



Universidad de Concepción
Facultad Farmacia

**TRANSFERENCIA MITOCONDRIAL NATURAL
DESDE CÉLULAS HSC-3 HACIA LINFOCITOS T
CD4⁺: EVALUACIÓN DE MECANISMOS,
REGULACIÓN DE PD-1 Y ANÁLISIS PROTEÓMICO
EN CÁNCER ORAL**

POR SOLANGE ESTEFANIA CISTERNA VERGARA

Tesis presentada en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al título profesional de Bioquímica

Profesor Guía: Estefanía Nova Lamperti
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía:
Mauricio Hernández
Instituto Melisa

Abril, 2025
Concepción, Chile

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

ii. DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a quienes me han apoyado sobre todo en este camino, a mi familia, por su amor incondicional; a mis amistades, por su compañía, y por sobre todo a mi novio Luciano y mi madre Johanna, sin quienes no habría logrado superar los desafíos que se presentaron en esta hermosa etapa.

iii. AGRAECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profunda gratitud a todas las personas que hicieron posible esta etapa tan significativa en mi vida. A mi profesora guía, Estefania Nova-Lamperti, por su compromiso, dedicación y paciencia en cada paso de este proceso. Gracias por guiarme con tanto profesionalismo y cercanía, y por confiar en mí incluso en los momentos más inciertos. A mis compañeros de laboratorio, Romina y Sergio, por su apoyo constante, por compartir conmigo tantas horas de experimentos. Su ayuda fue invaluable. A todas las personas que donaron sangre para que este proyecto pudiera llevarse a cabo. En especial, a Tania y Camila, quienes con generosidad se convirtieron en el banco de sangre que hizo posible los ensayos. Gracias por su enorme disposición y solidaridad. A los profesores y colegas que, con su eterna buena voluntad, me enseñaron y explicaron con paciencia cada nuevo protocolo. Su vocación docente ha sido una inspiración. A mi madre, mi pilar, quien hizo posible este camino al apoyarme en todos los sentidos. Gracias por tu amor incondicional, por sostenerme cuando sentí que no podía más, y por confiar en mí como solo una madre sabe hacerlo. Y a mi novio, por ser mi refugio. Gracias por tu inagotable paciencia al escuchar mis quejas, por la dulzura con la que me consolaste cuando todo salía mal, y por preocuparte

siempre por mi bienestar. Tu presencia fue mi alivio y tu cariño, mi energía. A todos ustedes, gracias desde lo más profundo de mi corazón. Este logro también es suyo.

iv. TABLA DE CONTENIDOS

ii. DEDICATORIA.....	3
iii. AGRAECIMIENTOS.....	4
iv. TABLA DE CONTENIDOS	6
v. INDICE DE FIGURAS.....	8
vi. INDICE DE TABLAS	10
vii. RESUMEN.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	13
Cáncer oral	13
El microambiente tumoral (TME)	15
Respuesta inmune adaptativa: Linfocitos T.....	18
Respuesta antitumoral mediada por linfocitos T	19
Efecto del cáncer sobre la respuesta antitumoral mediada por linfocitos T	20
Mitocondria en cáncer.....	23
Dinámica mitocondrial.....	26
Transferencia de elementos celulares.....	27
Transferencia mitocondrial.....	29
Inductores de transferencia mitocondrial.....	32
En resumen	34
2. HIPOTESIS.....	35
3. OBJETIVO GENERAL.....	36
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
5. MATERIALES Y MÉTODO	37
5.1 Evaluar la transferencia mitocondrial natural dependiente e independiente de contacto desde células HSC-3 hacia los linfocitos T CD4 ⁺	37

5.1.1 Co-cultivo de células HSC-3 y linfocitos T CD4 ⁺ para la evaluación de la transferencia mitocondrial natural dependiente de contacto.	39
5.1.2 Evaluar la transferencia mitocondrial natural independiente de contacto desde células HSC-3 hacia los linfocitos T CD4 ⁺	40
5.1.3 Analizar el efecto de estimuladores sobre la transferencia mitocondrial natural dependiente de contacto desde células HSC-3 hacia los linfocitos T CD4 ⁺	41
5.1.4 Analizar el efecto de inhibidores sobre la transferencia mitocondrial natural.....	42
5.2 Determinar la expresión de PD-1 en linfocitos T posterior a transferencia mitocondrial natural desde células HSC-3 hacia los linfocitos T CD4 ⁺	44
5.3 Analizar la expresión de proteínas asociadas a mecanismos de transferencia mitocondrial natural dependiente e independiente de contacto en secretoma de biopsias de cáncer oral.....	45
6. RESULTADOS	50
6.1 Evaluar la transferencia mitocondrial natural dependiente e independiente de contacto desde células HSC-3 hacia los linfocitos T CD4 ⁺	50
6.1.1 Transferencia mitocondrial en sistema de cocultivo	50
6.1.2 Transferencia mitocondrial en sistema de cocultivo-Transwell ...	52
6.1.3 Estimuladores de la transferencia mitocondrial sistema de cocultivo	54
6.1.4 Inhibidores de la transferencia mitocondrial en sistema de cocultivo	56
6.3 Evaluar la expresión diferencial de proteínas asociadas a mecanismos de transferencia mitocondrial en base de datos proteómicos obtenidos de secretoma de biopsias de cáncer oral y biopsias orales sin cáncer.....	59
7. DISCUSIÓN	65
8- CARTA GANTT	80
9. BIBLIOGRAFIA	81
12. ANEXOS	97
a. Manejo de residuos	97
b. Consentimiento informado	97

v. INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Tipos de lesiones de la cavidad oral en cáncer, presencia de úlceras irregulares o profundas en la lengua, labios, paladar duro, entre otros. 15
- Figura 2. Representación del microambiente tumoral, con presencia de células propias del tejido y células del sistema inmune que participan en la patogénesis del proceso neoplásico..... 17
- Figura 3. Presentación antigénica entre una célula presentadora de antígenos profesional y un linfocito T. Interacción entre el complejo mayor de histocompatibilidad y TCR, con ayuda de la presencia de moléculas coestimuladoras: IL-2, CD40/CD40L, CD80/CD28. 19
- Figura 4. Interacción linfocito T-célula cancerígena en el microambiente tumoral, la célula cancerígena sobre expresa el ligando del receptor PD-1 e inhibe la activación y expansión clonal del linfocito T. 23
- Figura 5. Alteraciones en mitocondria de célula cancerígena, disminución de la estabilidad y funcionalidad mitocondrial. 25
- Figura 6. Mecanismos de transferencia mitocondrial, generación estructuras membranosas, conexinas, además de la extrusión de mitocondrias hacia compartimientos extracelulares y captación por parte de una célula receptora. 29
- Figura 7. Transferencia de mitocondrias desde células HSC-3 a linfocitos T CD4⁺ en sistema de cocultivo.
- Figura 8 Transferencia de mitocondrias desde células HSC-3 a linfocitos T CD4⁺ en sistema Transwell
- Figura 9 Efecto de biomoléculas sobre la transferencia de mitocondrias desde células HSC-3 a linfocitos T CD4⁺.
- Figura 10 Efecto de inhibidores sobre transferencia mitocondrial desde células HSC-3 hacia linfocitos T CD4⁺.
- Figura 11 Expresión de PD-1 en linfocitos T CD4⁺ post cocultivo con células HSC-3.

Figura 12 Análisis de vías y mecanismos asociados a la transferencia mitocondrial y procesos celulares relacionados.

vi. INDICE DE TABLAS

Tabla I. Estímulos utilizados para el favorecimiento de la transferencia mitocondrial.....	42
Tabla II. Inhibidores utilizados para la determinación del mecanismo de transferencia mitocondrial. CytoB inhibidor de nanotubos, 3-MA inhibidor de la autofagia (extrusión), GW4869 inhibidor de microvesículas.....	43
Tabla III. Vías de señalización asociadas a mecanismos de transferencia mediada por nanotubos.....	61
Tabla IV. Vías de señalización asociadas a mecanismos de transferencia mediada por microvesículas.....	61
Tabla V. Vías de señalización asociadas a mecanismos de transferencia mediada por uniones estrechas.....	62
Tabla VI. Vías de señalización asociadas a mecanismos de transferencia mediada extrusión.....	63

vii. RESUMEN

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es el tipo de cáncer oral más frecuente en Chile y el mundo. COCE es un cancer de alta mortalidad, y se ha visto que es capaz de modular la respuesta anti-tumoral por un mecanismo dependiente de la transferencia mitocondrial (She, Z *et al*, 2021). En este contexto, se ha observado la inducción de linfocitos T CD4⁺ exhaustos al transferir mitocondrias artificialmente desde células cancerosas por medio de un protocolo denominado MitoCeption. Sin embargo, a la fecha no se conoce el mecanismo natural por el cual las células cancerígenas son capaces de transferir mitocondrias. El objetivo del presente trabajo es analizar el o los mecanismo de transferencia mitocondrial natural desde células de carcinoma oral de células escamosas HSC-3 hacia linfocitos T CD4⁺, y los efectos de esta transferencia sobre la célula T. Con este fin, se evaluó la transferencia mitocondrial natural de mitocondrias en un sistema de co-cultivo (dependiente de contacto) o mediante Transwell (independiente de contacto), además de la presencia y ausencia de estimuladores de la transferencia e inhibidores de nanotúbulos (CytoB), microvesículas (GW4869), y autofagia (3-MA). La transferencia mitocondrial se evaluó mediante la detección por citometría de flujo de mitocondrias marcadas

con MitoTracker Red. Además, se evaluó la inducción de PD-1 en linfocitos T CD4⁺ posterior a la transferencia. Finalmente, se analizó la presencia de proteínas asociadas a mecanismos de transferencia en el secretoma de biopsias de pacientes con COCE. Como resultado se obtuvo que la transferencia de mitocondrias dependiente de contacto entre células posee una mayor contribución que la transferencia independiente de contacto. Por otro lado, se observó un aumento en la expresión de PD-1 en los linfocitos T CD4⁺ que adquirieron mitocondrias desde células HSC-3. También se determinó la presencia de diversas proteínas en el secretoma de biopsias de COCE, las cuales se asocian a mecanismos de transferencias mediado por nanotubos, vesículas extracelulares, conexinas y extrusión. De todas estas vías, la que parece contribuir en mayor proporción son la generación de nanotubos debido a los resultados obtenidos de los co-cultivos, y por la alta presencia de proteínas asociadas a este mecanismo en el secretoma.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las patologías más estudiadas a nivel mundial, sin embargo, aún se desconocen muchos mecanismos asociados a su desarrollo. Este proceso fisiopatológico tiene diferentes orígenes. Uno de ellos es la generación de mutaciones en el genoma de la célula, lo cual desencadena proliferación descontrolada, evasión de los puntos de regulación del ciclo celular y evasión del sistema inmune del organismo (Hausman, 2019). En el curso de la neoplasia participa una compleja red de procesos bioquímicos, fisiopatológicos y metabólicos en un espacio físico denominado microambiente tumoral (TEM) (Anderson y Simon, 2020).

Cáncer oral

El cáncer oral es un cáncer con alta incidencia a nivel mundial el cual se caracteriza por ser una enfermedad multifactorial desencadenada por factores como la genética de cada individuo, hábitos como el tabaquismo y alcoholismo, lesiones de la cavidad oral, desregulación del sistema inmune, generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, entre muchos otros elementos. Dentro

de los aspectos clínicos, posee una tardía detección, pobre prognosis y una terapia costosa (Antón y Somacarrera, 2015).

Cerca del 90% los procesos malignos orales corresponden a carcinoma oral de células escamosas cuyo origen es epitelial, siendo más frecuentes las lesiones que se desarrollan al costado lateral de la lengua (Oreamuno, Y. V. B. 2016). En un inicio se puede presentar como una erosión, masa de apariencia verrugosa o como una pequeña úlcera, mientras que en estadios más avanzados se presenta como un tumor de gran tamaño, una úlcera profunda e irregular o incluso un infiltrado duro con capacidad de diseminación hacia los ganglios linfáticos circundantes, tal y como se muestra en la Figura 1, con la eventual posibilidad de evolución a metástasis (Oreamuno, 2016).



Figura 1. Tipos de lesiones de la cavidad oral en cáncer, presencia de úlceras irregulares o profundas en la lengua, labios, paladar duro, entre otros.

Para los estudios e investigaciones que se realizan acerca del carcinoma oral de células escamosas existen varios modelos de trabajo, y uno de ellos corresponde a la línea celular HSC-3, la cual deriva de un carcinoma oral de células escamosas de la lengua de un paciente masculino de 64 años.

El microambiente tumoral (TME)

El proceso neoplásico no depende exclusivamente de la célula tumoral, el microambiente juega un papel muy importante en la progresión de la carcinogénesis (Xiao y Yu, 2021). En este ambiente coexisten diversos elementos tales como las células tumorales primarias que proliferarán y formarán el tumor, células tumorales circulantes que se desprenden del tumor y poseen alto potencial metastásico (Paoletti y Hayes, 2016). También existen células presentes en el estroma que funcionan como soporte para el tumor dentro de las cuales encontramos fibroblastos asociados al cáncer (CAFs), subpoblación celular que secreta citoquinas y factores de crecimiento que cooperan con la remodelación de la matriz extracelular (ECM) y angiogénesis (Arpinati *et al.*, 2024). También se encuentran células endoteliales que generan vías de nutrición

y oxigenación (Hida *et al.*, 2022). Adicional a estas células estromales y de soporte, el TME también alberga células del sistema inmune tales como células natural killer (NK) que desempeñan funciones antitumorales, reconociendo y eliminando células malignas (Myers y Miller, 2021). Sin embargo, algunos inmunocitos ejecutan actividades pro-tumorales como, por ejemplo, macrófagos asociados al tumor (TAMs), específicamente macrófagos con fenotipo M2 que secretan citoquinas inmunosupresoras, estimulan angiogénesis, e inducen la resistencia a tratamientos (Zhu, S *et al.*, 2021), o neutrófilos asociados al tumor (TANs), específicamente fenotipo N2 los cuales secretan citoquinas que favorecen la supresión del sistema inmune e incluso pueden interactuar con TAMs y linfocitos T reguladores (Hou, R *et al.*, 2025). En la Figura 2 se observan diversos componentes de este ambiente.

