocondrias disfuncionales (Pang Y *et al.*,2021). También en un estudio se observó una transferencia mitocondrial mediante nanotubos tunelizados desde MSC hacia macrófagos induciendo una mejora en su capacidad fagocítica (Jackson M *et al.*,2016), esto similar a otro estudio realizado posteriormente donde se observó que las MSC humanas suprimen la secreción de citoquinas proinflamatorias, mejoran la capacidad fagocítica y promueven la expresión del marcador de macrófagos M2 en macrófagos humanos en presencia de líquido de lavado broncoalveolar de pacientes con ARDS (síndrome de dificultad respiratoria aguda) a través de transferencia mitocondrial a través de vesículas extracelulares (Morrison T *et al.*,2017). En un estudio se observó que existe transferencia mitocondrial de los eritroblastos hacia los macrófagos vía nanotubo tunelizado (TNT) y vesículas extracelulares (Yang C *et al.*,2021). En un

estudio se observó que las células Jurkat transfieren mitocondrias a través de nanotubos tunelizados a las MSC, pero reciben pocas mitocondrias de las MSC, lo que genera quimiorresistencia (Wang J *et al.*, 2018).

Con el avance de la ciencia, la transferencia de mitocondrias se logró realizar mediante métodos artificiales mediante el protocolo llamado MitoCeption, que corresponde a una nueva herramienta diseñada para comprender mejor la dinámica mitocondrial implantada artificialmente y los efectos de las mitocondrias transferidas a las células receptoras independientemente de otros factores (Zampieri *et al.*, 2021). El protocolo MitoCeption permite la transferencia de mitocondrias aisladas del tipo de célula A al tipo de célula B de modo que, al final, el tipo de célula B contiene tanto su propia mitocondria como la exógena (Caicedo *et al.*, 2015).

En relación a una transferencia mitocondrial hacia linfocitos T CD4⁺, en un estudio se observó transferencia de mitocondrias de las células reguladoras derivadas de mieloides (MDRC) hacia linfocitos T de sangre periférica tanto de donantes sanos como asmáticos a través de exosomas, este análisis fue a mediante un cocultivo entre exosomas del BAL (liquido broncoalveolar) marcados con Mito Tracker green con células T CD4⁺ y se observó a través de imageStream entregada por citometría de flujo exosomas Mito Tracker Green⁺ (MTG⁺) en el

interior de linfocitos T CD4⁺ verificando una transferencia exosomal de mitocondrias y mediante un marcaje con la sonda MitoSox, tinte fluorescente rojo que evalúa la producción de superóxido, se observó que las células que adquirirían las mitocondrias exhibían un aumento en la producción de superóxido presentando como un marcaje positivo a la sonda MitoSox (Hough K *et al.*,2018). También existe otro estudio donde se observó que la transferencia de mitocondrias desde MSC hacia linfocitos Th17 induce una disminución de su secreción de IL-17 (Luz-Crawford *et al.*,2019). Por otro lado, existe un estudio que evaluó la transferencia entre células madre mesenquimales (MSC) marcadas con MTG⁺ con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a través de cocultivo, que luego a través de FACS se evaluó el porcentaje de transferencia mitocondrial de células T CD3⁺, B CD19⁺ y natural killer (NK) CD56⁺, medido como el porcentaje de MTG⁺ (ilustración 14), y tal transferencia se confirmó mediante imágenes de fluorescencia (ilustración 15). En este estudio también se realizó transferencia mitocondrial utilizando el protocolo artificial denominado MitoCeption, siendo la célula dadora de mitocondrias la MSC con previo marcaje con MTG hacia Linfocitos T CD3⁺, observando en ambas situaciones que los linfocitos T CD3⁺ son células permisivas a la transferencia mitocondrial (ilustración 16). También se evaluó la secreción de IFN- γ desde células T CD4⁺ y CD8⁺ post-transferencia mitocondrial en un ambiente inflamatorio, observando un descenso en la secreción de la citoquina y también se analizó el efecto de la transferencia mitocondrial artificial sobre la proliferación de linfocitos T CD3⁺ y no

se observaron efectos significativos. Enfocándose en los linfocitos T CD4⁺ se observó que esta transferencia indujo un aumento la expresión de las transcripciones de ARNm involucrados en la diferenciación a células Tregs y para comprobar que la transferencia induce una alteración en la diferenciación del linfocito TCD4⁺, se realizaron análisis funcionales con células T CD4⁺ sin tratamiento previo clasificadas con FACS. Las PBMC humanas se mitoceptaron, tiñeron y clasificaron para poblaciones de células vírgenes (CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻) Mito⁺ (que adquirieron mitocondrias) y Mito⁻ y se observó su diferenciación *in vitro* en ausencia o presencia de medios inductores de Treg (anti-CD3, IL-2 y TGF-β1) y se observó que, en ambas condiciones, las células Mito⁺ presentaban porcentajes más altos de células T regs con fenotipo FOXP3⁺CD25⁺ en comparación a Mito⁻ lo que reveló que la MitoCeption sólo era capaz de impulsar la diferenciación de las células Tregs (CD25⁺FoxP3⁺) (Court A *et al.*, 2020).

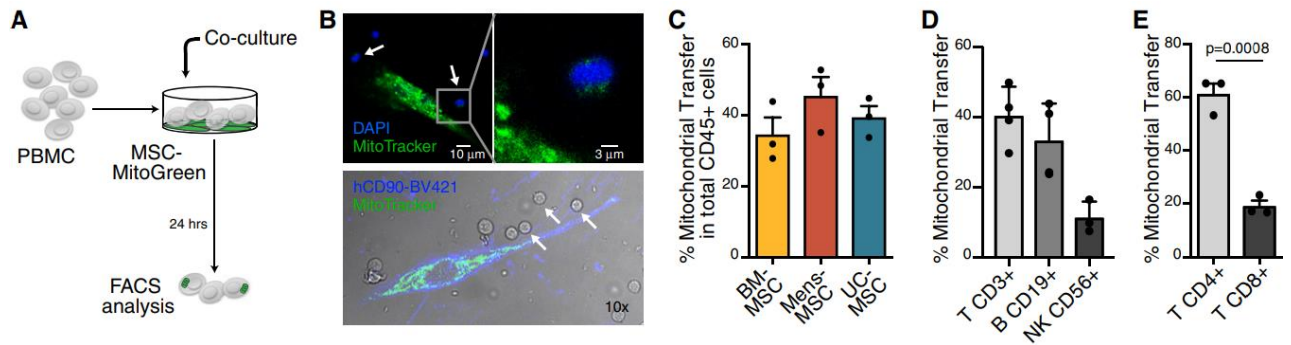


Ilustración 14: Representación de la transferencia mitocondrial desde célula madre mesenquimal (MSC) hacia células inmunitarias a través de cocultivo y previo marcaje mitocondrial en las MSC (figura A y B). En C representa el porcentaje de transferencia mitocondrial hacia células CD45+ desde MSC aisladas de diferentes sectores, tal como medula ósea (BM), menstrual y cordón umbilical. En D representa el porcentaje de transferencia mitocondrial hacia linfocito T CD3+, linfocito B CD19+ y célula NK CD56+. En E representa el porcentaje de transferencia mitocondrial hacia linfocito TCD4+ y CD8+ (Court A et al., 2020).

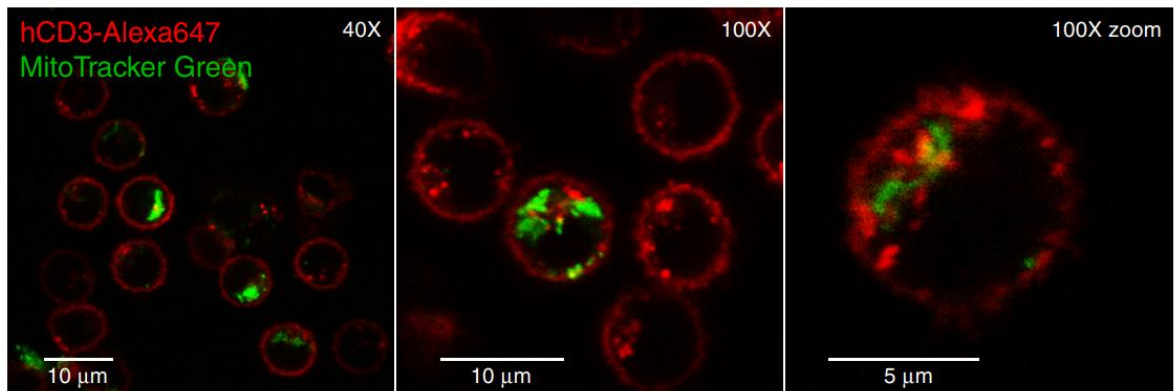


Ilustración 15: Representación mediante imágenes de fluorescencia de la transferencia mitocondrial desde célula madre mesenquimal hacia linfocito T (Court A et al., 2020).

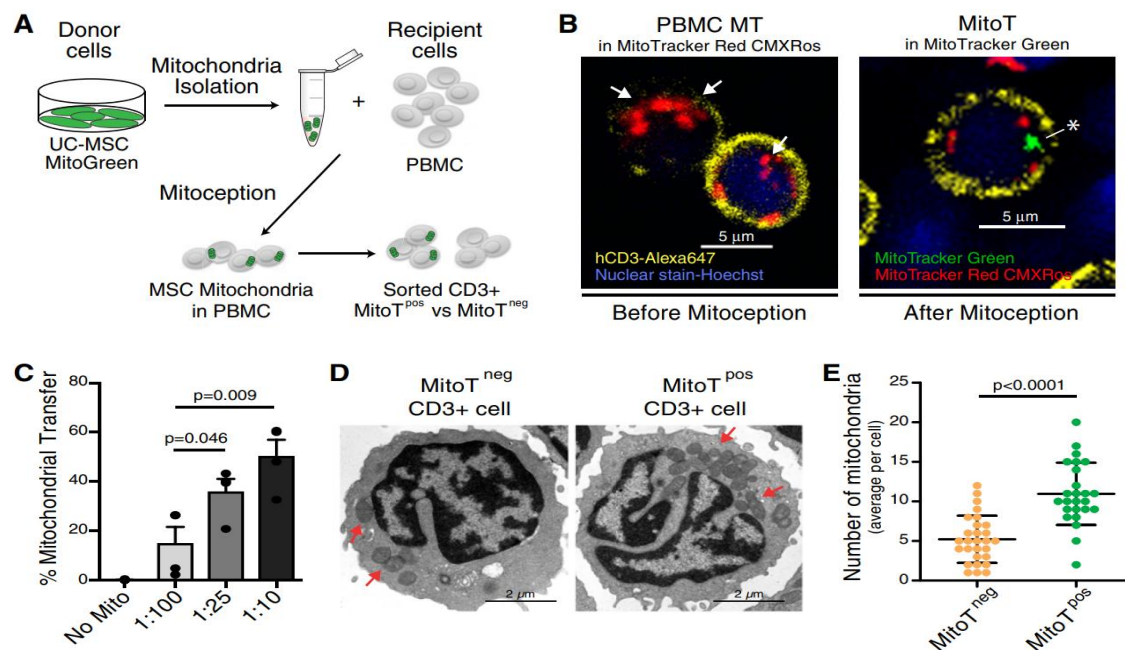


Ilustración 16: Representación de la transferencia mitocondrial artificial hacia el linfocito T CD3⁺. La figura A representa el esquema de transferencia artificial de mitocondrias

obtenidas desde células madre mesenquimales. En la figura B corresponden a imágenes de microscopia confocal de linfocitos T control y mitoceptados, con la mitocondria de color verde. En la figura C representa el grafico de transferencia mitocondrial en los linfocitos T dado por número de célula dadora y célula receptora. En la figura D corresponde a imágenes de microscopia electrónica de transmisión de linfocitos T CD3+ mitoceptados (mito pos) y control (mito neg). En la figura E representa un gráfico del número de mitocondrias en las células mito positiva y mito negativa (Court A et al., 2020).