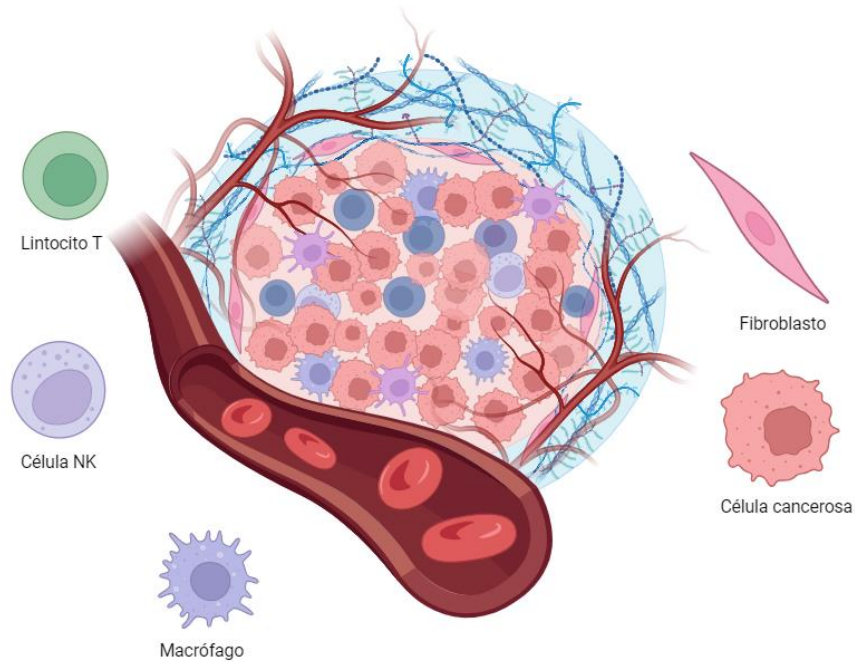


Figura 2. Representación del microambiente tumoral, con presencia de células propias del tejido y células del sistema inmune que participan en la patogénesis del proceso neoplásico.

A pesar de los distintos elementos que contribuyen a este proceso, existe una población esencial en la respuesta celular contra el tumor: los linfocitos T, los cuales tienen un papel citotóxico o auxiliador dependiendo de la subpoblación celular (Nagasaki y Togashi, 2022). No obstante, existe un mecanismo que favorece el desarrollo tumoral es la alteración de la función linfocitaria (Allison y Bridle, 2017).

Respuesta inmune adaptativa: Linfocitos T

Los linfocitos T poseen receptores altamente específicos conocidos como TCR, que reconocen de forma diferencial antígenos propios de antígenos tumorales (Baulu *et al.*, 2023). Estos receptores reconocen componentes antigénicos cuando son presentados por una célula presentadora de antígenos profesional (APC) en el contexto de la sinapsis inmunológica (Calzada-Fraile, D. 2003), mediante proteínas como el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y una serie de elementos coestimuladoras que inducen la activación del linfocito T (Knight y Stagg, 1993), como se observa en la

Figura 3.

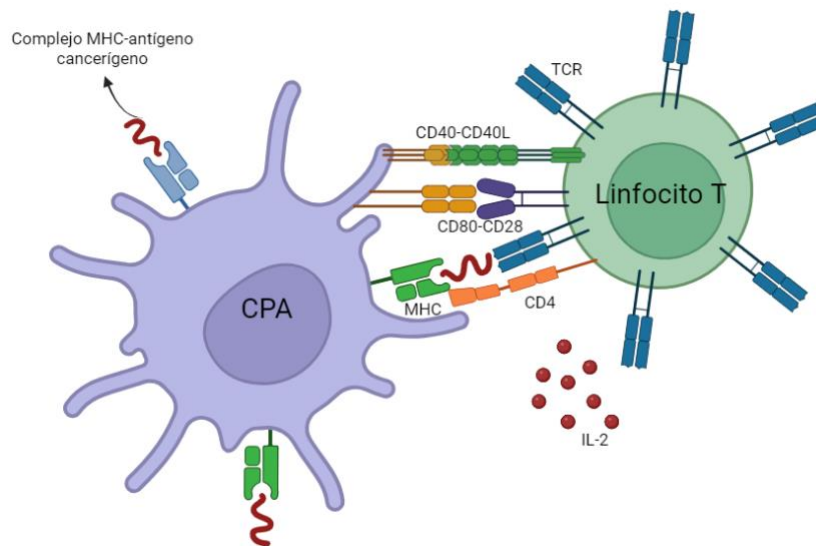


Figura 3. Presentación antigénica entre una célula presentadora de antígenos profesional y un linfocito T. Interacción entre el complejo mayor de histocompatibilidad y TCR, con ayuda de la presencia de moléculas coestimuladoras: IL-2, CD40/CD40L, CD80/CD28.

Existen dos grandes poblaciones de linfocitos T, por un lado, tenemos el linfocito T CD8⁺ o linfocito citotóxico, con actividad citolítica (Koh *et al.*, 2023), por otro lado, el linfocito T CD4⁺ o linfocito auxiliador, el cual es encargado de coordinar y estimular a otras células del sistema inmune con el fin de combatir y eliminar el agente desconocido (de León y Pareja, 2018). En específico, los linfocitos T CD4⁺ son células que responden a la estimulación del medio ambiente y de otros inmunocitos, por lo cual, dependiendo de las características del proceso se

genera una serie de subpoblaciones celulares dentro de las cuales encontramos linfocitos Th1, Th2, Treg, Th17 y Th9 (O'Garra *et al.*, 1997).

Respuesta antitumoral mediada por linfocitos T

La inmunovigilancia corresponde al proceso en el cual las células del sistema inmune detectan y eliminan agentes patógenos o células anormales incluidas células con potencial tumorigénico (Vasquez *et al.*, 2020). Este fenómeno está mediado por la acción de las APC, las cuales inspeccionan los distintos órganos y tejidos con el fin de mantener la homeostasis y prevenir el desarrollo de distintas enfermedades (Kroemer *et al.*, 2024). Cuando las APC detectan un antígeno neoplásico desarrollan una serie de modificaciones fenotípicas y metabólicas que desencadenará en la activación de la célula (Chuang *et al.*, 2024). Como consecuencia, estas células migrarán a los linfonodos cercanos en donde presentan el péptido antigénico a los inmunocitos inmaduros en los órganos linfoides secundarios gatillando la inmunidad adaptativa, moderando la respuesta antitumoral mediada por células CD4⁺ y CD8⁺ activadas y diferenciadas (de León y Pareja, 2018). En este contexto, los linfocitos T CD4⁺ se diferencian principalmente a un fenotipo Th1, el cual se caracteriza por la secreción de distintas citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IFN- γ e IL-2 (Szabo *et al.*, 2000). En consecuencia a la liberación de estas moléculas, se induce la apoptosis en células tumorales y aumenta la permeabilidad vascular,

incrementando el reclutamiento de inmunocitos (Silva *et al.*, 2021). Además, se aumenta la expresión de MHC-I y MHC-II en las células tumorales y APC favoreciendo la activación y expansión de linfocitos T CD8⁺ y fagocitos (Böttcher y Reis e Sousa, 2020).

Efecto del cáncer sobre la respuesta antitumoral mediada por linfocitos T

El tumor y el microambiente son capaces de alterar el funcionamiento de los linfocitos T, especialmente los linfocitos T CD4⁺, los cuales se ven afectados por mecanismos inmunosupresores (Tay *et al.*, 2021). En el estado de linfocito T naïve, las células poseen un metabolismo basado en la oxidación de ácidos grasos similar a las células quiescentes del organismo, además de poseer bajos niveles de glutaminólisis (Allison y Bridle, 2017). Sin embargo, cuando existe requerimiento de expansión clonal, las células se activan y comienzan a proliferar. Para ello necesitan una gran cantidad de energía disponible, la que debe ser generada con rapidez, además de contar con vías biosintéticas que produzcan las macromoléculas necesarias para la división celular, tales como aminoácidos, proteínas y lípidos en lo que se denomina “bloques de construcción” (Maclver *et al.*, 2013). Por lo tanto, el linfocito activado adquiere un fenotipo metabólico basado en la glicolisis al igual que las células cancerígenas (Macintyre *et al.*, 2014).

A pesar de lo descrito, en el desarrollo de la neoplasia se ha observado que el linfocito que reside en el TEM posee una capacidad reducida de activación y proliferación, es más, el linfocito adquiere un fenotipo exhausto en un ambiente que favorece la inmunosupresión (Thommen y Schumacher, 2018). Esta subpoblación de los linfocitos T experimenta una reducción progresiva de las funciones efectoras (Lin *et al.*, 2024), las cuales incluyen la secreción de citoquinas y expresión aumentada de diversos receptores inhibidores como CTLA-4, TIM-3, LAG-3 y PD-1 (Huang *et al.*, 2017). En condiciones fisiológicas, estas proteínas de superficie ayudan a mantener bajo control las respuestas inmunitarias (De Sousa Linhares *et al.*, 2018). En especial la proteína PD-1, también conocida como proteína de muerte programada 1 está encargada de regular la función de las células que lo expresan constitutivamente (Giancchetti y Fierabracci, 2018), con la finalidad de intervenir en los procesos inflamatorios, además de colaborar con la mantención de la tolerancia periférica (Wang *et al.*, 2021). PD-1 está expresada transitoriamente en la superficie de linfocitos T activados, limitan la función y actividad contra las células del organismo previniendo procesos inflamatorios exacerbados o procesos autoinmunes (Vagas-Rojas *et al.*, 2008). No obstante, éste también puede ser utilizado como mecanismo de evasión del sistema inmune, ya que en los linfocitos T exhaustos (Tex) la expresión de PD-1 es crónica y progresiva (Wang *et al.*, 2024). Adicionalmente las células cancerosas sobre expresan proteínas inhibitorias tal

como PD-1L, el cual interacciona con su receptor PD-1 presente en las células del sistema inmune, generando señales inhibitorias que concluyen en funcionalidad celular disminuida (Han y Li, 2020), como se muestra en la Figura 4.

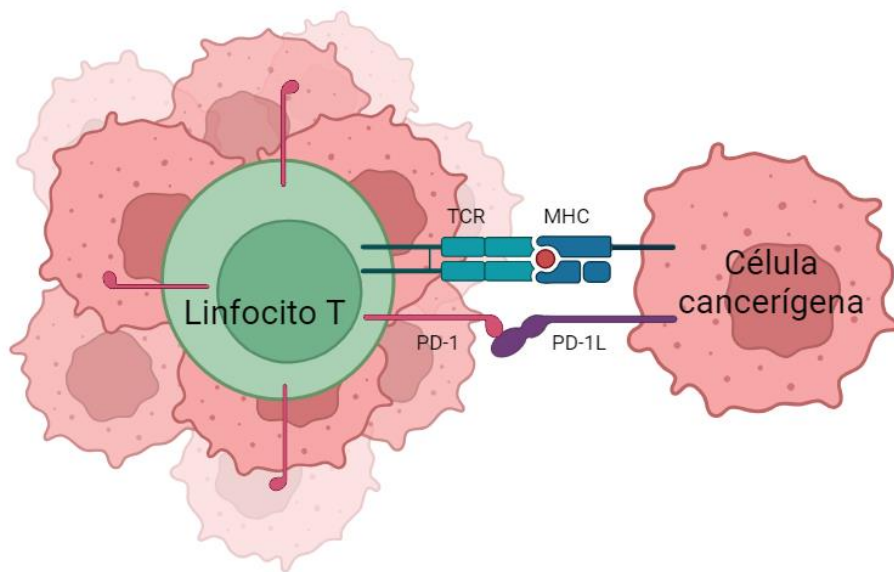


Figura 4. Interacción linfocito T-célula cancerígena en el microambiente tumoral, la célula cancerígena sobre expresa el ligando del receptor PD-1 e inhibe la activación y expansión clonal del linfocito T.

Mitocondria en cáncer

Las células neoplásicas exhiben múltiples alteraciones como consecuencia de la inestabilidad genética, que genera modificaciones en los distintos componentes celulares tanto nivel estructural como funcional (Andrade y Vélez, 2016). En especial, la mitocondria es susceptible a la desregulación genética, afectada por los altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) presentes en estas células (Bonora *et al.*, 2021).

Fisiológicamente, este organelo está encargado de la producción de energía mediante el metabolismo de carbohidratos y lípidos en procesos como la fosforilación oxidativa, β -oxidación de ácidos grasos y ciclo de Krebs (Sainero-Alcolado *et al.*, 2022). Además, tiene por función regular la homeostasis intracelular de calcio, la apoptosis (Osellame *et al.*, 2012) y la producción de ROS como subproducto de la respiración celular a cargo del complejo de proteínas mitocondriales conocida como cadena transportadora de electrones (ETC) (Zhang *et al.*, 2022). Sin embargo, las mitocondrias de células cancerosas presentan una morfología anormal, de apariencia fragmentada o alargadas, con crestas mitocondriales desorganizadas (Chu *et al.*, 2022). Incluso se puede presentar una variación en el número de mitocondrias (Senft y Ze'ev, 2016).

Por su parte, una célula cancerígena opera bajo el efecto Warburg, fenómeno en el cual las células dependen casi exclusivamente de la glucólisis aerobia en lugar de la fosforilación oxidativa, incluso en presencia de oxígeno (Wallace, 2012). Mientras tanto, las mutaciones producidas en el ADN mitocondrial (ADNmt) o nuclear podrían generar alteraciones en las proteínas del ETC. Esto desencadena en una mayor producción de ROS y un declive en la producción de energía (Bonora *et al.*, 2021). Además, se acumulan metabolitos intermediarios que actúan como oncometabolitos y fomentan la proliferación celular (Beyoğlu y Idle, 2021). Todas estas modificaciones terminan por impactar el metabolismo celular, resistencia a la terapia, capacidad tumorigénica e inflamación, dentro de muchas otras consecuencias (Godel *et al.*, 2021), como se observa en la figura 5.

La mitocondria a diferencia de otros organelos cuenta con la capacidad de ser transferida de manera horizontal, es decir, que puede movilizarse de una célula a otra sin la necesidad de división celular (Dong L *et al.*, 2023).

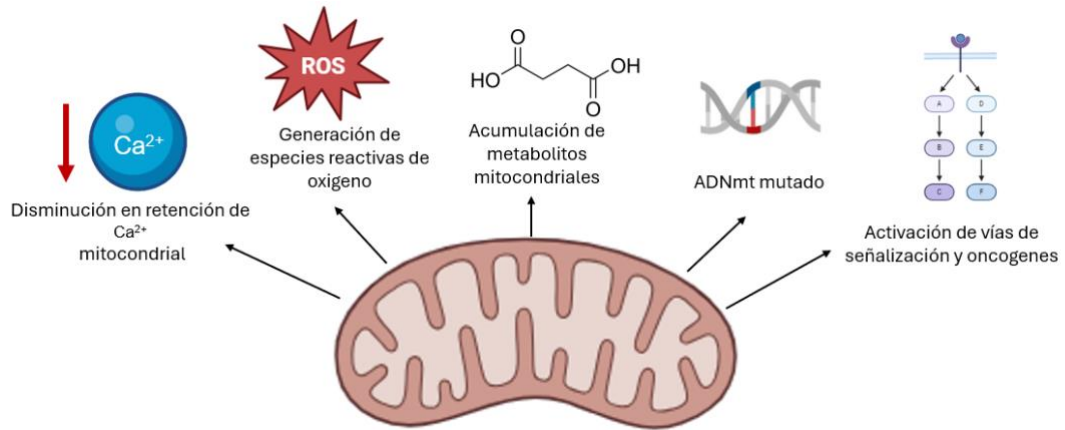


Figura 5. Alteraciones en mitocondria de célula cancerígena, disminución de la estabilidad y funcionalidad mitocondrial.

Dinámica mitocondrial

En las células existe un equilibrio altamente dinámico entre la generación y eliminación de mitocondrias (Senft y Ze'ev, 2016), así como también en la fusión y fisión, todos procesos que están involucrados críticamente en la regulación, adaptación y respuesta al estrés celular, con el fin de conservar la integridad de la masa mitocondrial (Ni H *et al*, 2015).

La eliminación de mitocondrias disfuncionales o dañadas puede ocurrir mediante diferentes mecanismos, predominando la mitofagia como el principal (Picca *et al.*, 2023). En este proceso las mitocondrias son degradadas selectivamente usando la maquinaria celular de la autofagia, las mitocondrias son encapsuladas en autofagosomas gracias a la ayuda de proteínas como LC3, y posteriormente se fusionan con vesículas citoplasmáticas lisosomales en unas estructuras denominadas autofagolisosomas, ahí son degradados a moléculas menos complejas y elementos son reciclados (Onishi *et al.*, 2021).

Otro mecanismo regulatorio es la mitoptosis, que consiste en un proceso de muerte mitocondrial programada (Chaabane *et al.*, 2013). Sin embargo, a diferencia de la mitofagia que degrada mitocondrias sin comprometer la viabilidad celular, la mitoptosis es capaz de desencadenar la apoptosis (Tinari *et al.*, 2007).

Transferencia de elementos celulares

Existen variados mecanismos de comunicación intercelular que tienen por función mediar el intercambio de moléculas, nutrientes y elementos celulares (Su *et al.*, 2024). Dentro de estos mecanismos destacan:

Nanotubos (TNTs) y dendritas, los cuales corresponden a protrusiones tubulares membranosas que interconectan dos células, permitiendo la generación de una vía física de transporte (Gurke *et al*, 2008). A pesar de que la función principal de las dendritas es la sinapsis neuronal mediante la transmisión del impulso eléctrico, esta estructura también puede participar en la transferencia de moléculas y organelos (Maeder *et al.*, 2014).

Microvesículas o Vesículas extracelulares, equivalente a cuerpos celulares que derivan de la membrana plasmática y que son capaces de transportar distintos elementos tanto en su interior como en su superficie (Clancy y D'Souza-Schorey, 2023).

Uniones comunicantes formadas por conexinas, proteínas transmembrana que se unen formando conexones, permitiendo la constitución de uniones de tipo gap, las cuales generan poros o canales de comunicación entre dos células adyacentes y permiten el intercambio de sustancias y elementos (Nalewajska, *et al.*, 2020). En ciertos contextos, estas estructuras se han relacionado con la transferencia de vesículas extracelulares que contienen proteínas, microARN o ARNm (Soares *et al.*, 2015).

Recientemente, se ha descubierto un nuevo mecanismo de transferencia de constituyentes celulares, que se conoce como extrusión, fenómeno en el cual elementos son expulsados hacia compartimientos extracelulares desde una célula donadora, y son captadas e internalizadas por parte de una célula receptora (Liu *et al.*, 2021). Los distintos mecanismos se visualizan en la

Figura 6.

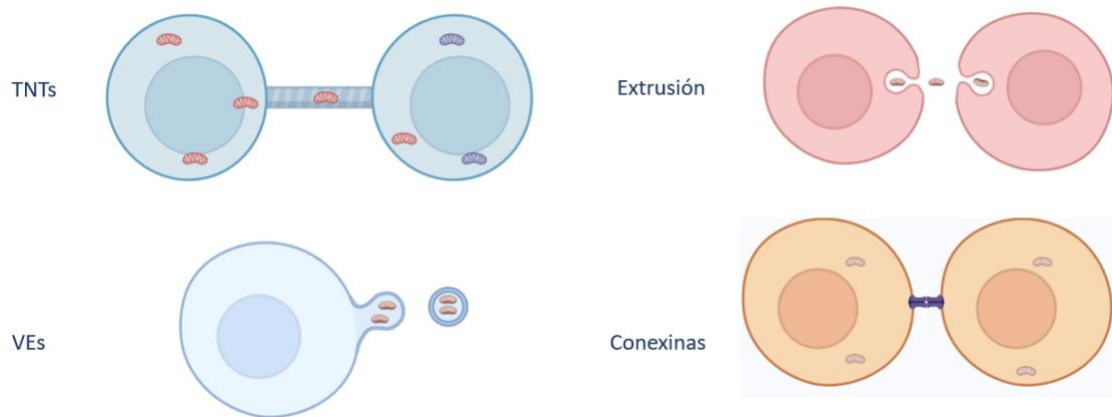


Figura 6. Mecanismos de transferencia mitocondrial, generación estructuras membranosas, conexinas, además de la extrusión de mitocondrias hacia compartimientos extracelulares y captación por parte de una célula receptora.

Transferencia mitocondrial

Se ha constatado en estudios la capacidad de recuperación de funciones mitocondriales, respiración aeróbica e incluso de la biogénesis mitocondrial en células desprovistas de mitocondrias o con mitocondrias disfuncionales al transferirles mitocondrias sanas (Spees *et al.*, 2006) (Lin *et al.*, 2015).

Diversos estudios reportan el tráfico de mitocondrias desde células madre mesenquimales (MSCs) a una amplia variedad de células, como por ejemplo cardiomiocitos (Acquistapace *et al.*, 2011), células endoteliales u epiteliales (Islam *et al.*, 2012) (Liu, K. *et al.*, 2014), células neoplásicas de mama como MDA-MB-231 y células mieloides en leucemia (Moschoi, R. 2016). En estos estudios se destaca el impacto de la transferencia de mitocondrias, especialmente la influencia crucial de este fenómeno en los procesos metabólicos y funcionales de la célula receptora. Otro ejemplo de esta dinámica se observó en adenocarcinoma de células epiteliales alveolares A549 p0 (sin ADNmt) y un osteosarcoma epitelioide 143B p0 (sin ADNmt). Estas células fueron cocultivadas con MSCs, evidenciándose un aumento en las actividades mitocondriales tales como producción de ATP, tasa de consumo de oxígeno y aumento del potencial de membrana (Cho, Y. M *et al.*, 2012).

A pesar de que los estudios mencionados destacan el papel de las MSCs como donantes de mitocondrias, el tráfico de elementos y señales se destaca por ser más bien de carácter bidireccional. Zhang y colaboradores describen la transferencia de mitocondrias desde células neoplásicas hacia linfocitos T, y al mismo tiempo el tráfico de mitocondrias desde linfocitos T hacia las células oncogénicas (Zhang *et al.*, 2023).

Adicionalmente, sabemos que los linfocitos infiltrados en tumor (TIL) presentan un metabolismo ineficiente, incapaz de satisfacer las necesidades celulares de un linfocito T activado frente respuestas antitumorales (Gholami *et al.*, 2017). Es por lo que, nuestro grupo de investigación quiso estudiar el efecto de la transferencia mitocondrial desde células HSC-3 a linfocitos T CD4⁺ mediante un mecanismo de transferencia mitocondrial artificial conocido como MitoCeption. Para ello, se marcaron las mitocondrias de células HSC-3 con MitoTracker Green y se aislaron mediante el uso de un kit comercial. Posteriormente se incubaron las mitocondrias aisladas y los linfocitos T CD4⁺. Como resultado se evidenció que los linfocitos T que adquirían mitocondrias poseían un fenotipo exhausto, con un incremento en la expresión de CTLA-4, TIM-3, PD-1, PD-1L, TIGIT y LAG-3. Además, el perfil de producción de citoquinas exhibió un aumento en la producción de IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-4. Esto sugiere que la transferencia de

mitocondrias disfuncionales, con ADNmt alterado y un exceso de producción de ROS podría ser unos de los mecanismos que estarían mediando el fenotipo exhausto y la disfuncionalidad metabólica en linfocitos T.

En otros esfuerzos por esclarecer lo que ocurre en el TEM, Fraga y colaboradores caracterizaron el contenido proteico obtenido de biopsias de carcinoma oral de células escamosas. Al analizar el secretoma mediante proteómica y al compararlo con el secretoma de biopsias control, se encontró una alta expresión de proteínas y péptidos mitocondriales asociados a la vía del ciclo del ácido cítrico y la cadena transportadora de electrones. Además, realizaron un cocultivo de linfocitos T con el secretoma de carcinoma oral de células escamosas. Como resultado, los linfocitos T adquirirían un fenotipo exhausto al exponerse los componentes del secretoma (Fraga *et al.*, 2021). Esto implica que el TEM existen elementos mitocondriales en compartimientos extracelulares y que potencialmente pueden interaccionar con las células que coexisten en este espacio físico.

Inductores de transferencia mitocondrial

En diversas investigaciones se han estudiado factores que podrían gatillar el intercambio de mitocondrias entre células. Factores como estrés celular producido por ROS e hipoxia han demostrado que pueden producir daño en

proteínas y material genético incluyendo el ADNmt. Como consecuencia estos radicales afectan la transcripción y traducción de proteínas que conforman organelos como la mitocondria y alteran el balance de la dinámica mitocondrial (Juan C *et al.*, 2021). Incluso se ha descrito que estas condiciones podrían gatillar la eliminación de mitocondrias disfuncionales con el fin de conservar la densidad mitocondrial celular (Venditti y Di Meo, 2020).

Por otro lado, existen estudios en donde evalúan el efecto de diferentes citoquinas y moléculas que se encuentran presente en el TEM sobre la transferencia de mitocondrias. Se ha observado que el TNF- α induce la extrusión mitocondrial mediante la generación de vacuolas citoplasmáticas durante la muerte celular, proceso en el cual la mitocondria es fragmentada y expulsada desnuda hacia el medio extracelular (Nakajima *et al.*, 2008). Adicionalmente, se encontró que los niveles de TNF- α en la saliva de pacientes con carcinoma oral de células escamosas está aumentando (Caruntu, A., & Caruntu, C *et al.*, 2022), lo que podría apoyar la idea de que esta citoquina aumenta los niveles de extrusión. Por otro lado, se reconocen más de 700 especies microbianas asociadas a la cavidad bucal (Gholizadeh *et al.*, 2016), dentro de las cuales encontramos bacterias que inducen infecciones crónicas en un proceso de periodontitis, patología que se ha asociado fuertemente al desarrollo de cáncer bucal (Li, Q. *et al.*, 2020). Es por estos antecedentes que un grupo de

investigadores descubrieron que inyecciones repetidas de lipopolisacárido en el hígado de ratones induce la extrusión de contenido mitocondrial desde los hepatocitos en un mecanismo que involucra la formación de autofagosomas (Unuma, *et al.*, 2015).