Retomando el contexto del cáncer, la modulación de las mitocondrias tumorales es un mecanismo importante que ayuda a las células cancerosas a escapar del control del sistema inmunológico y desarrollar resistencia a los fármacos. Además de las células neoplásicas e inmunes, el microambiente tumoral contiene muchos tipos de células diferentes que pueden controlar el estado de las mitocondrias en un tumor tanto directamente, por contacto célula-célula, como indirectamente, por la secreción de factores solubles y una variedad de vesículas extracelulares (Sahinbegovic H *et al.*, 2020) (Takenaga K *et al.*, 2021). Existen antecedentes que las células cancerosas adquieren mitocondrias de las células sanas circundantes para optimizar y reparar la maquinaria metabólica dañada y promover la supervivencia, siendo uno de sus donantes críticos las células del estroma mediante la formación de nanotubos tunelizados (Shanmughapriya S *et al.*, 2020) (Pasquier J *et al.*, 2013) (Lu J *et al.*, 2017) (Qin Y *et al.*, 2021),

(Antanavičiūtė I et al.,2014) (Zhang Z et al., 2020). Por ende, el transporte de mitocondrias son un mecanismo por el cual la célula tumoral toma ventaja en el microambiente tumoral.

2. PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

2.1 Problema de investigación:

Se sabe que existen mecanismos de transferencia mitocondrial entre diversas células, incluidas las células cancerígenas y se sabe que en el microambiente tumoral existe un alza de los linfocitos que exhiben un fenotipo exhausto, con una alza en la expresión de receptores inhibitorios, pero hasta la fecha no se ha asociado una transferencia mitocondrial desde las células tumorales hacia los linfocitos T que explique este fenómeno, ni se han evaluado mecanismos de transferencia mitocondrial artificial utilizando como célula dadora de mitocondrias la célula cancerígena, por ende, no se han realizado estudios que analicen el fenotipo exhausto inducido por transferencia artificial de mitocondrias obtenidas de líneas celulares de cáncer oral hacia linfocitos T.

2.2 Pregunta de investigación:

¿Cuál es el efecto en la expresión de moléculas de superficie inhibitorias, proliferación y secreción de citoquinas de la transferencia artificial de mitocondrias obtenidas desde la línea celular HSC3 hacia linfocitos T CD4⁺?

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

La transferencia artificial de mitocondrias obtenidas de la línea celular HSC3 induce un fenotipo exhausto caracterizado por el alza en la expresión de moléculas de superficie inhibitorias, disminución de la proliferación y disminución de citoquinas inflamatorias en linfocitos TCD4⁺ aislados de individuos sanos.

3.2 Objetivo general

Analizar el fenotipo del linfocito T CD4⁺ post transferencia artificial de mitocondrias obtenidas desde la línea celular de cáncer oral HSC-3.

3.3 Objetivos específicos:

- 1.- Evaluar la eficiencia de la transferencia artificial de mitocondrias obtenidas de línea de cáncer oral HSC-3 hacia linfocitos TCD4⁺.
- 2.- Evaluar la proliferación, expresión de moléculas de superficie y la secreción de citoquinas de los linfocitos TCD4⁺ post transferencia mitocondrial artificial.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

1^{er} Objetivo específico: Estandarizar y evaluar la eficiencia de la transferencia artificial de mitocondrias obtenidas de línea de cáncer oral HSC-3 hacia linfocitos TCD4⁺.

4.1 Obtención de muestras:

4.1.1 Aislamiento de linfocitos T CD4⁺

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC):

Se recolectaron muestras de sangre periférica de donantes sanos con previo consentimiento informado y se utilizó el medio de gradiente de densidad Ficoll - Paque PLUS para el aislamiento de células mononucleares (PBMC) a través de una centrifugación por gradiente de densidad. La muestra se diluyó en una razón 1:1 con PBS (Tampón fosfato salino), luego lentamente la muestra se incorporó a un tubo de 50 mL inclinado con ficoll, se centrifugó por 20 minutos y con una pipeta pasteur se extrajo el anillo de células mononucleares que se encuentra en la interfaz el cual se traspasó a un tubo de 50 ml que luego se lavó a través de dos centrifugaciones a 1000 rpm y 1500rpm por 10 minutos, donde el pellet se resuspendió con 1 mL PBS, del cual se extrajo 10 µl y depositó en un pocillo de la placa neubauer que contenía 90 µl del reactivo azul de Tripán, se resuspendió

y de ella se extrajo 10 µl que se depositó en una placa de Neubauer para el conteo de células utilizando la fórmula del anexo n°1.

Aislamiento de linfocitos T CD4⁺ por MACS:

El aislamiento de linfocitos T CD4⁺ se realizó a través de una separación magnética de células activadas “MACS”, mediante el uso de perlas magnéticas que se encuentran unidas a anticuerpos específicos. La separación se lleva a cabo haciendo pasar una muestra previamente incubada con microesferas paramagnéticas adheridas a la superficie celular mediante un anticuerpo específico, a través de una columna que contiene una matriz de esferas ferromagnéticas recubiertas de un material inerte que no daña las células. Cuando se coloca la columna sobre un imán, las esferas crean un campo magnético de gran intensidad que atrae fuertemente las microesferas MACS y las células unidas a ellas, mientras que las células que no se unen fluyen libremente a través de la columna.

El protocolo corresponde a realizar una centrifugación a la muestra contada de PBMC, de acuerdo al número de células y se resuspende el pellet de células PBMC en 80 µL de buffer MACS por 10 millones de células, luego se incorpora 20 µL de microbeads CD4 por 10 millones de células, se incuba por 15 minutos en el refrigerador a 4°C en oscuridad, se lava con 1 a 2 ml de buffer MACS por 10 millones centrifugando a 1500 rpm por 10 minutos y el pellet se resuspendió

en 500ul de buffer MACS por 100 millones de células. A continuación, se realizó la preparación del equipo MACS, se incorporó la columna MACS al equipo y se lavó con 3 ml de buffer MACS, posterior a ello, se incorporó la solución de PBMC a la columna y se realizaron 3 lavados de 3 ml de buffer MACS, el volumen que eluyó de la columna se recibió en un falcón de 15ml rotulado como población negativa. Una vez terminados los lavados se retiró la columna del equipo MACS y se incorporó en un falcón de 15 ml rotulado como población positiva, ahí se añadieron 3 ml de buffer MACS a la columna y se retiró lo adherido previamente. Finalmente se centrifugó la población positiva a 1500 rpm por 10 minutos y se resuspendió en 1mL de buffer MACS para llevar al sorter. (Miltenyi Biotec CD4 MicroBeads Human, N° de catálogo: 130-045-101).

La población enriquecida de linfocitos TCD4⁺ se llevó a placa de 96 pocillos con medio RPMI 5% SBF (Suero bovino fetal) e IL-2 y se activó con anti CD3/CD28 en una relación 1/4, es decir 6,25uL por pocillo por millón de células. Luego, se incubó a 37°C y se expandió en placa y en flask T25 con medio RPMI 5% SBF e IL-2.

4.1.2 Procesamiento de línea celular de cáncer:

La línea de cáncer HSC3 se incubó en flask T175 con medio DMEM alto en glucosa y 5% de SBF para su crecimiento, las células fueron observadas regularmente, una vez completado un 80-100% de crecimiento se expandieron a otros flask T175 con el medio de cultivo correspondiente y adicional se congelaron células tumorales a -80°C para próximos experimentos a través de un protocolo de congelamiento. El medio se cambió cada 2 a 3 días, dependiendo de su confluencia y se expandió de acuerdo con las necesidades de células requerido en los siguientes experimentos.

4.1.3 Aislamiento de mitocondrias de células cancerosas:

Se aislaron mitocondrias de células tumorales de cáncer oral utilizando el kit de aislamiento mitocondrial para células cultivadas (ThermoFisher Scientific) con un marcaje previo por incubación con sondas MitoTracker® Green FM realizado tras una incubación a 37°C por 30 minutos con la sonda en una concentración de 100 nM previamente precalentada, una vez terminado el marcaje se lavaron las células a través de una centrifugación a 1500 rpm por 10 minutos, se extrajo el sobrenadante y se dejó el pellet listo para el procedimiento de aislamiento. (MitoTracker®Green FM, n° catálogo:M7514). El protocolo se basó en sedimentar 2×10^7 células centrifugando la suspensión de células tumorales en un

tubo de microcentrífuga de 2,0 mL a ~850g durante 2 minutos. Luego, se desechó el sobrenadante y se agregaron 800 µL de reactivo de aislamiento de mitocondrias A con una agitación en vortex intermedio durante 5 segundos y se dejó en hielo por 2 minutos exactos. Luego, se agregaron 10 µL del reactivo de aislamiento de mitocondrias B, se agitó en vortex a velocidad máxima por 5 segundos y se incubó en hielo por 5 minutos agitando a velocidad máxima cada minuto. Luego se agregaron 800 µL de reactivo de aislamiento de mitocondrias C, se agitó por inversión y se centrifugó a 700g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de 2,0 mL y se centrifugó a 12.000g durante 15 minutos a 4°C, el sobrenadante resultante (fracción de citosol) se transfirió a un nuevo tubo y al pellet (mitocondrias aisladas) se le añadieron 500 µL del reactivo de aislamiento de mitocondrias C y se centrifugaron a 12.000g durante 5 minutos a 4°C, donde finalmente se desechó el sobrenadante, y el pellet (mitocondrias) se mantuvo en hielo para mantener su integridad. (Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells n°: 89874)

4.2 MitoCeption

La transferencia mitocondrial hacia linfocitos T CD4⁺ se realizó siguiendo el protocolo MitoCeption adecuado a tubos eppendorf, en donde se centrifugaron las células receptoras en medio Xvivo o RPMI a 500g por 5 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en la suspensión celular de

mitocondrias en 250 uL de medio DMEM alto en glucosa con 5% de SBF con vortex por 5 segundos y se centrifugó a 500g por 10 minutos a 4°C. Luego se incubó a 37°C por 24 horas. Al día siguiente las células se lavaron a 1500 rpm por 5 minutos, se contaron y plaquearon en una proporción de 100.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos en medio RPMI 5%SBF e IL-2 y se dejó incubando hasta los próximos análisis.

2^{do} objetivo específico: Evaluar la proliferación, expresión de moléculas de superficie y la secreción de citoquinas de los linfocitos TCD4⁺ post transferencia mitocondrial artificial.

4.3 Ensayo de proliferación

La proliferación de las células T se midió utilizando el kit de proliferación de células CellTrace™ Violet según las instrucciones del fabricante, que se emplea para el marcaje de células *in vitro* e *in vivo* con el fin de rastrear múltiples generaciones a través de citometría de flujo. Las células vivas se marcaron covalentemente con un tinte estable muy brillante. Cada generación de células aparece como un pico diferente en un histograma de citometría de flujo y a medida que aumenta la proliferación la fluorescencia del tinte disminuye.

El marcaje se basa en primer lugar en preparar la sonda, en este trabajo se utilizó una concentración de 2uM de sonda en 1mL, y posterior a ello tanto la sonda preparada y las células a marcar, los linfocitos TCD4⁺ en 1 mL, fueron precalentadas a 37°C durante 10 minutos, luego se introdujo la sonda a los linfocitos TCD4⁺ llegando así a una concentración de 1 uM de Cell trace Violet y se incubo por 20 minutos en el baño termorregulador protegido de la luz, en paralelo se deja en un recipiente hielo con un frasco de medio con SBF. Una vez terminado el tiempo de incubación, las células marcadas se dejaron en hielo y se le incorporo 5 mL de medio con SBF frio para detener la reacción y se dejó en hielo por 5 minutos y finalmente las células se lavaron a 1500 rpm por 5-10 minutos y las células se resuspenden en medio Xvivo y se contaron para tener el número de células y con él, se distribuyó las condiciones de la MitoCeption, tanto las células que fueron mitoceptadas y las que se utilizaron como control. (CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit, Ref: C34557).

4.4 Ensayo de expresión de moléculas de superficie:

La expresión de moléculas de superficie de los linfocitos TCD4⁺ control y mitoceptados se analizó a través de citometría de flujo, técnica de análisis celular que permite medir las características fenotípicas (marcadores de superficie) de las células a través de un marcaje con anticuerpos monoclonales conjugados a un compuesto fluorescente.

Para ello se rotularon tubos de acuerdo con los 3 paneles de anticuerpos a utilizar y las condiciones controles de los paneles, el primer panel correspondió a los anticuerpos: CTLA4-APC y CD25-PE/Cy7, el segundo panel correspondió a: TIGIT-APC y PDL-1-PE/Cy7, y el tercero correspondió a: Lag3- PE/Cy7, PD1- APC y Tim3-Alex780. La cantidad de anticuerpos dependió de la cantidad de células y las células a marcar correspondieron a las poblaciones post-MitoCeption tanto control como mitoceptadas. Para el marcaje se retiraron los pocillos a utilizar con previa resuspensión, se llevaron a cada tubo rotulado y se centrifugaron a 1500rpm a 5 minutos, donde se obtuvo un sobrenadante que se guardó para análisis de citoquinas. El pellet se resuspendió en los paneles de anticuerpos correspondientes y se incubó por 30 minutos en el refrigerador a 4°C, luego se lavó centrifugando a 1500rpm por 10 minutos, se retiró el sobrenadante, se resuspendió en 200 uL de PBS con 10uL de beads de conteo, se llevó al citómetro de flujo y el análisis se realizó utilizando el software FlowJo.

4.5 Ensayo de secreción de citoquinas:

Para la detección de citoquinas humanas Th1/Th2/Th17 se utilizó el kit de Cytometric Bead Array (CBA), el cual contiene anticuerpos dirigidos hacia las citoquinas: interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-4 (IL-4), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-10 (IL-10), Factor de Necrosis tumoral-alfa (TNF- α), interferón gamma (IFN- γ) e interleuquina-17A (IL-17A) en una muestra de sobrenadante de cultivo pos-MitoCeption. A 50ul del sobrenadante de cada condición del experimento de MitoCeption, se agregó un mix de 7 citoquinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α y IFN- γ) y del anticuerpo de captura conjugado con phycoerythrin (PE) del Kit Th1/Th2/Th17 agitados previamente en el vórtex de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las distintas citoquinas fueron representadas por beads que emiten distintas intensidades de fluorescencia en APC (aloficocianina) y la concentración de cada citoquina fue definida por el anticuerpo de captura conjugado con phycoerythrin (PE), donde la muestra, los beads y el anticuerpo de captura fueron incubados por 3 horas en oscuridad posterior se lavan con 1 mL de PBS y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos, para eliminar todo anticuerpo de captura no unido, se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió con 150 uL de PBS y se llevó la muestra protegida de la luz al citómetro de flujo. (Human Th1/Th2/Th17 CBA Kit, n°catálogo: 560484).

6. RESULTADOS

Para evaluar la eficiencia de la transferencia mitocondrial artificial, se realizó una tinción de mitocondrias a partir de las células cancerosas HSC-3 con el reactivo MitoTracker Green (MTG+), el cual permite visualizar la mitocondria de color verde fluorescente. En la Figura 1 se observa la eficiencia del marcaje mitocondrial a través de MitoTracker Green (a una concentración de 100 nm) en las células HSC3 (Figura 1), donde se observó plots de citometría de la condición control negativo al marcaje y las células que se marcaron con el tinte mitocondrial, observándose dos poblaciones claramente definidas. Además, en la Figura 2 muestra la fluorescencia de color verde de las mitocondrias marcadas con MitoTracker Green a través de imágenes de fluorescencia obtenidas de las dos poblaciones anteriormente nombradas (Figura 2), donde se observa claramente células con mitocondrias verdes en las células teñidas con el tinte y no se observa fluorescencia en las células negativas al marcaje.

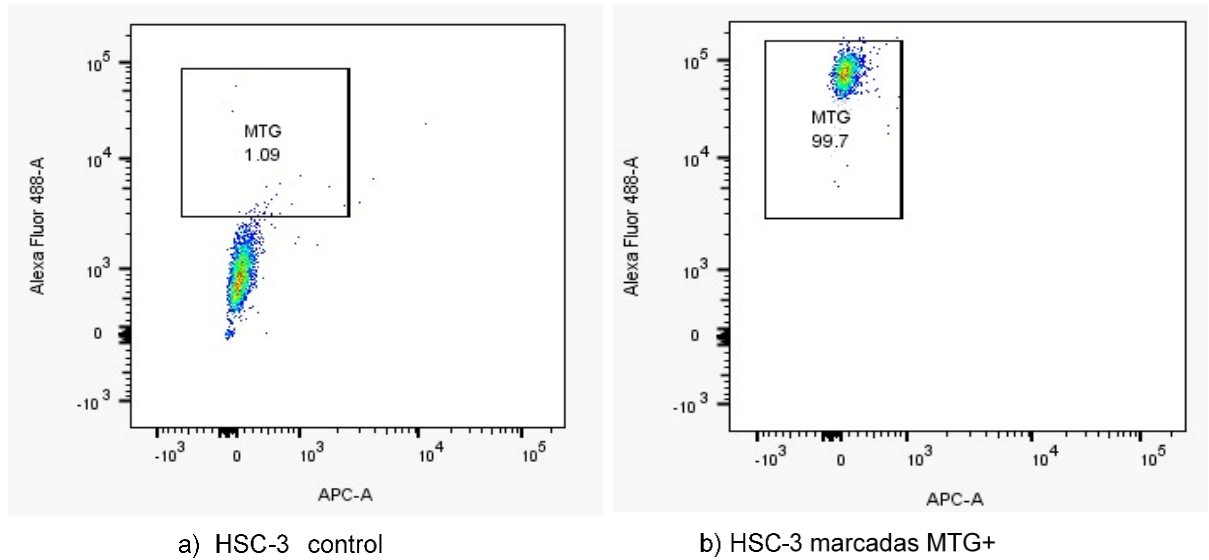


Figura 1: Marcaje mitocondrial en células de cáncer oral HSC-3 a través de citometría de flujo. La población positiva para MitoTracker Green se representa a través del fluoróforo AlexaFluor 488-A y la viabilidad celular a través del LiveDead en el fluoróforo APC (aloficocianina), resultados obtenidos a través de FlowJo.

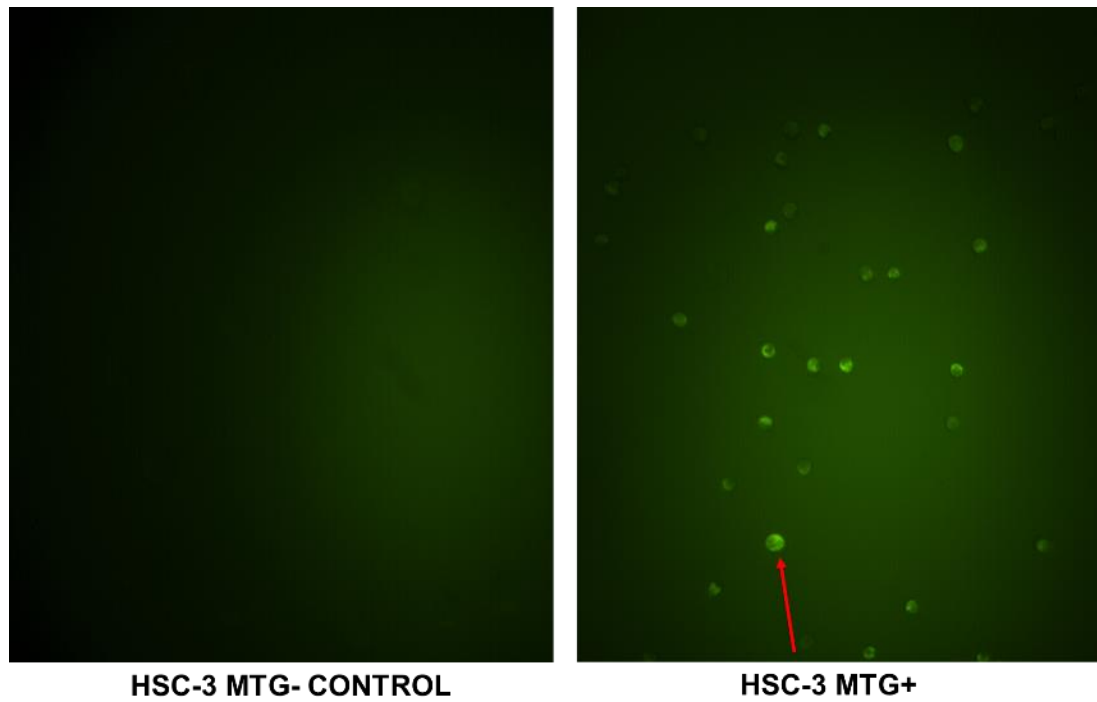


Figura 2: Imágenes de fluorescencia del marcaje mitocondrial en células de cáncer oral HSC-3. La flecha roja indica una célula con mitocondrias verdes producto del marcaje en las células cancerosas con el tinte mitocondrial MitoTrackerGreen.

Posterior al marcaje los próximos procedimientos correspondieron al aislamiento y transferencia de mitocondrias hacia el linfocito TCD4⁺. En la Figura 3 representa la eficiencia de la transferencia mitocondrial a través del protocolo de MitoCeption, a través de la adquisición de mitocondrias marcadas verdes en linfocitos T CD4⁺ receptores de mitocondrias (Figura 3). En la figura se observan plots de citometría de la condición control negativa a la transferencia mitocondrial y plots de los linfocitos T positivos a la transferencia mitocondrial, donde se puede observar el porcentaje de transferencia dado por la expresión positiva del tinte mitocondrial MitoTrackerGreen.

La transferencia también se evaluó por número de célula dadora de mitocondrias, en la Figura 4 muestra la eficiencia de la transferencia mitocondrial por número de célula dadora de mitocondrias, utilizando 5 a 10 millones de células HSC-3 y la eficiencia se evaluó como positivo a MitoTrackerGreen (Figura 4). Hasta la fecha se han realizado un total de 9 transferencias mitocondriales representadas en la Figura 5, donde se observa un promedio de 60% de transferencia mitocondrial (Figura 5).