Por lo tanto, sería interesante investigar que otros factores o moléculas podrían estar favoreciendo la transferencia mitocondrial entre dos células, y que condiciones deberían existir para que esta se lleve a cabo.

En resumen

Actualmente se reconocen múltiples mecanismos de transferencia de elementos entre células, incluyendo organelos como las mitocondrias. En un contexto fisiológico, la transferencia mitocondrial es capaz de recuperar la respiración celular de una célula hipóxica. Sin embargo, en un contexto fisiopatológico dado como el cáncer, en el microambiente tumoral esta transferencia podría implicar un potencial mecanismo de inmunosupresión. En el secretoma de una biopsia de carcinoma oral de células escamosas existen elementos mitocondriales, y al exponer a los linfocitos T a este secretoma, estos adquieren un fenotipo exhausto caracterizado por disfuncionalidad linfocitaria, por lo tanto, ausencia de actividad antitumoral. Sin embargo, y a pesar de lo descrito, aún se desconoce como

ocurre esta transferencia mitocondrial entre la célula cancerosa y el linfocito T CD4⁺ y si es que este fenómeno ocurre de manera natural. A raíz de lo anterior surge la incógnita ¿Cuál es el mecanismo involucrado en la transferencia mitocondrial desde una célula cancerígena hacia un linfocito T CD4⁺ y qué efectos tiene dicha transferencia en los linfocitos?

2. HIPOTESIS

Células escamosas de cáncer oral promueven la expresión de PD-1 en linfocitos T CD4⁺ mediante la transferencia mitocondrial natural.

3. OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la transferencia mitocondrial natural desde células escamosas de cáncer oral sobre la inducción de PD-1 en linfocitos T CD4⁺.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la transferencia mitocondrial natural dependiente e independiente de contacto desde células HSC-3 hacia los linfocitos T CD4⁺.

2. Determinar la expresión de PD-1 en linfocitos T posterior a transferencia mitocondrial desde células HSC-3 hacia los linfocitos T CD4⁺.
3. Evaluar la expresión diferencial de proteínas asociadas a mecanismos de transferencia mitocondrial en base de datos proteómicos obtenidos del secretoma de biopsias de tejido COCE y sano.

5. MATERIALES Y MÉTODO

5.1 Evaluar la transferencia mitocondrial natural dependiente e independiente de contacto desde células HSC-3 hacia los linfocitos T CD4⁺.

- Obtención de linfocitos T CD4⁺

Los linfocitos T CD4⁺ de sangre periférica fueron obtenidos de voluntarios sanos, después de la aprobación del consentimiento informado. Se recolectaron muestras de sangre periférica y se aislaron las células mononucleares de sangre periférica mediante Ficoll. Se centrifugaron las células a 2000 rpm por 20 min a 4°C a velocidad de aceleración y desaceleración [1,0], correspondientemente. Esto permitió la recolección del anillo mononuclear, el cual se lavó con PBS 1X y se centrifugó a 1000 rpm por 10 min a 4°C a velocidad de aceleración y

desaceleración [9,9] correspondientemente, con el fin de eliminar plaquetas. Por último, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en PBS 1X para centrifugar a 1500 rpm por 10 min a 4°C. El pellet con leucocitos de sangre periférica se resuspendió en buffer MACS 1X para el siguiente paso.

Para la aislación de linfocitos T CD4⁺ se utilizó el kit de selección positiva: kit aislación de células T CD4⁺ del Laboratorio Miltenyi Biotec, siguiendo las instrucciones del fabricante.

- Activación de linfocitos T CD4⁺

Los linfocitos fueron activados con beads anti-CD3/CD28 a 37°C.

- Eliminación de beads de activación anti-CD3/CD28

Para analizar la transferencia mitocondrial mediante citometría de flujo fue necesario eliminar los beads de activación, ya que estos poseían un grado de auto-fluorescencia que podía alterar el resultado. Por esta razón, los beads fueron extraídos mediante Ficoll. Se centrifugaron las células T a 2000 rpm por 20 min a velocidad de aceleración y desaceleración [1,0]. Esto generó el anillo

que contenía los linfocitos T, se lavaron con PBS 1X y se centrifugó a 1500 rpm por 10 min a 4°C a velocidad de aceleración y desaceleración [9,9]. El pellet se resuspendió en medio RPMI 5% SBF con estreptomicina y penicilina.

5.1.1 Co-cultivo de células HSC-3 y linfocitos T CD4⁺ para la evaluación de la transferencia mitocondrial natural dependiente de contacto.

Se analizó la transferencia de mitocondrias hacia linfocitos CD4⁺ por citometría de flujo.

- Marcaje de células HSC-3 con Cell Trace Violet

Las células en suspensión fueron marcadas con una solución de Cell Trace Violet a una concentración final de 2,5 µM por 20 minutos a 37°C. Se añadió medio DMEM 5% SBF a 4°C y se incubaron las células en hielo por 5 minutos. Posteriormente, se procedió a lavar las células y se resuspendieron en DMEM 5% SBF con estreptomicina y penicilina.

- Marcaje de mitocondrias de células HSC-3 con MitoTracker Red

Las células en suspensión fueron marcadas en una solución de MitoTracker Red 1 μ M por 30 minutos a 37°C. Posteriormente, se lavaron las células y se resuspendieron en DMEM 5% SBF con estreptomicina y penicilina.

- Marcaje de linfocitos T CD4⁺ con anti-human CD4⁺ APC-Cy7

Las células en suspensión fueron centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en 500 μ L de PBS 1X y se añadió 2 μ L de anti-human CD4⁺APC-Cy7. Se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente, se lavaron las células y se resuspendieron en RPMI 5% SBF con estreptomicina y penicilina.

- Co-cultivo de células HSC-3 y linfocitos T CD4⁺

Para llevar a cabo el co-cultivo, las células HSC-3 marcadas con MitoTracker Red fueron sembradas en conjunto con los linfocitos T CD4⁺ marcados con APC-Cy7 en una placa de 96-pocillos. La transferencia fue evaluada mediante citometría de flujo. La proporción de linfocitos T con respecto a las células HSC-3 fue de 10:1 (100,000:10,000).

5.1.2 Evaluar la transferencia mitocondrial natural independiente de contacto desde células HSC-3 hacia los linfocitos T CD4⁺.

El ensayo Transwell nos permite determinar la migración de elementos celulares, en este caso la mitocondria, en un sistema *in vitro*.

Las células HSC-3 fueron marcadas con MitoTracker Red 1 μM y los linfocitos T con anti-human CD4⁺APC-Cy7. Estas células fueron cocultivados durante 3h, 6h y 24 h. Para determinar la migración de la mitocondria de la célula HSC-3 y la captación esta por parte del linfocito T CD4⁺, la transferencia de mitocondrias fue determinada mediante citometría de flujo en una razón de 10:1 (100000:10000).

5.1.3 Analizar el efecto de estimuladores sobre la transferencia mitocondrial natural dependiente de contacto desde células HSC-3 hacia los linfocitos T CD4⁺.

Una cantidad de 1×10^4 células HSC-3 células HSC-3 marcadas con Cell Trace Violet y MitoTracker Red fueron sembradas en una placa de 96-pocillos. Se estimularon y se analizó el efecto de estas moléculas sobre la transferencia mitocondrial desde las células HSC-3. Se utilizaron los siguientes compuestos:

Estimulación	Concentración
IFN-I	50 ng/mL
IL-6	50 ng/mL
LPS	10 ng/mL
TNF- α	20 ng/mL

Tabla I. Estímulos utilizados para el favorecimiento de la transferencia mitocondrial.

Se incubaron por 14 horas y se eliminaron los estímulos, se lavaron las células y se incluyeron al sistema los linfocitos marcados con anti-human CD4 APC-Cy7.

5.1.4 Analizar el efecto de inhibidores sobre la transferencia mitocondrial natural.

En una placa de 96-pocillos se sembraron 1×10^4 células HSC-3, cuyas mitocondrias fueron marcadas mediante la expresión de la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP), permitiendo la evaluación de su movimiento y

transferencia entre células. Posteriormente, se añadieron los siguientes inhibidores:

Inhibidor	Concentración
Citocalasina B (CytoB)	1 μ M
Citocalasina B (CytoB)	10 μ M
3-metiladenina (3- MA)	0.1 mM
3-metiladenina (3- MA)	1 mM
GW4869	1 μ M
GW4869	10 μ M

Tabla II. Inhibidores utilizados para la determinación del mecanismo de transferencia mitocondrial. CytoB inhibidor de nanotubos, 3-MA inhibidor de la autofagia (extrusión), GW4869 inhibidor de microvesículas.

Se incubaron por 14 horas y se eliminaron los estímulos, se lavaron las células y se incluyeron al sistema los linfocitos marcados con anti-human CD4 APC-Cy7.

5.2 Determinar la expresión de PD-1 en linfocitos T posterior a transferencia mitocondrial natural desde células HSC-3 hacia los linfocitos T CD4⁺.

- Sistema de cocultivo

Para determinar la expresión de PD-1 en linfocitos T posterior a la transferencia mitocondrial natural dependiente e independiente de contacto entre células, se generó el mismo sistema de cocultivo descrito en el apartado 9.1.1.

Una vez cumplido el tiempo de coincubación, cuidadosamente se extrajeron los linfocitos y se centrifugaron a 1500 rpm por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en PBS 1X. Posteriormente se le añadió 2 µL de APC anti-human PD-1. Se incubó con el anticuerpo a 4°C por 15 minutos. Posteriormente se lavaron las células con PBS 1X y se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos. El pellet fue resuspendido en 300 µL de PBS 1X. Se determinó la expresión de PD-1 mediante citometría de flujo.

5.3 Analizar la expresión de proteínas asociadas a mecanismos de transferencia mitocondrial natural dependiente e independiente de contacto en secretoma de biopsias de cáncer oral.

Se realizó un análisis proteómico de las proteínas presentes en el secretoma de biopsias de cáncer oral y su relación con los mecanismos de transferencia mitocondrial natural dependiente e independiente de contacto.

Con este propósito se realizaron los siguientes procedimientos a las muestras:

- Extracción de proteína

A cada una de las muestras se le añadió inhibidor de proteasas/fosfatasas (#1861284, Thermo Scientific) a una concentración final 1X. Luego, las muestras fueron liofilizadas y resuspendidas en 8M urea con 25 mM de bicarbonato de amonio a pH 8. Posteriormente, fueron homogeneizadas utilizando ultrasonido durante 1 min, con pulsos de 10 s (on/off) a una amplitud del 50%, utilizando un baño frío. Luego, se incubaron en hielo por 5 min y posteriormente se centrifugaron para eliminar debris a 21.000 x g por 10 min a 4°C. Las muestras inmediatamente fueron cuantificadas mediante Qubit 4™ (Thermo Scientific)

usando el kit Qubit Protein Assay. Se utilizó un total de 100 µg para digestión triptica.

- Preparación para MS

Las proteínas resultantes fueron precipitadas agregando 5 volúmenes de acetona fría e incubadas durante la noche a -80°C. Luego, fueron equilibradas a temperatura ambiente por 10 min, centrifugadas a 16.000 x g por 15 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet resultante fue lavado 3 veces con acetona al 80% fría. Posteriormente, se dejó secar el pellet de proteínas en un concentrador rotatorio.

Las muestras fueron resuspendidas en 30 µL de 8M Urea y 25 mM bicarbonato de amonio. Luego, fueron reducidas con DTT a una concentración final de 20 mM en 25 mM bicarbonato de amonio y fueron incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Seguido, se alquilaron agregando iodoacetamida a una concentración final de 20 mM en 25 mM bicarbonato de amonio y se incubaron por 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron diluidas 8 veces con 25 mM bicarbonato de amonio.

La digestión fue realizada con Tripsina grado secuenciación (#V5071, Promega) en una proporción 1:50 de proteasa:proteína (masa/masa) y se incubó por 16 h a 37°C. La reacción de digestión se detuvo por pH agregando ácido fórmico al 10%. Luego, las muestras fueron sometidas a Clean Up Thermo Pierce C18 Spin Columns (cat cod 89870, ThermoFisher), según indicaciones del proveedor. Posteriormente, los péptidos limpios fueron secados en un concentrador rotatorio a 1.000 rpm durante la noche a 10°C.

- LC-MS/MS (Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry)

200 ng de los péptidos obtenidos en el paso anterior fueron inyectados en un Evosep One (Evosep Biosystems) acoplado a un espectrómetro de masas timsTOF Pro (“Trapped Ion Mobility Spectrometry – Quadrupole Time Of Flight Mass Spectrometer”, Bruker Daltonics), utilizando una columna PepSep Eight (8 cm x 150 µm ID, 1.5 µm C18, Bruker Daltonics). La cromatografía líquida se realizó utilizando la modalidad de 30 SPD (“Samples per Day”) en todas las muestras. El gradiente utilizado fue de 2% al 35% de tampón B (0,1% ácido fórmico – acetonitrilo). La colección de resultados fue realizada utilizando el software TimsControl 2.0 (Bruker Daltonics) bajo 10 ciclos de PASEF, con un rango de masas de 100-1.700 m/z, ionización del capilar a 1.500 V y una temperatura de 180°C en el capilar, con una frecuencia del TOF de 10 KHz a una resolución de 50.000 FWHM.