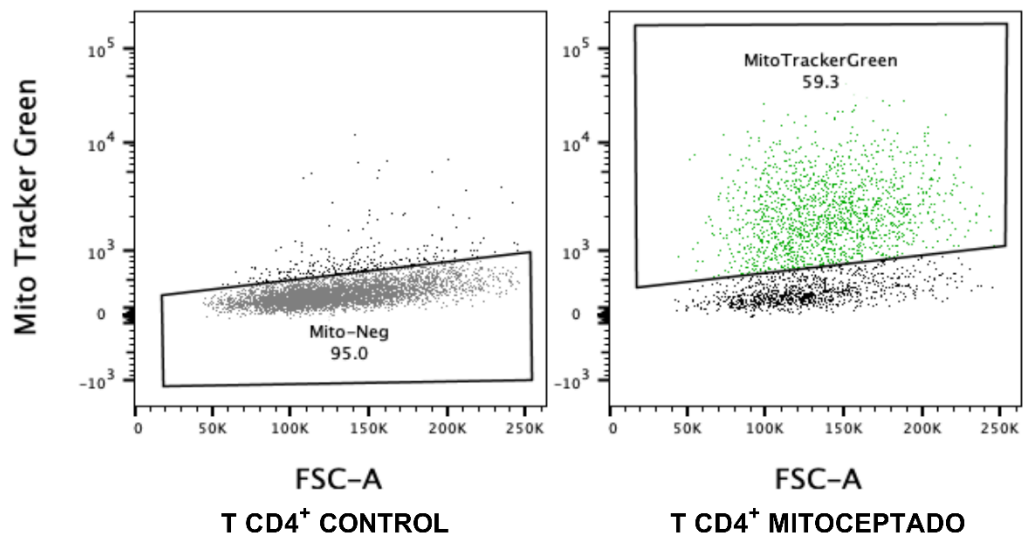


Figura 3: Resultados del proceso de Mitocaptación hacia linfocitos T CD4⁺ a través de citometría de flujo. Se muestran los plots de citometría de la condición control TCD4⁺ y mitocaptadas, indicando la población positiva a la adquisición de mitocondrias marcadas con MitoTracker Green (mito+) de color verde, resultados obtenidos a través de FlowJo.

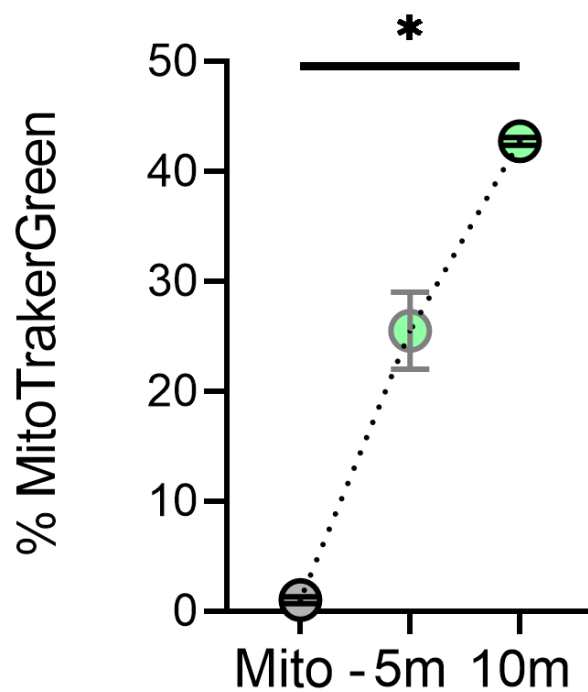


Figura 4: Eficiencia de la transferencia mitocondrial por número de célula dadora de mitocondrias. Gráfico que representa la eficiencia a través del porcentaje de MitoTracker Green adquirido en el linfocito TCD4⁺, de la condición control (mito-) y Mitoceptadas desde 5 y 10 millones de células HSC-3. Estadística a través de la prueba estadística one way anova, con un p: 0,0211 (*) entre mito- y 10 millones, análisis a través de Prism 9.

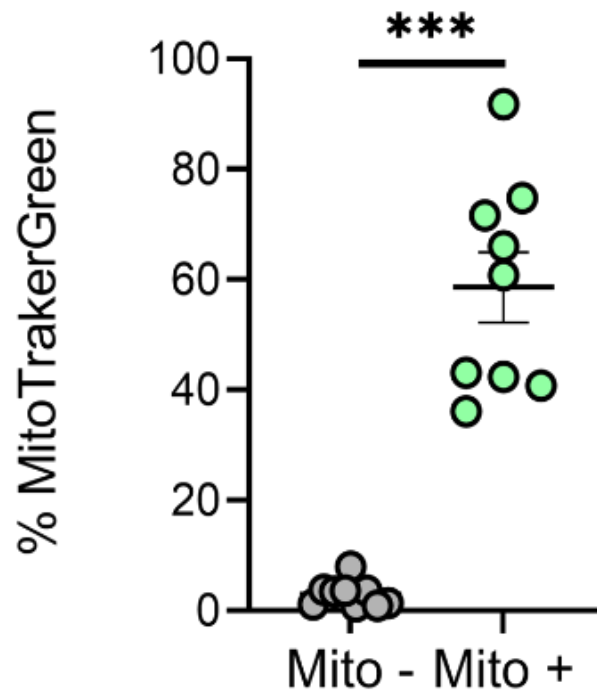


Figura 5: Gráfico de la eficiencia de la transferencia mitocondrial hacia linfocitos TCD4⁺. Se observa la adquisición de mitocondrias mediante el marcaje de MitoTracker Green en linfocitos T CD4⁺ control (mito-) y mitoceptadas (mito⁺). Estadística a través de Prism 9, con un n=9, un p<0,0001 (***) por el ensayo estadístico test.

Para el segundo objetivo específico el primer resultado a mostrar es el efecto de la transferencia mitocondrial en la proliferación del linfocito TCD4⁺. En la imagen A de la Figura 6 representa dos histogramas de citometría de flujo del IFM del reactivo cell trace violet del día 1 y 3 post transferencia mitocondrial (Figura 6A). En cada uno se observa el pick pre-transferencia sin color y post transferencia de cada grupo a analizar, el que adquirió mitocondrias a través de mitoception(mito+) de color verde y el grupo control no mitoceptado (mito-) de color gris. En ambos días se observa una diferencia en la proliferación entre el grupo control y el grupo mitoceptado. En la imagen B y C de la Figura 6 se observa dos gráficos que representan el delta del MFI del reactivo cell trace violet al día 1 (Figura 6B) y 3 (Figura 6C) pos-transferencia mitocondrial respectivamente. El MFI está dado por la diferencia entre el MFI del cell trace violet pre-transferencia y post-transferencia de cada grupo. Se observo que existe una diferencia significativa entre el grupo control y el mitoceptado, y esta diferencia se mantiene en el tiempo.

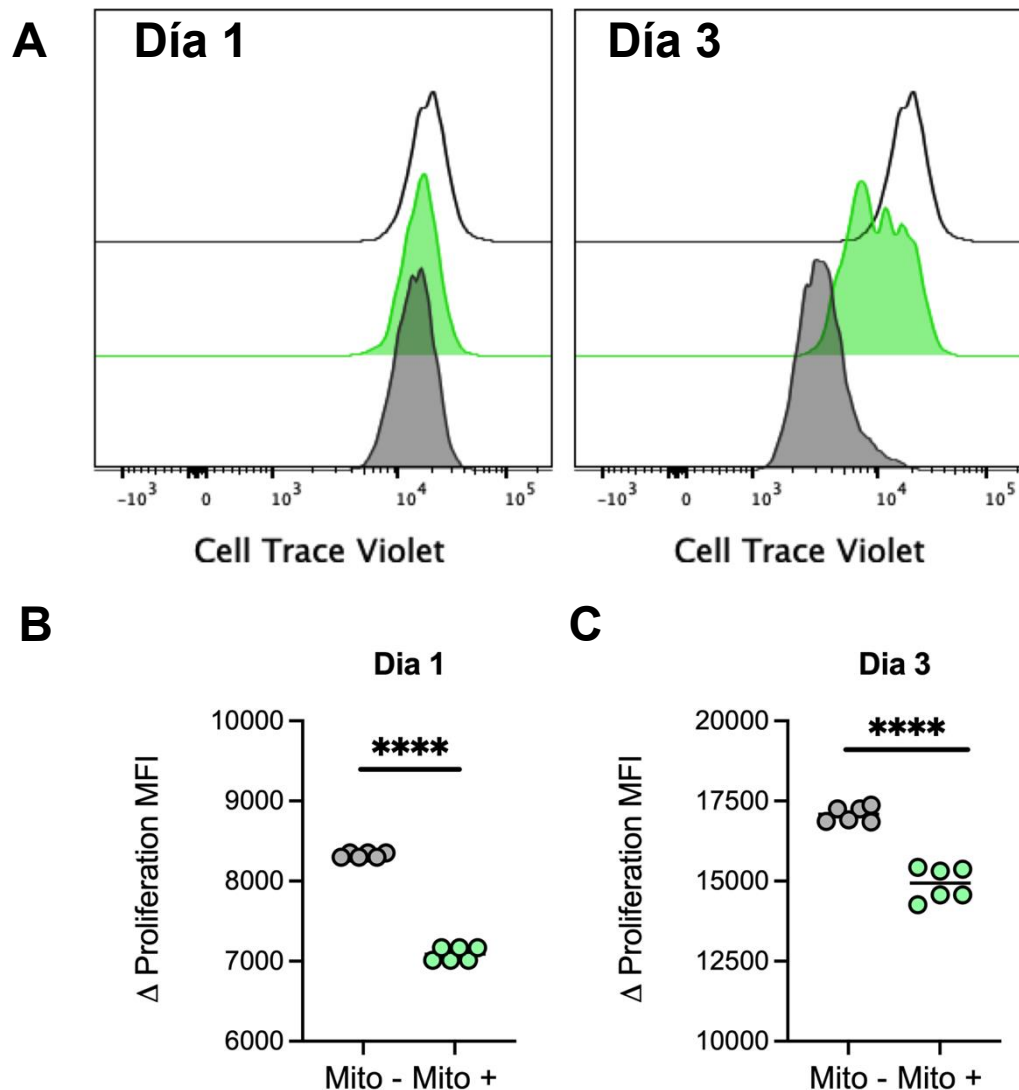


Figura 6: Resultados del ensayo de proliferación a través de citometría de flujo.

En la imagen A representa el histograma representa del índice de fluorescencia media (MFI) del reactivo cell trace violet (CTV) de la población pre-transferencia (sin color), control mito- (Gris) y Mito+ (Verde) post transferencia. En la imagen B y C se observa gráficos del delta de MFI del reactivo CTV al día 1 y 3 respectivamente. Resultados obtenidos a través de FlowJo y estadística a través de Prism9 con un $P < 0,0001$ a través del test estadístico pareado T test.