- Identificación de Proteínas

Los datos obtenidos fueron analizados con el software MSFragger 3.8 (Kong et al., 2017) por medio de la plataforma Fragpipe v20.1 (<https://fragpipe.nesvilab.org/>) utilizando el flujo de trabajo “default”, en un servidor de análisis de datos compuesto por 48 núcleos y 512 Gb de memoria RAM. Se utilizaron parámetros de tolerancia de masas de precursores de -20 a 20 PPM y tolerancia de fragmentos de masa de 40 PPM. Dentro de las opciones de digestión, se utilizó tripsina como enzima, modo de digestión específico y un máximo de 2 escisiones de pérdidas por péptido (“missed cleavages per peptides”). Se utilizaron como modificaciones post-traduccionales (PTM): Carbamidometilación de la cisteína, como PTM fija; Oxidación de Metionina (M), Acetilación N-terminal, como PTMs variables. Se incluyó la estimación de FDR <1% por medio de una base de datos decoy. Para la identificación de proteínas, se utilizó el proteoma humano de referencia, disponible en Uniprot. Adicionalmente, se adicionó una base de datos de contaminantes comunes en espectrometría de masas, disponible en la plataforma FragPipe.

- Análisis de datos

Se utilizaron los programas “*REACTOME*” y “*FragPipe-Analyst*” para analizar los datos obtenidos. También se hizo uso de Ingenuity Pathway Analysis (IPA) de Qiagen, aplicación de software basada en web para el análisis, la integración y la interpretación de datos derivados de experimentos ómicos, en este caso de los datos de la proteómica del secretoma cancerígeno versus el secretoma sano.

6. RESULTADOS

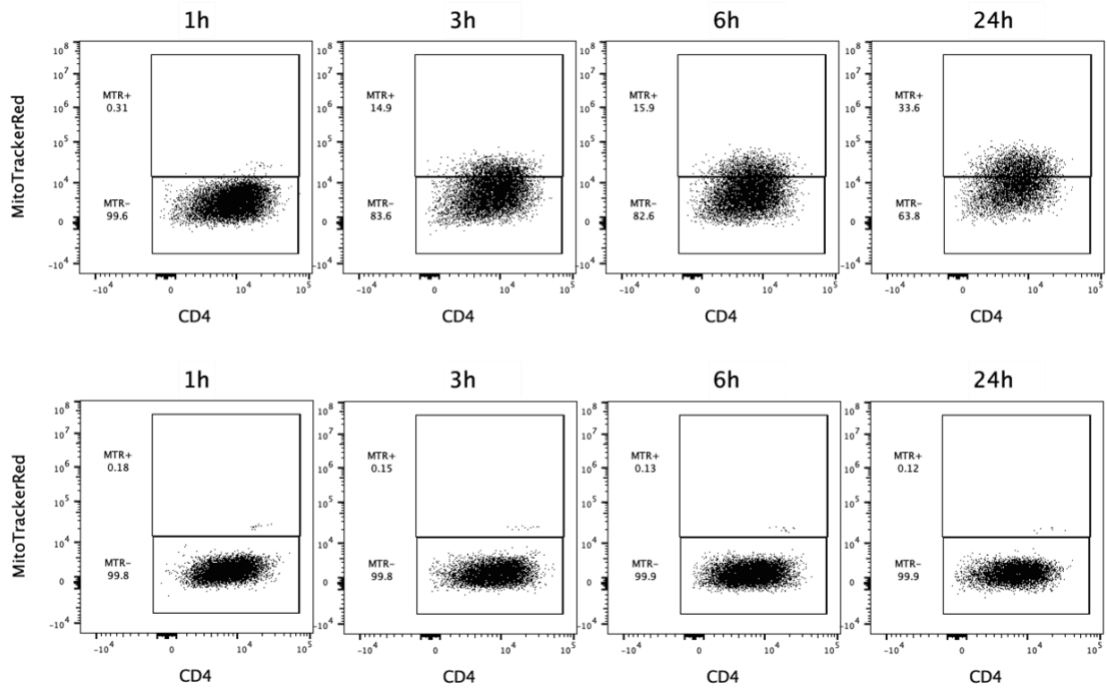
6.1 Evaluar la transferencia mitocondrial natural dependiente e independiente de contacto desde células HSC-3 hacia los linfocitos T CD4⁺.

6.1.1 Transferencia mitocondrial en sistema de cocultivo

Existen numerosos estudios que analizan la transferencia mitocondrial horizontal entre células, sin embargo, la mayoría se enfoca en protocolos basados en la aislación previa de las mitocondrias. En contraste, son escasos los trabajos que abordan la transferencia mitocondrial de manera natural, mediada exclusivamente por el contacto intercelular o factores intrínsecos asociados a la interacción entre células.

En este estudio, primero analizamos la transferencia de mitocondrias marcadas con MitoTracker Red desde células HSC-3 hacia linfocitos T CD4⁺ en un sistema de cocultivo. Este enfoque nos permitió evaluar transferencia mediante mecanismos dependientes del contacto celular. Se observó que la transferencia mitocondrial alcanzó un porcentaje de aproximadamente 14% a las 3 h, con un punto máximo a las 24 horas, con un porcentaje del 33.6% (Figura. 7a y 7b).

A)



B)

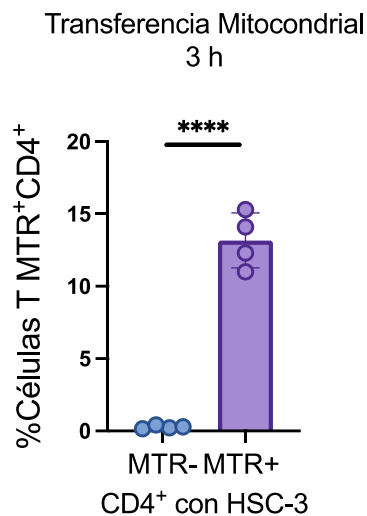


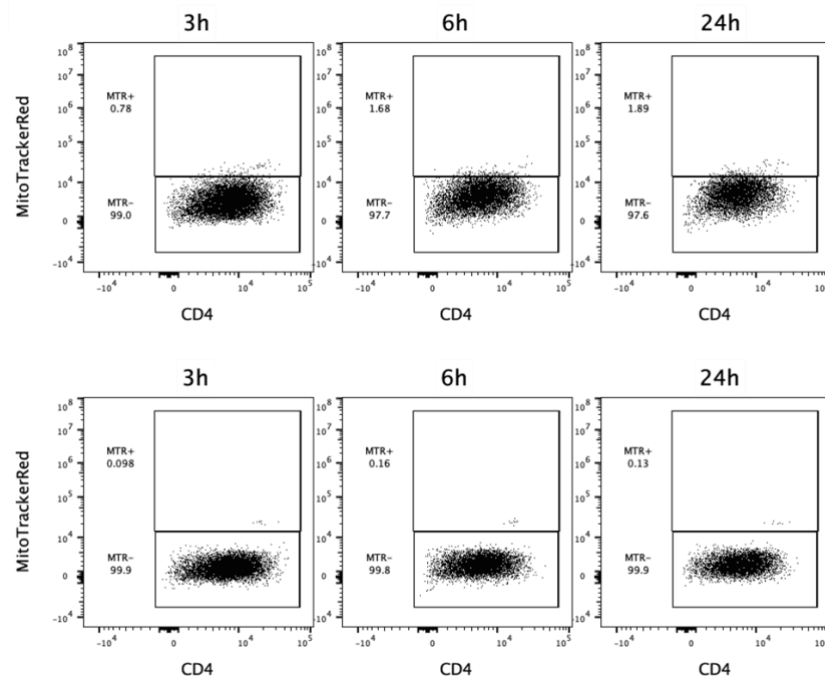
Figura 7. Transferencia de mitocondrias desde células HSC-3 a linfocitos T CD4⁺ en sistema de cocultivo. (A) Análisis por citometría de flujo de la transferencia mitocondrial en función del tiempo. Los paneles superiores muestran la adquisición de MitoTracker Red en células CD4⁺ cocultivadas con células HSC-3 a 1, 3, 6 y 24 horas, evidenciando un aumento progresivo en la población MTR⁺. Los paneles inferiores corresponden al control, HSC-3 sin mitocondria marcada. (B) Cuantificación del porcentaje de células CD4⁺ que adquirieron mitocondrias etiquetadas con MitoTracker Red (MTR) en presencia de células HSC-3. Se observa un aumento significativo en la población MTR⁺ en comparación con el control (****, $p < 0.0001$).

6.1.2 Transferencia mitocondrial en sistema de cocultivo-Transwell

En segundo lugar, analizamos la transferencia de mitocondrias marcadas con MitoTracker Red desde células HSC-3 hacia linfocitos T CD4⁺ utilizando el ensayo de migración Transwell. Este protocolo permite evaluar la transferencia sin contacto directo entre células, gracias a sus dos compartimentos separados

por una membrana porosa. Este sistema facilita la evaluación de la transferencia de mitocondrias mediante mecanismos independientes del contacto celular, como la mediada por vesículas extracelulares o la extrusión. Se determinó que la transferencia mitocondrial alcanzó su punto más alto a las 24 horas, con un porcentaje del 1.89% (Figura. 8a y 8b).

A)



B)

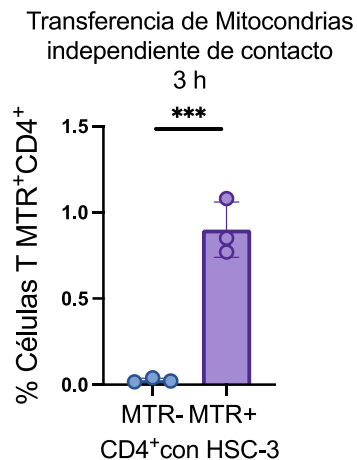


Figura 8. Transferencia de mitocondrias desde células HSC-3 a linfocitos T CD4⁺ en sistema Transwell. Análisis por citometría de flujo de la transferencia mitocondrial en función del tiempo. Los paneles superiores muestran la adquisición de MitoTracker Red en células CD4⁺ cocultivadas en placas Transwell con células HSC-3 a 3, 6 y 24 horas, evidenciando un aumento progresivo en la población MTR⁺. Los paneles inferiores corresponden al control, en donde la célula HSC-3 no posee mitocondria marcada. (B) Cuantificación del porcentaje de células CD4⁺ que adquirieron mitocondrias etiquetadas con MitoTracker Red (MTR) en presencia de células HSC-3. Se observa un aumento significativo en la población MTR⁺ en comparación con el control (***, p < 0.001).

6.1.3 Estimuladores de la transferencia mitocondrial sistema de cocultivo

Muchas de las células en el microambiente tumoral (TEM) interactúan dinámicamente mediante señales mediadas por citoquinas, factores de crecimiento y otras moléculas bioactivas. Por lo tanto, evaluamos el efecto de diferentes moléculas sobre la transferencia de mitocondrias en un sistema de

cocultivo de linfocitos T CD4⁺ y células HSC-3 previamente tratadas con IFN- γ , IL-6, LPS y TNF- α .

Al determinar el porcentaje de transferencia mitocondrial se observó que aún con el uso de los estimuladores no aumentó de manera significativa la adquisición de mitocondrias en células T CD4⁺ a comparación con el cultivo realizado con células HSC-3 sin estimular (MTR⁺), tal como muestra la Figura 9.

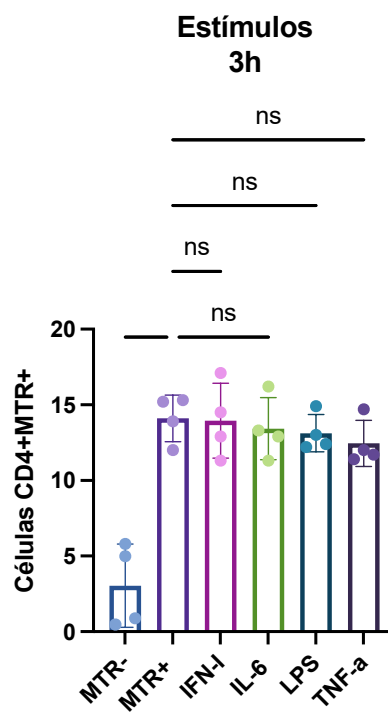


Figura 9. Efecto de biomoléculas sobre la transferencia de mitocondrias desde células HSC-3 a linfocitos T CD4⁺.

6.1.4 Inhibidores de la transferencia mitocondrial en sistema de cocultivo

Por otro lado, también quisimos evaluar el efecto de inhibidores de mecanismos de transferencia de mitocondrias en dos concentraciones diferentes cada uno. En la gráfica de la Figura 10 se muestra el porcentaje de células CD4+EGFP+ tras 3 horas de tratamiento con diferentes inhibidores. Este porcentaje indica la cantidad de células que han adquirido o incorporado mitocondrias marcadas con la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP). La mayoría de los inhibidores no generaron variaciones estadísticamente relevantes, a excepción de 3-MA a 1 mM, que incrementó significativamente el porcentaje de células CD4+EGFP+, sugiriendo que la inhibición de la autofagia podría favorecer la transferencia por parte de las células.