Luego se analizó el efecto de la transferencia mitocondrial en el fenotipo del linfocito T CD4+, dado por la expresión de diversas moléculas de superficie. En la Figura 7 representa el histograma de citometría de flujo y el gráfico del % de expresión de cada una de ellas, tanto CD25 (Figura 7A), OX40 (Figura 7B), PD-1 (Figura 7C), PDL-1 (Figura 7D), LAG-3 (Figura 7E), TIM-3 (Figura 7F), TIGIT (Figura 7G) y CTLA-4 (Figura 7H), de la población control no mitoceptada (mito⁻, color gris) y mitoceptada (mito⁺, color verde). Se observaron diferencias significativas en 5 moléculas de superficie: PD-1, PDL-1, LAG-3 TIGIT y CTLA-4, dada esta diferencia significativa por un alza en el porcentaje de la población con expresión positiva de estas moléculas en el grupo mitoceptado.

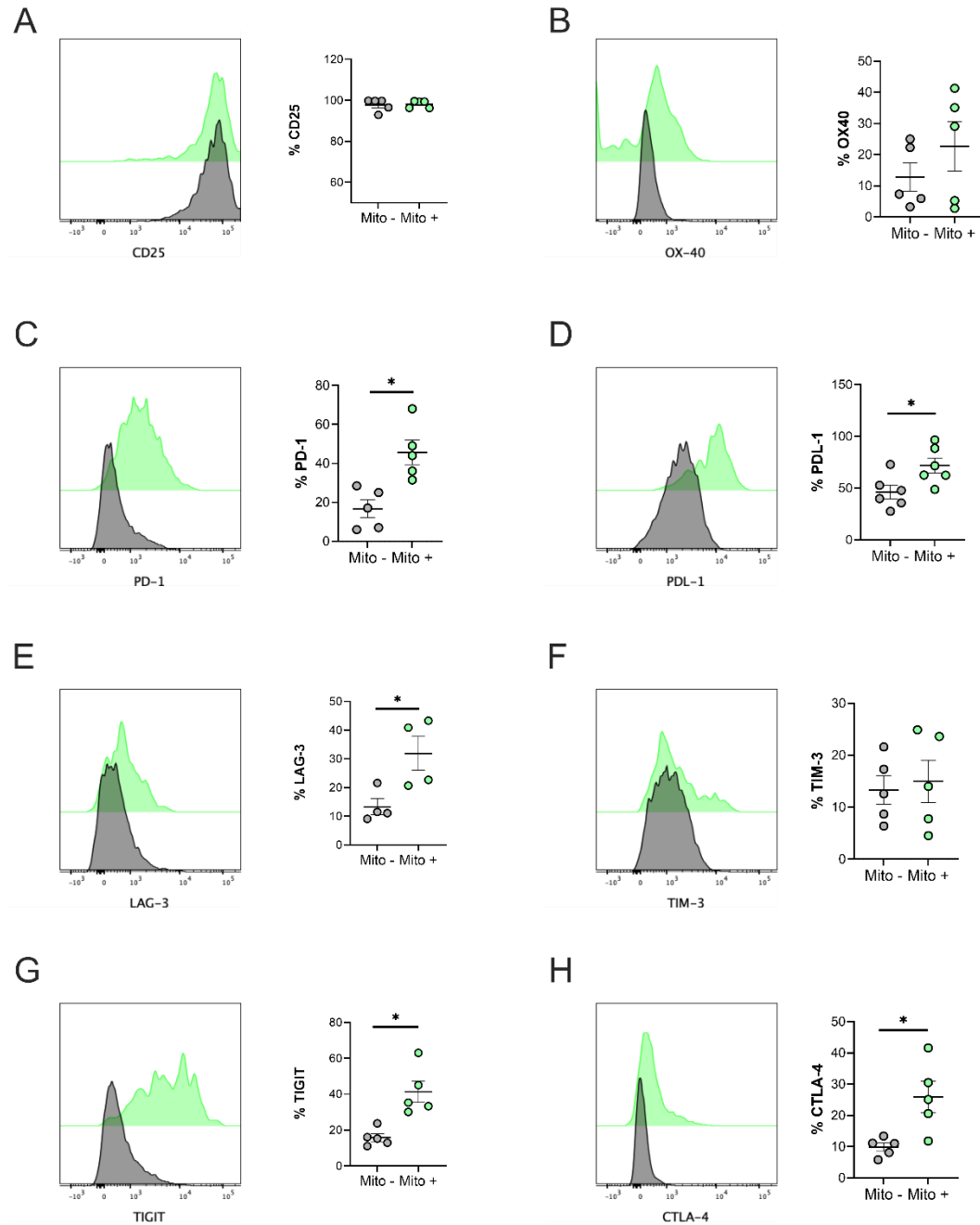


Figura 7: Expresión de moléculas de superficie en los linfocitos TCD4⁺ a través de citometría de flujo. Se observa tanto histograma como gráfico de la expresión de (A) CD25, (B) OX40, (C) PD-1, (D) PDL-1, (E) LAG-3, (F) TIM-3, (G) TIGIT y (H) CTLA-4.

Resultados a través de FlowJo y estadística a través de PRIMS 9 utilizando la prueba estadística T student, con un $p < 0,05$ (*).

Lo último a revisar para el objetivo específico 2 es el efecto de la transferencia mitocondrial en la secreción de citoquinas del linfocito T CD4⁺. La Figura 8 representa la secreción de citoquinas del linfocito T CD4⁺, tanto control (mito-) y mitoceptado (m+), se analizaron las siguientes citoquinas: IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-2, IL-4 e IL-17 (Figura 8). Se observó una disminución significativa en las citoquinas tipo Th1 y Th2: IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-4 en linfocitos T CD4⁺ mitoceptados con mitocondrias provenientes de células cancerosas.

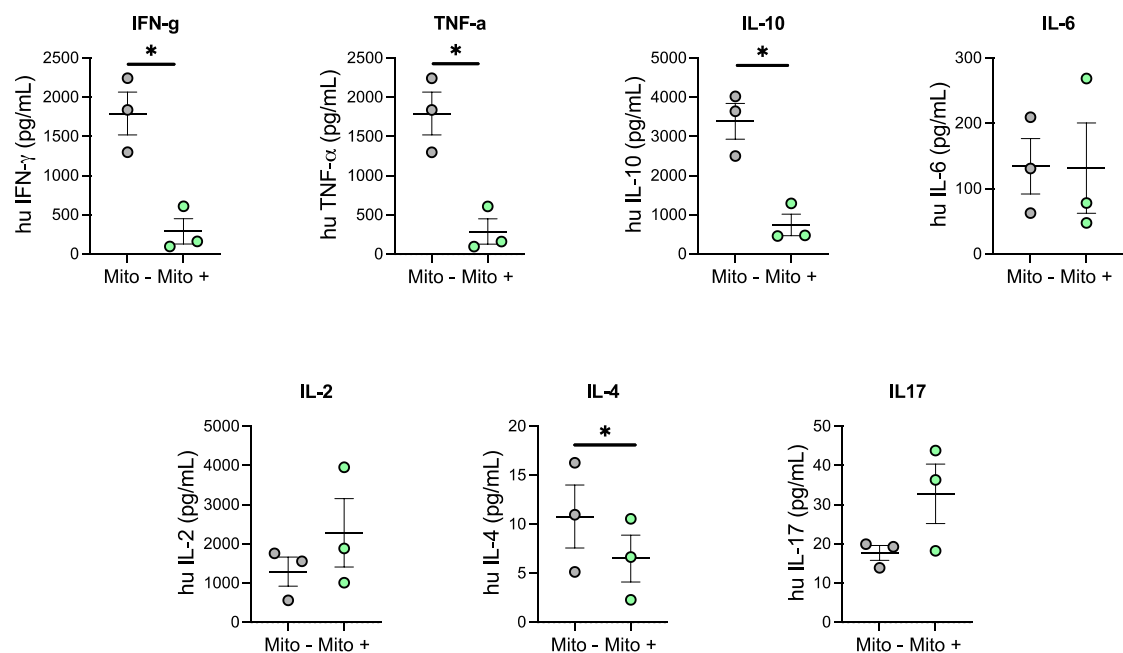


Figura 8: Secreción de citoquinas en linfocitos T CD4⁺ mitoceptados a través de citometría de flujo. Los gráficos indican la concentración en pg/mL de citoquinas IFN-γ, TNF-α, IL-10, IL-8, IL-2, IL-4 e IL-17 humanas (hu) en población TCD4⁺ Mito- y Mito+. La estadística se realizó mediante Prism 9, utilizando la prueba estadística *t test* con un $p < 0,05$ (*).

7. DISCUSIÓN:

El sistema inmune cumple un papel clave en la defensa contra diversas patologías y así como en las enfermedades autoinmunes (Ostroumov D *et al.*, 2018). El linfocito T, tanto el linfocito TCD8⁺ y CD4⁺, mediadores de la respuesta inmune adaptativa celular, ejecutan sus funciones mediante respuestas tanto directas, a través de la liberación de moléculas citotóxicas, como indirectas, en la modulación y coordinación de otras células inmunitarias respectivamente y con ello realizan una defensa contra diversos patógenos (Bell R *et al.*, 2016) (Tay R *et al.*, 2021)

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo (Han Y *et al.*, 2020) y por ende su estudio es primordial. Con el avance de la ciencia se ha podido descubrir algunos de sus mecanismos de ataque, de crecimiento y proliferación; y también de mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria. La investigación acerca de este hecho es amplia, se han observado diversos mecanismos incluyendo la liberación de metabolitos desde la célula tumoral al microambiente tumoral que altera respuestas de los linfocitos T, también existe una alteración del pH (Xu Y *et al.*, 2021) e inducción de muerte a células inmunitarias mediante la liberación de vesículas que contienen FAS-L (ligando de FAS) (Wieckowski E *et al.*, 2013).

Uno de los cánceres que evade la respuesta inmunitaria del linfocito T es el carcinoma de células escamosas, correspondiente a uno de los cánceres más frecuentes de los cánceres de cabeza y cuello (HNSCC), incluyendo el de la cavidad oral (OSCC). Este cáncer es más prevalente en hombres que en mujeres y cada año se estima que ocurren 3 millones de nuevos casos alrededor del mundo con una tasa de supervivencia general a los 5 años para el carcinoma oral de células escamosas (OSCC) de solo el 50% (Stasikowska-Kanicka O *et al.*,2018). Uno de los mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria en este tipo de cáncer es la existencia de un fenotipo exhausto en el linfocito T, caracterizado por la expresión de receptores inhibitorios (Curry J *et al.*,2014) (Dong Y *et al.*,2021). El fenotipo exhausto se define como un conjunto de características que hacen que una célula inmune no realice su función efectora correctamente, tales características son una baja en la proliferación, secreción de citoquinas y un alza en la expresión de receptores inhibitorios (Jiang Y *et al.*,2015) (Lim A *et al.*, 2020).

Se sabe que el metabolismo está asociado con la ejecución de la función efectora de las células inmunitarias (Scharping N *et al.*,2016) y la mitocondria, el principal organelo de los procesos metabólicos, también se ha visto alterado en el microambiente tumoral (Yu Y *et al.*,2020). Adicional, existen antecedentes de que la transferencia mitocondrial en el microambiente tumoral induce diversos

beneficios a las células tumorales, tales como la adquisición de quimiorresistencia (Pasquier J et al.,2013), un aumento en el poder tumorigénico (Dong L et al.,2017) y una mejora en la capacidad invasiva en la célula receptora (Lu J et al.,2017) (Qin Y et al.,2021). En relación con el carcinoma oral existe un estudio que indica la presencia de nanotubos tunelizados, un mecanismo de transferencia mitocondrial, en el carcinoma de células escamosas de laringe humana (LSCC), dicho estudio también indicó la presencia de mitocondrias al interior de los nanotubos (Antanavičiūtė I et al.,2014), de igual manera para el carcinoma de células escamosas orales (Zhang Z et al., 2020) y de un estudio realizado previamente se observó la presencia de proteínas mitocondriales en el secretoma del cáncer oral.