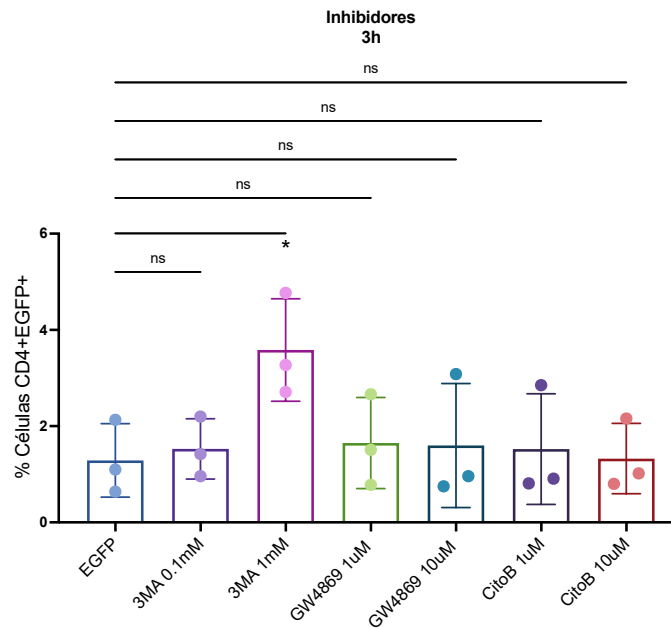


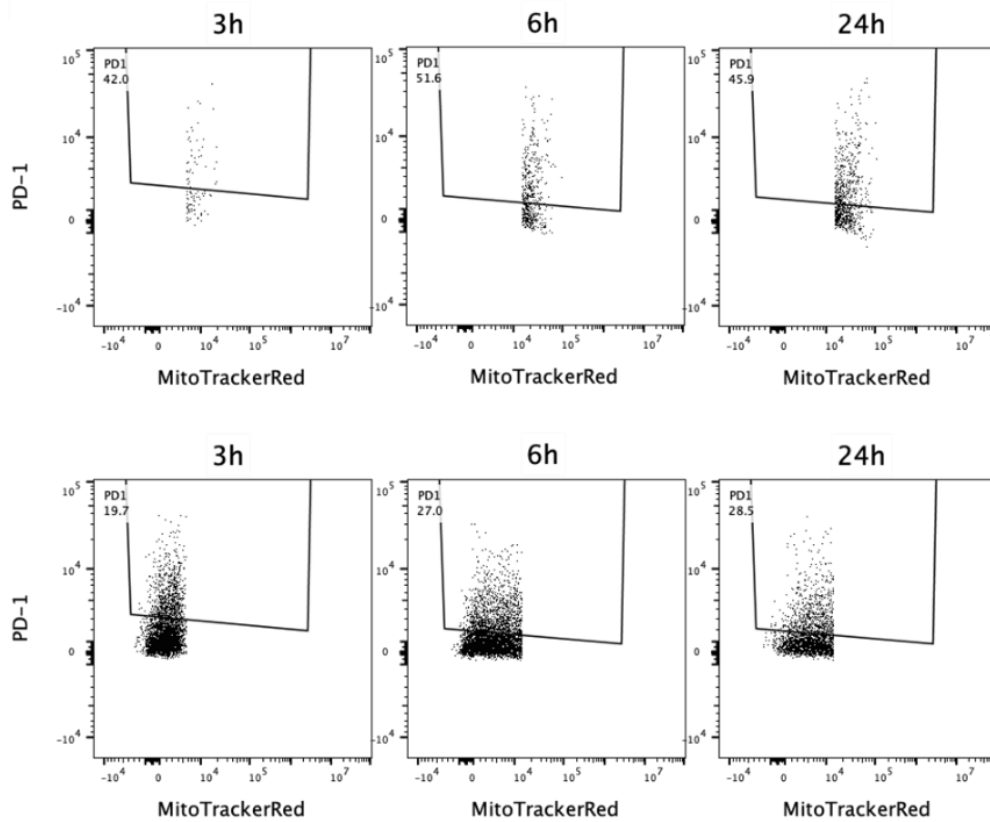
Figura 10. Efecto de inhibidores sobre transferencia mitocondrial desde células HSC-3 hacia linfocitos T CD4⁺.

6.2 Determinar la expresión de PD-1 en linfocitos T posterior a transferencia mitocondrial desde células HSC-3 hacia los linfocitos T CD4⁺.

Los receptores de carácter inhibitorio desempeñan un papel esencial en la respuesta inmune, modulando los procesos inflamatorios y evitando una activación excesiva del sistema inmunológico. Diversos estudios han demostrado que la transferencia mitocondrial puede influir en la expresión de estos

receptores, como es el caso de PD-1, regulador clave de la respuesta de los linfocitos T. En este contexto, nuestro objetivo fue evaluar el impacto de la transferencia mitocondrial natural sobre la expresión de PD-1 en linfocitos T CD4⁺, posterior al sistema de cocultivo con células HSC-3 con tiempos de incubación de 3, 6 y 24 h como se observa en la Figura 11.

A)



B)

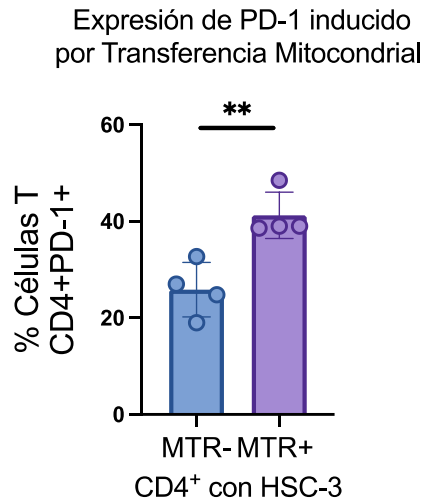


Figura 11. Expresión de PD-1 en linfocitos T CD4⁺ post cocultivo con células HSC-3. (A) Análisis por citometría de flujo de la expresión de PD-1, los paneles superiores muestran linfocitos T CD4⁺ que adquirieron mitocondrias marcadas con MitoTracker Red (MTR⁺) en comparación con los paneles inferiores corresponden al control, linfocitos que no recibieron mitocondrias (MTR⁻). (B) Cuantificación del porcentaje de células CD4⁺ que expresan PD-1 en relación con la transferencia mitocondrial. Los datos indican un aumento significativo en la expresión de PD-1 en la población MTR⁺ en comparación con MTR⁻ (**, $p < 0.01$).

6.3 Evaluar la expresión diferencial de proteínas asociadas a mecanismos de transferencia mitocondrial en base de datos proteómicos obtenidos de secretoma de biopsias de cáncer oral y biopsias orales sin cáncer.

El análisis del secretoma (el conjunto de proteínas secretadas por las células) puede proporcionar información clave sobre las moléculas involucradas en este

proceso. Este estudio busca evaluar la expresión diferencial de proteínas asociadas a la transferencia mitocondrial mediante el análisis de bases de datos proteómicas obtenidas a partir del secretoma de biopsias de cáncer oral y de tejido oral sin cáncer. Identificar variaciones en la expresión de estas proteínas podría aportar nueva información sobre los mecanismos que favorecen la comunicación intercelular en el microambiente tumoral y su posible impacto en la progresión del cáncer. Este análisis se realizó a través del análisis mediante Ingenuity Pathway Analysis (IPA).

A continuación, se presentan tablas con la información detallada sobre diferentes vías canónicas identificadas con expresión aumentada o disminuida:

Ingenuity Canonical Pathways	$-\log(p\text{-value})$	Ratio	z-score
Extracellular matrix organization	2,19E+01	3,18E-01	0,686
Signaling by ROBO receptors	2,05E+01	2,04E-01	2,449
Degradation of the extracellular matrix	1,59E+01	3,09E-01	0,6
Assembly of collagen fibrils and other multimeric structures	1,57E+01	3,61E-01	1,279
Collagen degradation	1,30E+01	3,12E-01	0,447

Actin Cytoskeleton Signaling	1,26E+01	1,55E-01	0,928
RHO GTPases activate PAKs	1,03E+01	5,24E-01	1,508
Collagen biosynthesis and modifying enzymes	8,60E+00	2,39E-01	0,5
RHO GTPase cycle	8,59E+00	0,1	1,043
Collagen chain trimerization	8,33E+00	2,95E-01	0,277
Regulation of Actin-based Motility by Rho	6,14E+00	1,55E-01	1,069
RHO GTPases activate IQGAPs	5,74E+00	2,81E-01	1,667
Signaling by Rho Family GTPases	5,53E+00	1,02E-01	0,853
RHO GTPases activate KTN1	4,55E+00	4,55E-01	1,342
RHO GTPases activate CIT	4,31E+00	3,16E-01	2,449
RHO GTPases Activate ROCKs	4,31E+00	3,16E-01	1,633
RHO GTPases activate PKNs	4,22E+00	2,50E-01	1,89
Actin Nucleation by ARP-WASP Complex	3,23E+00	1,21E-01	2,714
RHO GTPases Activate Formins	3,09E+00	0,1	2,673
RHO GTPases Activate WASPs and WAVES	2,29E+00	1,40E-01	1,633
Kinesins	1,08E+00	8,06E-02	2,236

Tabla III. Vías de señalización asociadas a mecanismos de transferencia mediada por nanotubos

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)	Ratio	z-score
Clathrin-mediated Endocytosis Signaling	1,55E+01	1,84E-01	ns
Caveolar-mediated Endocytosis Signaling	1,26E+01	2,80E-01	2,121

Phagosome Maturation	1,14E+01	1,81E-01	ns
Binding and Uptake of Ligands by Scavenger Receptors	9,64E+00	1,93E-01	-2,558
Intra-Golgi and retrograde Golgi-to-ER traffic	7,27E+00	1,27E-01	3
Clathrin-mediated endocytosis	6,46E+00	1,47E-01	0,688
Cargo recognition for clathrin-mediated endocytosis	5,06E+00	1,43E-01	-0,775
Translocation of SLC2A4 (GLUT4) to the plasma membrane	4,14E+00	1,53E-01	2,111
trans-Golgi Network Vesicle Budding	4,03E+00	1,49E-01	2,714
RAB GEFs exchange GTP for GDP on RABs	1,71E+00	8,89E-02	2,828

Tabla IV. Vías de señalización asociadas a mecanismos de transferencia mediada por microvesículas.

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)	Ratio	z-score
Integrin cell surface interactions	1,64E+01	3,06E-01	0,392
Remodeling of Epithelial Adherens Junctions	1,26E+01	2,99E-01	1,265
Tight Junction Signaling	7,81E+00	1,40E-01	ns
Epithelial Adherens Junction Signaling	7,63E+00	1,46E-01	0,426
Cell junction organization	7,31E+00	1,85E-01	1
Integrin Signaling	6,03E+00	1,17E-01	0,426
Gap junction trafficking and regulation	2,55E+00	1,37E-01	1,134
Gap Junction Signaling	1,48E+00	5,94E-02	0,5

Tabla V. Vías de señalización asociadas a mecanismos de transferencia mediada por uniones estrechas.

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)	Ratio	z-score
Microautophagy Signaling Pathway	1,44E+01	2,04E-01	4,359
Aggrephagy	3,69E+00	1,82E-01	1,414
Chaperone Mediated Autophagy Signaling Pathway	2,25E+00	6,35E-02	-0,426
Mitophagy	1,21E+00	0,1	-1
Autophagy	9,54E-01	5,58E-02	0,333

Tabla VI. Vías de señalización asociadas a mecanismos de transferencia mediada extrusión.

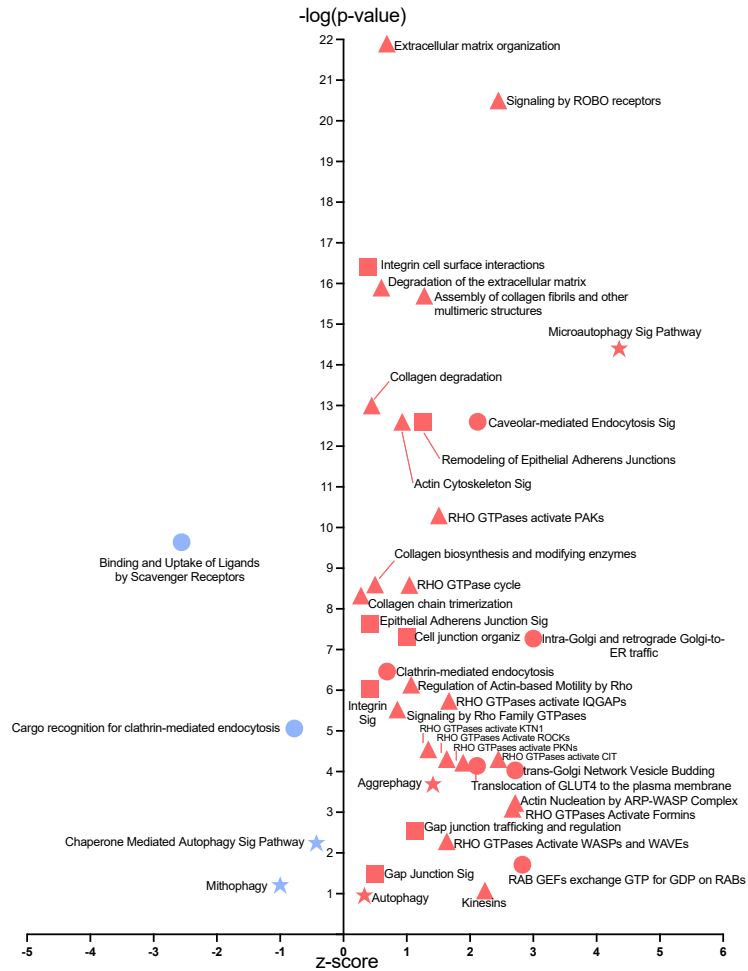


Figura 12. Análisis de vías y mecanismos asociados a la transferencia mitocondrial y procesos celulares relacionados. Representación gráfica de las vías de señalización y mecanismos moleculares asociados a la transferencia mitocondrial. El z-score se utiliza para indicar la significancia estadística de la activación o inhibición de las vías, valores positivos sugieren activación y valores negativos indican inhibición. En rojo aumento de la expresión de la vía, en azul disminución de la expresión de la vía. Las formas representan diferentes tipos de procesos: triángulos para vías asociadas a mecanismos de transferencia mitocondrial mediada por nanotubos, círculos para vías asociadas a mecanismos de transferencia mitocondrial mediada por vesículas extracelulares, cuadrados para vías asociadas a mecanismos de transferencia mitocondrial mediada por uniones comunicantes, y estrellas para vías asociadas a mecanismos de transferencia mitocondrial mediada por extrusión de organelos. Los datos sugieren una interconexión compleja entre la transferencia mitocondrial y múltiples vías celulares, lo que podría tener implicaciones en la homeostasis celular y la respuesta a estímulos externos.