Sumando el hecho de que la transferencia mitocondrial induce un efecto positivo en la célula tumoral y el linfocito T en el microambiente tumoral se encuentra en un estado exhausto, fueron los motivos este estudio para investigar si existe conexión entre ambos factores y en efecto, en este estudio se observó que la mitocondria adicional a tener un rol metabólico también tiene un papel en la inducción de un fenotipo exhausto, esto a través de un protocolo artificial.

En primer lugar, se observó que el linfocito TCD4⁺ es una célula permisiva a la transferencia mitocondrial, utilizando una mitocondria marcada y aislada desde

una célula cancerosa de cáncer oral. Esta transferencia fue efectiva en un promedio de un 60%, porcentaje similar a otro estudio de transferencia mitocondrial hacia el linfocito T, pero utilizando una célula madre mesenquimal como célula dadora de mitocondrias (Court A *et al.*, 2020).

Ya que la transferencia en otros estudios induce varios efectos tanto en la capacidad fagocítica (Jackson M *et al.*, 2016) como en la secreción de citoquinas en la célula receptora (Court A *et al.*, 2020), en este estudio se evaluó la hipótesis si tal adquisición mitocondrial induce un efecto en el fenotipo del linfocito TCD4⁺ y en los resultados se observó que las células mitoceptadas, células que adquirieron mitocondrias, exhibieron una disminución significativa en la proliferación a diferencia de las células control, no mitoceptadas, esto medido al día 1 y 3 post-transferencia mitocondrial artificial, indicando que el hecho de adquirir una mitocondria desde una célula cancerosa de cáncer oral induce que el linfocito tenga una menor proliferación en contraste a un linfocito que no adquirió mitocondria. Esto corresponde a una de las características de un fenotipo exhausto expuesto anteriormente, y dado que al cáncer le beneficiaría que el linfocito T no proliferara, se continua con la idea de la conexión de ambos factores en el microambiente tumoral.

Dado que la otra característica de un fenotipo exhausto es la expresión moléculas de superficie inhibitorias, en este estudio se observó que células mitoceptadas, que adquieren mitocondrias, esta mitocondria induce una alza significativa en la expresión de diversas moléculas de superficie inhibitorias tales como: PD-1, TIGIT, CTLA-4, PDL-1 y Lag3 (p: 0,0088; 0,0184; 0,0299; 0,0205; 0,0232 respectivamente), indicando que tal adquisición de mitocondria influye en una de las vías de expresión de estas proteínas, induciendo así un efecto inmuno-regulador en la función efectora del linfocito TCD4⁺. Estas moléculas inhibitorias son moléculas ya conocidas en el contexto del cáncer y se han asociado a efectos negativos en los pacientes (Dong Y et al.,2021).

Dado que, estudios de transferencia inducen una alteración en la secreción de citoquinas, en este estudio se analizó el efecto de una mitocondria cancerosa de cáncer oral en la secreción de citoquinas en el linfocito TCD4⁺, en donde se observó que los linfocitos TCD4⁺ que adquieren mitocondrias desde la línea de cáncer HSC-3 les induce una disminución significativa en la secreción de 4 citoquinas, correspondientes a IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 e IL-4, citoquinas de la vía TH1 y TH2 (p: 0,0149; p: 0,0149; 0,0150; p: 0,0353 respectivamente) en comparación con el control, no mitoceptada. Este hecho indica que la mitocondria adquirida induce un efecto en alguna vía de la expresión de estas citoquinas, cumpliendo así con otra de las características de un fenotipo exhausto del

linfocito T. Las citoquinas IFN-gamma y TNF-alpha, corresponden a citoquinas citotóxicas que secretan los linfocitos T para inducir citotoxicidad hacia una célula maligna, por ende, fue lógico asociar una expresión de receptores inhibitorios con una disminución de estas citoquinas. La IL-4 e IL-10 son citoquinas de la vía TH2 asociadas a la inmunidad humoral y la producción de anticuerpos, por ende, esta transferencia podría estar asociada al mantenimiento y regulación de las respuestas inmunes del linfocito B, pero aún faltan estudios que acrediten este hecho. La IL-10 causo intriga debido a que corresponde a una citoquina antiinflamatoria que al cáncer le favorecería elevar, pero al observar esta disminución indicaría que este fenotipo exhausto no está asociado a un alza de citoquinas antiinflamatorias, sino que disminuir las citoquinas inflamatorias.

Sumando estos resultados, y al ser el primer estudio realizado en esta índole, podría indicar un nuevo mecanismo utilizado por la célula tumoral para realizar el escape inmunológico de la respuesta inmune adaptativa del linfocito TCD4⁺ a través de la inducción de este fenotipo exhausto y así permitir el crecimiento del tumor con la proliferación de las células cancerosas.

8. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES:

Por ende, sumando los resultados obtenidos se concluye que las mitocondrias tumorales de cáncer oral de la línea HSC-3 aisladas y transferidas hacia el linfocito TCD4⁺ induce en este linfocito un fenotipo exhausto con características de un alza en la expresión de moléculas de superficie inhibitorias, una baja en la proliferación y en la secreción de citoquinas inflamatorias comprobando así la hipótesis de este trabajo de investigación. Este hecho indicaría el primer estudio en esta índole y al ser un estudio por medios artificiales, aún faltan estudios que acrediten este hecho a través de sistemas de co-cultivo y con ello identificar el posible mecanismo de transferencia utilizado y así afirmar que el cáncer utiliza este método para realizar el escape inmunológico.

9. GLOSARIO:

HSCC: carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello

SCC: carcinoma de células escamosas

OSCC: carcinoma de células escamosas orales

NK: célula asesina natural

CTL: linfocito T citotóxico

ADCC: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

T regs: Linfocitos T reguladores

CD: célula dendrítica

PBMC: células mononucleares de sangre periférica

TNF- α : factor de necrosis tumoral α

IFN- γ : interferón- γ

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

APC: células presentadoras de antígeno profesionales

CAF: fibroblastos asociados a cáncer

TME: microambiente tumoral

CSC: células madre de cáncer

VEGF: El factor de crecimiento endotelial vascular

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

MDSC: células supresoras derivada de mieloides

TILs: linfocitos infiltrantes de tumores

TOX: La proteína de caja de grupo de alta movilidad asociada a la selección de timocitos

NFAT: factor nuclear de las células T activadas

LAG-3: proteína del gen de activación de linfocitos 3

CTLA-4: antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos

PD-1: proteína de muerte celular programada 1

TIM-3: inmunoglobulina de células T que contiene dominio de mucina-3

IL: interleuquina

SG: supervivencia general

DFS: supervivencia libre de enfermedad

OXPHOS: fosforilación oxidativa

FAO: oxidación de ácidos grasos

OCR: tasa de consumo de oxígeno

ECAR: tasa de acidificación extracelular

ETC: cadena de transporte de electrones

MTG: MitoTrackerGreen

MDR: mitotracker Deep Red

TMRM:

ROS: especies reactivas de oxígeno

10. BIBLIOGRAFÍA:

Abbas, Lichtman, Pillai, (2012). *Inmunología Celular y Molecular*. 7ª Edición, (558)

Ahmadzadeh, M., Johnson, L. A., Heemskerk, B., Wunderlich, J. R., Dudley, M. E., White, D. E., & Rosenberg, S. A. (2009). Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*, 114(8), 1537–1544. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-195792>

Ahmadzadeh, M., Johnson, L. A., Heemskerk, B., Wunderlich, J. R., Dudley, M. E., White, D. E., & Rosenberg, S. A. (2009). Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*, 114(8), 1537–1544. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-195792>

Amitrano, A. M., Berry, B. J., Lim, K., Kim, K. D., Waugh, R. E., Wojtovich, A. P., & Kim, M. (2021). Optical Control of CD8+ T Cell Metabolism and Effector Functions. *Frontiers in immunology*, 12, 666231. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.666231>

Angajala, A., Lim, S., Phillips, J. B., Kim, J. H., Yates, C., You, Z., & Tan, M. (2018). Diverse Roles of Mitochondria in Immune Responses: Novel Insights Into Immuno-Metabolism. *Frontiers in immunology*, 9, 1605. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01605>

Antanavičiūtė, I., Rysevaitė, K., Liutkevičius, V., Marandykina, A., Rimkutė, L., Sveikalienė, R., Uloza, V., & Skeberdis, V. A. (2014). Long-distance

communication between laryngeal carcinoma cells. PloS one, 9(6), e99196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099196>

Bardhan, K., Anagnostou, T., & Boussiotis, V. A. (2016). The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Frontiers in immunology*, 7, 550. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00550>

Beckermann, K. E., Dudzinski, S. O., & Rathmell, J. C. (2017). Dysfunctional T cell metabolism in the tumor microenvironment. *Cytokine & growth factor reviews*, 35, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2017.04.003>

Bell, R. B., Leidner, R. S., Crittenden, M. R., Curti, B. D., Feng, Z., Montler, R., ... Urba, W. J. (2016). OX40 signaling in head and neck squamous cell carcinoma: Overcoming immunosuppression in the tumor microenvironment. *Oral Oncology*, 52, 1–10. doi:10.1016/j.oraloncology.2015.1

Buck, M. D., O'Sullivan, D., Klein Geltink, R. I., Curtis, J. D., Chang, C. H., Sanin, D. E., Qiu, J., Kretz, O., Braas, D., van der Windt, G. J., Chen, Q., Huang, S. C., O'Neill, C. M., Edelson, B. T., Pearce, E. J., Sesaki, H., Huber, T. B., Rambold, A. S., & 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>

Caicedo, A., Fritz, V., Brondello, J. M., Ayala, M., Dennemont, I., Abdellaoui, N., de Fraipont, F., Moisan, A., Prouteau, C. A., Boukhaddaoui, H., Jorgensen, C., & Vignais, M. L. (2015). MitoCeption as a new tool to assess the effects of mesenchymal stem/stromal cell mitochondria on cancer cell metabolism and function. *Scientific reports*, 5, 9073. <https://doi.org/10.1038/srep09073>

Catakovic, K., Klieser, E., Neureiter, D., & Geisberger, R. (2017). T cell exhaustion: from pathophysiological basics to tumor immunotherapy. *Cell*

communication and signaling : CCS, 15(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s12964-016-0160-z>

Chauvin, J. M., & Zarour, H. M. (2020). TIGIT in cancer immunotherapy. *Journal for immunotherapy of cancer*, 8(2), e000957. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-000957>

Chen, S., Wainwright, D. A., Wu, J. D., Wan, Y., Matei, D. E., Zhang, Y., & Zhang, B. (2019). CD73: an emerging checkpoint for cancer immunotherapy. *Immunotherapy*, 11(11), 983–997. <https://doi.org/10.2217/imt-2018-0200>

Court, A. C., Le-Gatt, A., Luz-Crawford, P., Parra, E., Aliaga-Tobar, V., Bátiz, L. F., Contreras, R. A., Ortúzar, M. I., Kurte, M., Elizondo-Vega, R., Maracaja-Coutinho, V., Pino-Lagos, K., Figueroa, F. E., & Khoury, M. (2020). Mitochondrial transfer from MSCs to T cells induces Treg differentiation and restricts inflammatory response. *EMBO reports*, 21(2), e48052. <https://doi.org/10.15252/embr.201948052>

Curry, J. M., Sprandio, J., Cognetti, D., Luginbuhl, A., Bar-ad Voichita, Pribitkin, E., & Tuluc, M. (2014). Tumor Microenvironment in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Seminars in Oncology*, 41(2), 217–234. doi:10.1053/j.seminoncol.2014.03.