7. DISCUSIÓN

Las células cancerígenas poseen la capacidad de regular la respuesta inflamatoria mediante diferentes mecanismos inmunosupresores, sin embargo, existen ciertos aspectos que aún no se han esclarecido. La comunicación intercelular es esencial en la regulación de la homeostasis, ya que intercambio de elementos permite la transmisión de señales de una célula a otra influyendo en procesos bioquímicos y metabólicos. En este marco, las células neoplásicas producen ATP gracias a glicólisis aerobia, lo que le permite a la masa tumoral incrementar su potencial invasivo, a pesar de contar con mitocondrias funcionales (Vander Heiden, M. 2009). Sin embargo, muchas de estas mitocondrias están sometidas constantemente a factores como la hipoxia y la generación y exposición a ROS en el contexto de un microambiente tumoral proliferante. La acumulación de radicales libres que comienza a dañar el ADNmt e interviene con procesos como la biogénesis mitocondrial, gatillando un ciclo vicioso de disfunción mitocondrial (Gogvadze, V. 2008).

No obstante, existe un fenómeno que podría significar el rescate de estas células mitocondrialmente impedidas. Se ha constatado que la transferencia de mitocondrias posee la capacidad restaurar la actividad metabólica y, en consecuencia, la funcionalidad de células sometidas a estrés mitocondrial (Borcherding, N. 2023). Por otra parte, Scharping y colaboradores observaron que las células T infiltrantes de tumor experimentan una pérdida de la función y masa mitocondrial, un fenómeno previamente descrito en incubaciones prolongadas en sistemas *in vitro* (Scharping, N. E. 2016).

En consecuencia a los antecedentes descritos por los diferentes investigadores, nos dispusimos a estudiar el efecto de la transferencia de mitocondrias desde células de carcinoma oral de células escamosas, un cáncer altamente invasivo, a linfocitos T CD4⁺ en un sistema de cocultivo. En virtud de esto se pudo apreciar que el porcentaje de células CD4⁺MTR⁺ aumenta en función del tiempo. A las 3 h se pudo visualizar una tendencia al ascenso en la transferencia (Figura 7b), alcanzando un máximo de 33,6% a las 24 horas (Figura 7a). Este sistema de cocultivo nos permitió evaluar la transferencia facilitada por el contacto entre células y por vías sin contacto, lo que implicaría la posible intervención de estructuras como los nanotubos y uniones comunicantes.

Los nanotubos son un modelo se ha evaluado en otras investigaciones, en los cuales se evidenció la generación de protrusiones membranosas que alcanzaban los 100 μm de largo y 2 μm de ancho, entre células cancerígenas y células inmunes (Saha, T 2022). Similares dimensiones se encontraron en nanotubos generados entre dos líneas de células neoplásicas de vejiga T24 y RT4 (Lu, J. 2017). En ambos casos se confirmó el tráfico de mitocondrias facilitado por los nanotubos.

A pesar de que en esta investigación no se utilizaron inhibidores de uniones comunicantes, es importante considerarlo como potencial mecanismo de transferencia, puesto a que existe evidencia que demuestra que la proteína Cx43 es requerida en la transferencia de mitocondrias mediada por la incorporación de vesículas de doble membrana llamadas conexosomas, estructura resultante de la internalización de la unión comunicante por parte de una las células (Norris, R. P. 2021). Incluso se demostrado que Cx43 facilita la transferencia mitocondrial mediante mecanismos que incluyen el tráfico directo de Ca^{2+} y ROS (Wang, C.2024).

Por otra parte, también determinamos el porcentaje de transferencia en sistema de cocultivo en placas Transwell (Figura 8a y b), sistema que permite cultivar las

células HSC-3 y linfocitos T separados en dos compartimientos, gracias a una membrana porosa que media el intercambio de elementos pero que obstaculiza el contacto directo entre células. Esto nos permite estimar la contribución que tienen los mecanismos independientes de contacto sobre el porcentaje total de transferencia mitocondrial en la célula T receptora. Al cabo de 24 horas la transferencia alcanzó el 1,89%. Esto nos sugiere que mecanismos de transferencia como vesículas extracelulares o extrusión de organelos poseen una menor contribución en tráfico de mitocondrias completas en estas células.

Sin embargo, existen múltiples estudios que evidencian el transporte de elementos mitocondriales tales como ADNmt y proteínas mitocondriales mediante vesículas extracelulares, como el estudio que determinó su presencia en plasma de pacientes con cáncer (Li, Yijie. 2020). Inclusive, en el medio condicionado de células MSCs se encontró la presencia de microvesículas y cuerpos multivesiculares que contenían mitocondrias parcialmente despolarizadas, las cuales se sugieren fueron seleccionadas en el proceso de la mitofagia debido a su co-localización con el marcador de autofagosomas LC3 (Phinney, D. G. 2015). El bajo porcentaje de transferencia en este sistema se podría deber a que la liberación de mitocondrias completas mediante en células HSC-3 podría ser un evento poco frecuente o incluso ineficiente, debido al tamaño de esta mitocondria en particular que alcanza un diámetro de 1 μm .

Mecanismos que incluyen la extrusión de la mitocondria ya sea libre o asociada a microvesículas, podrían implicar la degradación de éstas en el espacio extracelular antes de ser captada por la célula receptora.

No obstante, hay que considerar que estos modelos la transferencia *in vitro* dependen casi exclusivamente de las interacciones inherentes entre estas células, y carece de la influencia de las distintas moléculas bioactivas que se encuentran presente en el microambiente tumoral. Es por ello, que también analizamos el efecto de distintas citoquinas como IL-6, IL-15, y TNF- α , las cuales tienen una expresión elevada en saliva de pacientes con COCE (Adamov, A. 2024) (Riccardi, G. 2022), IL-23 que promueve el crecimiento y proliferación en COCE (Fukuda, M. 2010), y otras biomoléculas de interés como el lipopolisacárido, debido a la fuerte asociación entre el COCE y periodontitis (Di Spirito, F. 2023). A pesar de lo descrito, ninguno de los moduladores inmunológicos utilizados en este estudio generaron una variación estadísticamente significativa en el porcentaje de transferencia (Figura.9). Si bien se ha postulado que muchas de estas moléculas actúan como biomarcadores de COCE, los resultados obtenidos plantean que estos no poseen influencia sobre el tráfico de mitocondrias entre células HSC-3 y células T CD4⁺, independiente de su alta expresión en esta patología.

Los resultados reflejados en las Figura 7 y Figura 8 nos permitieron estimar el aporte de los mecanismos de transferencia mitocondrial dependiente e independiente de contacto sobre el porcentaje total de transferencia, sin embargo, para esclarecer la contribución de cada uno, estudiamos el impacto de inhibidores de nanotubos (CytoB), inhibidor de microvesículas (GW) e inhibidor de la autofagia (3-MA) sobre este sistema. A pesar de que no se observan diferencias estadísticamente significativas con el uso de inhibidores, esto podría deberse a un fallo experimental o a factores no controlados en el estudio, ya que para este experimento a diferencia de los otros realizados en este estudio, se utilizó mitocondrias marcada fluorescentemente con EGFP.

Como mencionamos con anterioridad, nuestro grupo de investigación determinó que la transferencia mitocondrial mediante MitoCeption genera un perfil inmunoregulador en las células T, que se distinguen por su baja secreción de citoquinas y la alta expresión de receptores reguladores. Por este motivo, quisimos determinar si estos resultados se replicaban en el contexto de una transferencia natural, por lo cual evaluamos la expresión de PD-1 en células T posterior al cocultivo con células HSC-3. Como resultado se rectificó que los linfocitos que adquirieron mitocondrias (MTR⁺) poseían un incremento estadísticamente significativo en la expresión de PD-1 comparado con los linfocitos T que fueron cocultivados con células HSC-3 pero que no adquirieron

mitocondrias (MTR⁻) (Fig. 5). Esto indicaría que la transferencia mitocondrial juega un papel importante en la regulación de las funciones anti-tumorales, ya que PD-1 tiene la capacidad de modular mediadores intracelulares que generan la atenuación de receptores activadores como TCR y receptores coestimuladores, o, directamente generando competencia por el ectodominio de otros ligandos, además de intervenir en la inducción de genes inhibitorios (Wherry, E. J. 2015).

La comunicación intercelular es un proceso fundamental para mantener la coordinación de las respuestas colectivas en los tejidos. En este contexto, los nanotubos de membrana (TNTs) han emergido como una de las principales estructuras especializadas que median la transferencia directa de mitocondrias. La formación y función de estos nanotubos dependen de la reorganización minuciosa del citoesqueleto y de la activación de vías de señalización específicas que orquestan la generación de estas prolongaciones. Respecto a las vías de señalización que podrían estar involucradas en los mecanismos de transferencia mediada por nanotubos, identificadas a partir del análisis del secretoma de células de carcinoma oral de células escamosas presentadas en la Tabla III, destacan la organización de la matriz extracelular. Esta vía hace referencia a la red de proteínas que mantienen la organización de la matriz. Por lo tanto, la alteración de esta puede afectar procesos como la adhesión celular, la reparación

de tejidos, e incluso puede favorecer la progresión de ciertas patologías como el cáncer (Larsen, M. 2006). Esta vía cuenta con una alta significancia, pero activación moderada. Otra vía destacada es la señalización mediada por receptores ROBO, la cual inicialmente se descubrió debido a su papel en la guía axonal durante el desarrollo del sistema comisural (Friocourt, F. 2017). En el presente se asocia con procesos de angiogénesis, invasión tumoral, migración celular y metástasis (Gara, R. K 2015). La activación de estos receptores desencadena el reclutamiento de una serie de proteínas adaptadoras, incluyendo la familia de proteínas Rho GTPasas como RhoA, RAC1 y Cdc42 (Tong, M. 2019). Por lo demás, existe una expresión y actividad relevante en la señalización por GTPasa de la familia Rho en el secretoma cancerígeno evaluado. Esta vía activa a una serie de proteínas efectoras también presentes en el secretoma como IQGAPs regulador clave del citoesqueleto de actina y adhesión celular (Briggs, M. W. 2003), KTN1 que regula la longitud, organización y número de microtubos al actuar como mediador por medio de RhoG (Vignal, E. 2001). ROCKs y PKN quinasas que modulan las vías que alteran el comportamiento del citoesqueleto en respuesta a estímulos (Guan, G. 2023) (Mukai, H. 1997). Apesar de que la relación entre estas quinasas y nanotubos es poco explorada, la formación y estabilidad de estos dependen de la dinámica del citoesqueleto, sumado a la evidencia que relaciona las Rho GTPasas con la reorganización del citoesqueleto de actina y la formación de protrusiones membranosas, gracias a la coordinación de la polimerización y despolimerización de actina (Zhang, S.

2020). La activación de esta vía podría significar que está promoviendo la formación de nanotubos.

Otro de los mecanismos relevantes son las vesículas extracelulares, que transportan proteínas, lípidos y material genético, modulando funciones en las células receptoras. La formación, liberación y reconocimiento de estas vesículas está regulada por diversas vías. En la Tabla IV, se presentan las vías de señalización asociadas a mecanismos de transferencia mediada por microvesículas, cuya expresión se encontró alterada en secretoma de células de carcinoma. En primer lugar, tenemos la señalización mediada por endocitosis dependiente de clatrina, que, a pesar de no poseer una activación significativa en el contexto estudiado, el p-value indica que las moléculas asociadas a la vía están presentes en cantidades significativas. Esta vía está asociada principalmente a la internalización de receptores y transportadores transmembrana, gracias a lo cual la célula es capaz de modular la duración e intensidad de las señales que recibe del entorno (Mettlen, M. 2018). No obstante, también regula la liberación y captación de microvesículas como los exosomas mediante la formación de vesículas cubiertas de clatrina, facilitado por la hidrólisis de GTPasas (Gonda, A. 2019) (Mulcahy, L. A. 2014). Esto es posible gracias a expresión de proteínas y lípidos en la superficie de las microvesículas, los cuales se asocian a los receptores en la membrana plasmática (Tian, T. 2014). Existe

una relación entre esta vía y la formación de vesículas a partir de la red trans-Golgi la cual también se encuentra regulada positivamente. La network trans-Golgi clasifica el empaquetamiento de diferentes elementos celulares en vesículas cubiertas de clatrina (Robinson, D. G. 2014), las cuales tendrán diferentes destinos como la secreción a través de la membrana plasmática, o, la redirección a la fusión con endosomas y lisosomas (Gu, F. 2001). También existe una fuerte activación de la señalización de la endocitosis mediada por caveolas. Tanto la caveolas y clatrina son proteínas citosólicas que generan alteraciones en la membrana plasmática que permite la internalización de diversos componentes (Conner, S. D. 2003). Sin embargo, la endocitosis facilitada por clatrina es altamente selectiva y mediada principalmente por receptores, mientras que la endocitosis gestionada por caveolas se relaciona más bien con dominios ricos en lípidos y proteínas asociadas a lípidos (McMahon, H. T. 2011). Los elementos endocitados por estos mecanismos miden entre 50 y 100 nm (Doherty, G. J. 2009), por lo cual la captura de una mitocondria completa contenida en MVs mediante estos mecanismos es muy poco probable, lo cual explicaría el pobre efecto del inhibidor de microvesículas GW4869 sobre la transferencia de mitocondrias marcadas en el sistema estudiado. Sin embargo, se ha observado la presencia múltiples componentes mitocondriales tales como proteínas, ARNmt y ADNmt dentro de vesículas extracelulares que cumplen con los diámetros establecidos, por lo cual sería interesante investigar el contenido de las vesículas liberadas por estas células. Otra vía que destaca en este contexto es la del tráfico

intra-Golgi y tráfico retrógrado de Golgi al RE, el cual consiste en un proceso de transporte intracelular que permite la recaptura de proteínas y lípidos desde el aparato de Golgi hacia el retículo endoplasmático, y juega un rol fundamental en la regulación del tráfico vesicular, por lo cual esta señalización es crucial para la biogénesis, carga y liberación de vesículas (Pantazopoulou, A. 2019). A pesar de que hay investigadores que han demostrado la presencia de mitocondrias dentro de vesículas extracelulares generadas por MSCs (Phinney, D. G. 2015) y astrocitos (Hayakawa, K. 2016), en este sistema no observamos una transferencia de mitocondrias significativa mediada por vesículas extracelulares.