Dong, L. F., Kovarova, J., Bajzikova, M., Bezawork-Geleta, A., Svec, D., Endaya, B., Sachaphibulkij, K., Coelho, A. R., Sebkova, N., Ruzickova, A., Tan, A. S., Kluckova, K., Judasova, K., Zamecnikova, K., Rychtarcikova, Z., Gopalan, V., Andera, L., Sobol, M., Yan, B., Pattnaik, B., ... Neuzil, J. (2017). Horizontal transfer of whole mitochondria restores tumorigenic potential in mitochondrial DNA-deficient cancer cells. *eLife*, 6, e22187. <https://doi.org/10.7554/eLife.22187>

Dong, Y., Wang, Z., Mao, F., Cai, L., Dan, H., Jiang, L., Zeng, X., Li, T., Zhou, Y., & Chen, Q. (2021). PD-1 blockade prevents the progression of oral carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 42(6), 891–902. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgab035>

Farhood, B., Najafi, M., & Mortezaee, K. (2018). CD8+ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. *Journal of Cellular Physiology*. doi:10.1002/jcp.27782

Fu, Z. M., Zhang, D. J., Guo, Y. Y., Han, S., Guo, F., Bai, J., Wan, Y. N., Guan, G. F., Sun, K. W., & Yang, N. (2022). Expression of PD-L1 and CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes predict survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular and clinical oncology*, 16(3), 59. <https://doi.org/10.3892/mco.2022.2492>

Fujita, Y., Yoshioka, Y., & Ochiya, T. (2016). Extracellular vesicle transfer of cancer pathogenic components. *Cancer science*, 107(4), 385–390. <https://doi.org/10.1111/cas.12896>

Gros, A., Robbins, P. F., Yao, X., Li, Y. F., Turcotte, S., Tran, E., Wunderlich, J. R., Mixon, A., Farid, S., Dudley, M. E., Hanada, K., Almeida, J. R., Darko, S., Douek, D. C., Yang, J. C., & Rosenberg, S. A. (2014). PD-1 identifies the patient-specific CD8⁺ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *The Journal of clinical investigation*, 124(5), 2246–2259. <https://doi.org/10.1172/JCI73639>

Han, J., Li, Q., Chen, Y., & Yang, Y. (2021). Recent Metabolomics Analysis in Tumor Metabolism Reprogramming. *Frontiers in molecular biosciences*, 8, 763902. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.763902>

Han, Y., Liu, D., & Li, L. (2020). PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *American journal of cancer research*, 10(3), 727–742.

Hayakawa, K., Esposito, E., Wang, X., Terasaki, Y., Liu, Y., Xing, C., Ji, X., & Lo, E. H. (2016). Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature*, 535(7613), 551–555. <https://doi.org/10.1038/nature18928>

Hough, K. P., Trevor, J. L., Strenkowski, J. G., Wang, Y., Chacko, B. K., Tousif, S., Chanda, D., Steele, C., Antony, V. B., Dokland, T., Ouyang, X., Zhang, J., Duncan, S. R., Thannickal, V. J., Darley-Usmar, V. M., & Deshane, J. S. (2018). Exosomal transfer of mitochondria from airway myeloid-derived regulatory cells to T cells. *Redox biology*, 18, 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.06.009>

Ishii, N., Takahashi, T., Soroosh, P., & Sugamura, K. (2010). OX40–OX40 Ligand Interaction in T-Cell-Mediated Immunity and Immunopathology. *Advances in Immunology*, 63–98. doi:10.1016/s0065-2776(10)05003-0

Jackson, M. V., Morrison, T. J., Doherty, D. F., McAuley, D. F., Matthay, M. A., Kissenpfennig, A., O'Kane, C. M., & Krasnodembskaya, A. D. (2016). Mitochondrial Transfer via Tunneling Nanotubes is an Important Mechanism by Which Mesenchymal Stem Cells Enhance Macrophage Phagocytosis in the In Vitro and In Vivo Models of ARDS. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 34(8), 2210–2223. <https://doi.org/10.1002/stem.2372>

Jiang, Y., Li, Y., & Zhu, B. (2015). T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell death & disease*, 6(6), e1792. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.162>

Johnson, D. E., Burtneess, B., Leemans, C. R., Lui, V., Bauman, J. E., & Grandis, J. R. (2020). Head and neck squamous cell carcinoma. *Nature reviews. Disease primers*, 6(1), 92. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00224-3>

Judge, A., & Dodd, M. S. (2020). Metabolism. *Essays in biochemistry*, 64(4), 607–647. <https://doi.org/10.1042/EBC20190041>

Kalyanaraman B. (2017). Teaching the basics of cancer metabolism: Developing antitumor strategies by exploiting the differences between normal and cancer cell metabolism. *Redox biology*, 12, 833–842. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.018>

Lim, A. R., Rathmell, W. K., & Rathmell, J. C. (2020). The tumor microenvironment as a metabolic barrier to effector T cells and immunotherapy. *eLife*, 9, e55185. <https://doi.org/10.7554/eLife.55185>

Lim, K. P., Chun, N. A., Ismail, S. M., Abraham, M. T., Yusoff, M. N., Zain, R. B., Ngeow, W. C., Ponniah, S., & Cheong, S. C. (2014). CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low} regulatory T cells are increased in oral squamous cell carcinoma patients. *PloS one*, 9(8), e103975. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103975>

Lipp, J. J., Wang, L., Yang, H., Yao, F., Harrer, N., Müller, S., Berezowska, S., Dorn, P., Marti, T. M., Schmid, R. A., Hegedüs, B., Souabni, A., Carotta, S., Pearson, M. A., Sommergruber, W., Kocher, G. J., & Hall, S. (2022). Functional and molecular characterization of PD1⁺ tumor-infiltrating lymphocytes from lung cancer patients. *Oncoimmunology*, 11(1), 2019466. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2021.2019466>

Liu, J., Wu, S., Zheng, X. et al. Immune suppressed tumor microenvironment by exosomes derived from gastric cancer cells via modulating immune functions. *Sci Rep* 10, 14749 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71573-y>

Lu, J., Zheng, X., Li, F., Yu, Y., Chen, Z., Liu, Z., Wang, Z., Xu, H., & Yang, W. (2017). Tunneling nanotubes promote intercellular mitochondria transfer

followed by increased invasiveness in bladder cancer cells. *Oncotarget*, 8(9), 15539–15552. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14695>

Luz-Crawford, P., Hernandez, J., Djouad, F., Luque-Campos, N., Caicedo, A., Carrère-Kremer, S., Brondello, J. M., Vignais, M. L., Pène, J., & Jorgensen, C. (2019). Mesenchymal stem cell repression of Th17 cells is triggered by mitochondrial transfer. *Stem cell research & therapy*, 10(1), 232. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1307-9>

Ma, J., Zheng, B., Goswami, S., Meng, L., Zhang, D., Cao, C., Li, T., Zhu, F., Ma, L., Zhang, Z., Zhang, S., Duan, M., Chen, Q., Gao, Q., & Zhang, X. (2019). PD1Hi CD8+ T cells correlate with exhausted signature and poor clinical outcome in hepatocellular carcinoma. *Journal for immunotherapy of cancer*, 7(1), 331. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0814>

Maimela, N. R., Liu, S., & Zhang, Y. (2019). Fates of CD8+ T cells in Tumor Microenvironment. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 1–13. doi:10.1016/j.csbj.2018.11.004

McLane, L. M., Abdel-Hakeem, M. S., & Wherry, E. J. (2015). CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. *Annual Review of Immunology*, 37(1). doi:10.1146/annurev-immunol-041015-055318

Morrison, T. J., Jackson, M. V., Cunningham, E. K., Kissenpfennig, A., McAuley, D. F., O'Kane, C. M., & Krasnodembskaya, A. D. (2017). Mesenchymal Stromal Cells Modulate Macrophages in Clinically Relevant Lung Injury Models by Extracellular Vesicle Mitochondrial Transfer. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 196(10), 1275–1286. <https://doi.org/10.1164/rccm.201701-0170OC>

Muller, L., Mitsuhashi, M., Simms, P., Gooding, W. E., & Whiteside, T. L. (2016). Tumor-derived exosomes regulate expression of immune function-

related genes in human T cell subsets. *Scientific reports*, 6, 20254. <https://doi.org/10.1038/srep20254>

Oestreich, K. J., Yoon, H., Ahmed, R., & Boss, J. M. (2008). NFATc1 regulates PD-1 expression upon T cell activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(7), 4832–4839. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.7.4832>

Olguín, J. E., Medina-Andrade, I., Molina, E., Vázquez, A., Pacheco-Fernández, T., Saavedra, R., Pérez-Plasencia, C., Chirino, Y. I., Vaca-Paniagua, F., Arias-Romero, L. E., Gutierrez-Cirlos, E. B., León-Cabrera, S. A., Rodriguez-Sosa, M., & Terrazas, L. I. (2018). Early and Partial Reduction in CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells during Colitis-Associated Colon Cancer Induces CD4+ and CD8+ T Cell Activation Inhibiting Tumorigenesis. *Journal of Cancer*, 9(2), 239–249. <https://doi.org/10.7150/jca.21336>

Pang, Y., Zhang, C., & Gao, J. (2021). Macrophages as Emerging Key Players in Mitochondrial Transfers. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 747377. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.747377>

Pardoll D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews. Cancer*, 12(4), 252–264. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>

Pasquier, J., Guerrouahen, B. S., Al Thawadi, H., Ghiabi, P., Maleki, M., Abu-Kaoud, N., Jacob, A., Mirshahi, M., Galas, L., Rafii, S., Le Foll, F., & Rafii, A. (2013). Preferential transfer of mitochondria from endothelial to cancer cells through tunneling nanotubes modulates chemoresistance. *Journal of translational medicine*, 11, 94. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-94>

Pauken, K. E., & Wherry, E. J. (2015). Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends in immunology*, 36(4), 265–276. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.02.008>

Qin, Y., Jiang, X., Yang, Q., Zhao, J., Zhou, Q., & Zhou, Y. (2021). The Functions, Methods, and Mobility of Mitochondrial Transfer Between Cells. *Frontiers in oncology*, 11, 672781. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.672781>

Rangel Rivera, G. O., Knochelmann, H. M., Dwyer, C. J., Smith, A. S., Wyatt, M. M., Rivera-Reyes, A. M., Thaxton, J. E., & Paulos, C. M. (2021). Fundamentals of T Cell Metabolism and Strategies to Enhance Cancer Immunotherapy. *Frontiers in immunology*, 12, 645242. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.645242>

Raphael, I., Joern, R. R., & Forsthuber, T. G. (2020). Memory CD4+ T Cells in Immunity and Autoimmune Diseases. *Cells*, 9(3), 531. <https://doi.org/10.3390/cells9030531>

Ribas, A., & Wolchok, J. D. (2018). Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science (New York, N.Y.)*, 359(6382), 1350–1355. <https://doi.org/10.1126/science.aar4060>

Romero-Garcia, S., Lopez-Gonzalez, J. S., Báez-Viveros, J. L., Aguilar-Cazares, D., & Prado-Garcia, H. (2011). Tumor cell metabolism: an integral view. *Cancer biology & therapy*, 12(11), 939–948. <https://doi.org/10.4161/cbt.12.11.18140>

Sahinbegovic, H., Jelinek, T., Hrdinka, M., Bago, J. R., Turi, M., Sevcikova, T., ... Simicek, M. (2020). Intercellular Mitochondrial Transfer in the Tumor Microenvironment. *Cancers*, 12(7), 1787. doi:10.3390/cancers12071787

Salmaninejad, A., Valilou, S. F., Shabgah, A. G., Aslani, S., Alimardani, M., Pashdar, A., & Sahebkar, A. (2019). PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy. *Journal of Cellular Physiology*. doi:10.1002/jcp.28358

Scharping, N. E., Menk, A. V., Moreci, R. S., Whetstone, R. D., Dadey, R. E., Watkins, S. C., Ferris, R. L., & Delgoffe, G. M. (2016). The Tumor Microenvironment Represses T Cell Mitochondrial Biogenesis to Drive Intratumoral T Cell Metabolic Insufficiency and Dysfunction. *Immunity*, 45(2), 374–388. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.07.009>

Sena, L. A., Li, S., Jairaman, A., Prakriya, M., Ezponda, T., Hildeman, D. A., Wang, C. R., Schumacker, P. T., Licht, J. D., Perlman, H., Bryce, P. J., & Chandel, N. S. (2013). Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling. *Immunity*, 38(2), 225–236. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.10.020>

Shanmughapriya, S., Langford, D., & Natarajaseenivasan, K. (2020). Inter and Intracellular mitochondrial trafficking in health and disease. *Ageing research reviews*, 62, 101128. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101128>

Stasikowska-Kanicka, O., Wągrowaska-Danilewicz, M., & Danilewicz, M. (2018). Immunohistochemical Analysis of Foxp3+, CD4+, CD8+ Cell Infiltrates and PD-L1 in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Pathology oncology research : POR*, 24(3), 497–505. <https://doi.org/10.1007/s12253-017-0270-y>

Sugiura, A., & Rathmell, J. C. (2018). Metabolic Barriers to T Cell Function in Tumors. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 200(2), 400–407. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701041>

Szajnik, M., Czystowska, M., Szczepanski, M. J., Mandapathil, M., & Whiteside, T. L. (2010). Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg). *PloS one*, 5(7), e11469. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011469>

Takenaga, K., Koshikawa, N., & Nagase, H. (2021). Intercellular transfer of mitochondrial DNA carrying metastasis-enhancing pathogenic mutations from high- to low-metastatic tumor cells and stromal cells via extracellular vesicles. *BMC molecular and cell biology*, 22(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s12860-021-00391-5>

Tang, S., Ning, Q., Yang, L., Mo, Z., & Tang, S. (2020). Mechanisms of immune escape in the cancer immune cycle. *International Immunopharmacology*, 86, 106700. doi:10.1016/j.intimp.2020.106700

Tay, R. E., Richardson, E. K., & Toh, H. C. (2021). Revisiting the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy-new insights into old paradigms. *Cancer gene therapy*, 28(1-2), 5–17. <https://doi.org/10.1038/s41417-020-0183-x>

Tkachev, V., Goodell, S., Opipari, A. W., Hao, L. Y., Franchi, L., Glick, G. D., Ferrara, J. L., & Byersdorfer, C. A. (2015). Programmed death-1 controls T cell survival by regulating oxidative metabolism. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 194(12), 5789–5800. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402180>

Topalian, S. L., Taube, J. M., Anders, R. A., & Pardoll, D. M. (2016). Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nature reviews. Cancer*, 16(5), 275–287. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.36>

Torrallba, D., Baixauli, F., & Sánchez-Madrid, F. (2016). Mitochondria Know No Boundaries: Mechanisms and Functions of Intercellular Mitochondrial Transfer. *Frontiers in cell and developmental biology*, 4, 107. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00107>

Valenti, D., Vacca, R. A., Moro, L., & Atlante, A. (2021). Mitochondria Can Cross Cell Boundaries: An Overview of the Biological Relevance, Pathophysiological Implications and Therapeutic Perspectives of Intercellular Mitochondrial Transfer. *International journal of molecular sciences*, 22(15), 8312. <https://doi.org/10.3390/ijms22158312>Whitehall, JC, Greaves, LC Aberrant mitochondrial function in aging and cancer. *Biogerontology* 21, 445–459 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10522-019-09853-y>

Wang, J., Liu, X., Qiu, Y., Shi, Y., Cai, J., Wang, B., Wei, X., Ke, Q., Sui, X., Wang, Y., Huang, Y., Li, H., Wang, T., Lin, R., Liu, Q., & Xiang, A. P. (2018). Cell adhesion-mediated mitochondria transfer contributes to mesenchymal stem cell-induced chemoresistance on T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Journal of hematology & oncology*, 11(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0554-z>

Wang, Y. A., Li, X. L., Mo, Y. Z., Fan, C. M., Tang, L., Xiong, F., Guo, C., Xiang, B., Zhou, M., Ma, J., Huang, X., Wu, X., Li, Y., Li, G. Y., Zeng, Z. Y., & Xiong, W. (2018). Effects of tumor metabolic microenvironment on regulatory T cells. *Molecular cancer*, 17(1), 168. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0913-y>

Weixler, B., Cremonesi, E., Sorge, R., Muraro, M. G., Delko, T., Nebiker, C. A., Däster, S., Governa, V., Amicarella, F., Soysal, S. D., Kettelhack, C., von Holzen, U. W., Eppenberger-Castori, S., Spagnoli, G. C., Oertli, D., Iezzi, G., Terracciano, L., Tornillo, L., Sconocchia, G., & Droeser, R. A. (2015). OX40 expression enhances the prognostic significance of CD8 positive lymphocyte infiltration in colorectal cancer. *Oncotarget*, 6(35), 37588–37599. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5940>

Whitehall, JC, Greaves, LC Aberrant mitochondrial function in aging and cancer. *Biogerontology* 21, 445–459 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10522-019-09853-y>

Wieckowski, E. U., Visus, C., Szajnik, M., Szczepanski, M. J., Storkus, W. J., & Whiteside, T. L. (2009). Tumor-derived microvesicles promote regulatory T cell expansion and induce apoptosis in tumor-reactive activated CD8⁺ T lymphocytes. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 183(6), 3720–3730. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900970>

Xia, L., Oyang, L., Lin, J., Tan, S., Han, Y., Wu, N., Yi, P., Tang, L., Pan, Q., Rao, S., Liang, J., Tang, Y., Su, M., Luo, X., Yang, Y., Shi, Y., Wang, H., Zhou, Y., & Liao, Q. (2021). The cancer metabolic reprogramming and immune response. *Molecular cancer*, 20(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01316-8>

Xu, Y., He, L., Fu, Q., & Hu, J. (2021). Metabolic Reprogramming in the Tumor Microenvironment With Immunocytes and Immune Checkpoints. *Frontiers in oncology*, 11, 759015. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.759015>

Yang, C., Endoh, M., Tan, D. Q., Nakamura-Ishizu, A., Takihara, Y., Matsumura, T., & Suda, T. (2021). Mitochondria transfer from early stages of erythroblasts to their macrophage niche via tunnelling nanotubes. *British Journal of Haematology*, 193(6), 1260–1274. doi:10.1111/bjh.17531

Yu, Y.-R., Imrichova, H., Wang, H., Chao, T., Xiao, Z., Gao, M., ... Ho, P.-C. (2020). Disturbed mitochondrial dynamics in CD8⁺ TILs reinforce T cell exhaustion. *Nature Immunology*. doi:10.1038/s41590-020-0793-3

Zampieri, L. X., Silva-Almeida, C., Rondeau, J. D., & Sonveaux, P. (2021). Mitochondrial Transfer in Cancer: A Comprehensive Review. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 3245. <https://doi.org/10.3390/ijms22063245>

Zhang, Z., Gao, Z., Rajthala, S., Sapkota, D., Dongre, H., Parajuli, H., Suliman, S., Das, R., Li, L., Bindoff, L. A., Costea, D. E., & Liang, X. (2020). Metabolic

reprogramming of normal oral fibroblasts correlated with increased glycolytic metabolism of oral squamous cell carcinoma and precedes their activation into carcinoma associated fibroblasts. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 77(6), 1115–1133. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03209-y>

11. ANEXO:

11.1 Anexo n°1: fórmula para el conteo de células a través de la cámara de neubauer:

n°células

= Factor de dilución (10) x 10(factor de la cámara de neubauer 1000µl (PBS) x células contadas

11.2 Anexo n°2: manejo de residuos biológicos:

Todas las muestras biológicas y material con el cual tuvo contacto la muestra, utilizados a lo largo del estudio serán eliminados a través del plan de manejo de sustancias y residuos peligrosos de la Universidad de Concepción (MATPEL), en el depósito dispuesto para ese fin en el departamento de Bioquímica Clínica e inmunología, cuya fotografía se adjunta a continuación.



Ilustración 17: Depósito de desechos biológicos, Departamento de bioquímica clínica e inmunología, Universidad de Concepción.

11.3 Anexo n°3: documento de proyecto aceptado por el comité de ética, bioética y bioseguridad de la Universidad de Concepción.

Este trabajo forma parte de un proyecto de investigación el cual fue aprobado por el comité de ética, bioética y bioseguridad de la universidad de Concepción, se adjunta foto parte del documento.



Universidad de Concepción
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo
Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad

Considerando que el **PROYECTO N° 1211480** titulado **"STUDY OF THE METABOLIC REPROGRAMING OF EFFECTOR CD4+T CELLS BY MITOCHONDRIA TRANSFER IN ORAL CANCER AND ITS EFFECT UPON T HELPER AND T-DEPENDENT B CELL RESPONSES."**, postulado al **CONCURSO FONDECYT REGULAR 2021** por la **DRA. ESTEFANIA ANDREA NOVA LAMPERTI**, cumple con la Ley N° 20.380, sobre Protección de Animales, con el Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados (CONICYT-FONDECYT, 2018), adoptado por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo - ANID, con el Reglamento de Manejo de Residuos Peligrosos de la Vicerrectoría de Asuntos Económicos y Administrativos de la Universidad de Concepción y su respectivo Plan de Manejo de Sustancias y Residuos Peligrosos (MATPEL), así también con los principios y normas obligatorias delineadas con base en la Declaración de Singapur sobre la Integridad en la Investigación (2010) para investigadores de proyectos CONICYT, (conforme lo establecido por la Res. Exenta N° 157, del 24 de enero de 2013) y no muestra elementos que puedan transgredir las normas y principios éticos rectores de nuestra Institución Universitaria, este Comité resuelve aprobarlo, confiriendo el presente Certificado.

DRA. M. ANDREA RODRÍGUEZ TASTETS
PRESIDENTA

COMITÉ DE ÉTICA, BIOÉTICA Y BIOSEGURIDAD
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN



Ilustración 18: Documento de aprobación del comité de ética, bioética y bioseguridad de la universidad de Concepción.