Como se observa en la Tabla V, en el secretoma también se pueden observar vías de señalización asociadas a integrinas, uniones adherentes, uniones estrechas y uniones comunicantes que muestran una activación y significancia moderada en comparación a otros mecanismos de transferencia evaluados. Entre ellas, las que más destacan son las vías asociadas a la señalización, tráfico y regulación de uniones comunicantes, las cuales facilitan la comunicación directa entre células adyacentes permitiendo el intercambio eficiente de iones, moléculas pequeñas y señales celulares. Este mecanismo es fundamental para mantener la sincronización y coordinación de actividades celulares en diversos tejidos. Existen pocos estudios que describen la transferencia de mitocondrias mediadas por uniones comunicantes, no obstante, se demostró que en células

estromales derivadas de médula ósea con conexina 43 disfuncionales fallaban en transferir mitocondrias a células epiteliales alveolares (Islam, M. 2012), e incluso, otros autores han sugerido que conexina 43 favorece la formación de nanotubos pro-tumorigénicos en cáncer de mama (Tishchenko, A. 2020). A pesar de ello, este mecanismo en general no parece aportar de manera significativa a la transferencia de mitocondrias entre células HSC-3 y linfocitos T CD4⁺.

La Tabla VI muestra las principales vías de señalización asociadas a mecanismos de transferencia mediados por extrusión.

Como se observa, se ve un comportamiento distinto en el perfil de proteínas de la biopsia de tejido normal. Se observa un aumento en la expresión en vía de la mitofagia, así como la autofagia mediada por chaperonas. Esto podría implicar un mayor control de la masa mitocondrial, siendo la mitofagia mediada por chaperonas una de las principales rutas de eliminación de mitocondrias disfuncionales o dañadas en células sanas (Hammerling y Gustafsson, 2014).

Por otro lado, en células cancerosas se suelen concentrar agregados proteicos y componentes tóxicos debido a la alta tasa de proliferación y actividad metabólica, por lo cual la señalización de la microautofagia parece ser la más relevante en este contexto. La fuerte activación de esta vía se relaciona con la degradación

rápida y directa de componentes celulares como pequeños organelos dañados o proteínas agregadas (Wang, L. 2023). Esta vía puede ser activada en condiciones en las cuales la célula deba reciclar elementos celulares sin comprometer la integridad de organelos, al remover componentes mitocondriales dañados u oxidados como una forma de control de calidad mitocondrial (Lemasters, J. J. 2014). La regulación de todos estos procesos podría ser una respuesta adaptativa a condiciones celulares específicas como el estrés oxidativo o señales de pro-sobrevivencia. A pesar de la extrusión es un proceso que se asocia principalmente a la maquinaria de la autofagia, aún es un mecanismo pobremente estudiado, por lo cual aún falta estudiar cómo es que se lleva a cabo este proceso.

Los resultados obtenidos en este estudio nos indica que la transferencia de mitocondrias desde células HSC-3 y linfocitos T CD4⁺ ocurre de manera natural, sin la intervención de procesos artificiales e independiente de estimuladores externos como citoquinas y moléculas de origen bacteriano. Esta transferencia modula la expresión de PD-1 en la superficie de linfocitos disminuyendo la actividad pro-tumoral en estas células, sin embargo, es imperativo evaluar otras moléculas inhibitorias y las facultades secretoras post-transferencia para catalogar a estos linfocitos como exhaustos. Por otro lado, también se observó que la transferencia es potenciada mediante el contacto directo entre las células, por lo

que el tráfico estaría siendo generado principalmente por estructuras que conectan ambas células como los nanotubos. Existe plena evidencia que respalda la transferencia intercedida por estas estructuras, sin embargo, también sería de particular interés evaluar la bidireccionalidad de este fenómeno en este sistema, ya que hay investigadores que han demostrado que la transferencia de mitocondrias también ocurre desde células T a células cancerígenas (Zhang, H. 2023). Si bien existen pruebas que sugieren que la transferencia de mitocondrias completas también puede ser mediada por otros mecanismos, sigue siendo necesario esclarecer si esta contribución es lo suficientemente relevante para inducir efectos significativos en la célula receptora. Además, se debe considerar la presencia de otros componentes mitocondriales que podrían estar siendo transferidos mediante estructuras como vesículas y uniones estrechas. No se tiene claridad con respecto a los factores intrínsecos que gatillan esta conversación, no obstante, estudios se ha propuesto que la transferencia de mitocondrias desde células apoptóticas endoteliales y cardíacas hacia MSCs pueden actuar como mensajeros, ya que la degradación de estas mitocondrias mediante mitofagia dentro de las MSCs se asocia con la estimulación de las vías de señalización, las cuales están vinculadas a la biogénesis mitocondrial y el aumento de la donación de mitocondrias sanas desde las células mesenquimales hacia las células dañadas (Rodríguez, A. 2018). Esto puede suponer que existe una conversación finamente regulada entre células durante la transferencia de mitocondrias.

Estos descubrimientos son al menos de interés, ya que se ha observado que existe un número significativo de pacientes oncológicos en los cuales las terapias con bloqueadores del axis PD-1/PD-1L son ineficientes, e incluso generan resistencia lo que puede conllevar a la progresión tumoral. Es por ello, que estudiar las causas que contribuye al aumento de la expresión de PD-1 parece ser un sello distintivo relevante para considerar en la inmunoterapia.

8- CARTA GANTT

Objetivo/Actividad	abr-23	mar-23	may-23	jun-23	jul-23	ago-23	sept-24	oct-24	nov-24	dic-24	ene-25	feb-25	mar-25	abr-25
1. Evaluar transferencia mitocondrial natural (dependiente/independiente de contacto)														
Obtención de linfocitos T CD4+ (aislamiento y activación)	X													
Co-cultivo HSC-3/linfocitos T CD4+ (dependiente de contacto)		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ensayo Transwell (independiente de contacto)							X	X	X	X	X	X	X	X
Efecto de estimuladores (IFN- γ , IL-6, LPS, TNF- α)													X	X
Efecto de inhibidores (CytoB, 3-MA, GW4869)													X	X
2. Expresión de PD-1 en linfocitos T post-transferencia														
Evaluación de PD-1 en co-cultivo HSC-3/linfocitos T CD4+														
3. Análisis proteómico del secretoma de biopsias														
Extracción de proteínas y preparación para LC-MS/MS														
Identificación de proteínas (MSFragger, FragiPipe)														
Análisis bioinformático (REACTOME, IPA)														
Avance de tesis													X	X
Escritura de tesis													X	X
Defensa de tesis														
Objetivo/Actividad														
1. Evaluar transferencia mitocondrial natural (dependiente/independiente de contacto)														
Obtención de linfocitos T CD4+ (aislamiento y activación)	X													
Co-cultivo HSC-3/linfocitos T CD4+ (dependiente de contacto)		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ensayo Transwell (independiente de contacto)							X	X	X	X	X	X	X	X
Efecto de estimuladores (IFN- γ , IL-6, LPS, TNF- α)													X	X
Efecto de inhibidores (CytoB, 3-MA, GW4869)													X	X
2. Expresión de PD-1 en linfocitos T post-transferencia														
Evaluación de PD-1 en co-cultivo HSC-3/linfocitos T CD4+														
3. Análisis proteómico del secretoma de biopsias														
Extracción de proteínas y preparación para LC-MS/MS									X	X				
Identificación de proteínas (MSFragger, FragiPipe)									X	X				
Análisis bioinformático (REACTOME, IPA)									X	X				
Avance de tesis													X	X
Escritura de tesis													X	X
Defensa de tesis														

9. BIBLIOGRAFIA

1. She, Z., Xie, M., Hun, M., Abdirahman, A. S., Li, C., Wu, F., ... & Tian, J. (2021). Immunoregulatory effects of mitochondria transferred by extracellular vesicles. *Frontiers in Immunology*, 11, 628576.
2. Hausman, D. M. (2019). What is cancer?. *Perspectives in biology and medicine*, 62(4), 778-784.
3. Anderson, N. M., & Simon, M. C. (2020). The tumor microenvironment. *Current Biology*, 30(16), R921-R925.
4. Antón, M. S., & Somacarrera Pérez, M. L. (2015). Cáncer oral: genética, prevención, diagnóstico y tratamiento. revisión de la literatura. *Avances en odontoestomatología*, 31(4), 247-259.
5. Oreamuno, Y. V. B. (2016). Carcinoma oral de células escamosas: Reporte de caso y revisión de literatura. *Odovtos-International Journal of Dental Sciences*, 18(1), 61-67.
6. Xiao, Y., & Yu, D. (2021). Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. *Pharmacology & therapeutics*, 221, 107753.
7. Paoletti, C., & Hayes, D. F. (2016). Circulating tumor cells. *Novel Biomarkers in the Continuum of Breast Cancer*, 235-258.

8. Arpinati, L., Carradori, G., & Scherz-Shouval, R. (2024). CAF-induced physical constraints controlling T cell state and localization in solid tumours. *Nature Reviews Cancer*, 24(10), 676-693.
9. Hida, K., Maishi, N., Ryo Takeda, D., & Hida, Y. (2022). The roles of tumor endothelial cells in cancer metastasis. *Exon Publications*, 137-148.
10. Myers, J. A., & Miller, J. S. (2021). Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy. *Nature reviews Clinical oncology*, 18(2), 85-100.
11. Zhu, S., Luo, Z., Li, X., Han, X., Shi, S., & Zhang, T. (2021). Tumor-associated macrophages: role in tumorigenesis and immunotherapy implications. *Journal of Cancer*, 12(1), 54.
12. Hou, R., Wu, X., Wang, C., Fan, H., Zhang, Y., Wu, H., ... & Xu, J. (2025). Tumor-associated neutrophils: Critical regulators in cancer progression and therapeutic resistance. *International Journal of Oncology*, 66(4), 28.
13. Nagasaki, J., & Togashi, Y. (2022). A variety of 'exhausted' T cells in the tumor microenvironment. *International Immunology*, 34(11), 563-570. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxac013>
14. Allison, K. E., Coomber, B. L., & Bridle, B. W. (2017). Metabolic reprogramming in the tumour microenvironment: a hallmark shared by cancer cells and T lymphocytes. *Immunology*, 152(2), 175-184.
15. Baulu, E., Gardet, C., Chuvin, N., & Depil, S. (2023). TCR-engineered T cell therapy in solid tumors: State of the art and perspectives. *Science Advances*, 9(7), eadf3700.
16. Calzada-Fraile, D., & Sánchez-Madrid, F. (2023). Reprogramming dendritic cells through the immunological synapse: a two-way street. *European Journal of Immunology*, 53(11), 2350393

17. Knight, S. C., & Stagg, A. J. (1993). Antigen-presenting cell types. *Current opinion in immunology*, 5(3), 374-382
18. Koh, C. H., Lee, S., Kwak, M., Kim, B. S., & Chung, Y. (2023). CD8 T-cell subsets: heterogeneity, functions, and therapeutic potential. *Experimental & Molecular Medicine*, 55(11), 2287-2299.
19. de León, J., & Pareja, A. (2018). Inmunología del cáncer I: Bases moleculares y celulares de la respuesta inmune antitumoral. *Horizonte Médico* (Lima), 18(3), 80-89.
<https://doi.org/10.24265/horizmed.2018.v18n3.11>
20. O'Garra, A., Steinman, L., & Gijbels, K. (1997). CD4+ T-cell subsets in autoimmunity. *Current opinion in immunology*, 9(6), 872-883.
21. Vasquez, L., Castro, D., León, J. D., & Beltrán, B. (2020). Inmunoterapia en cáncer: de los inicios al premio Nobel. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 37, 115-121.
22. Kroemer, G., Chan, T. A., Eggermont, A. M., & Galluzzi, L. (2024). Immunosurveillance in clinical cancer management. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(2), 187-202.
23. Chuang, Y. M., Tzeng, S. F., Ho, P. C., & Tsai, C. H. (2024). Immunosurveillance encounters cancer metabolism. *EMBO reports*, 25(2), 471-488.
24. Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., & Glimcher, L. H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, 100(6), 655-669.

25. Silva, E. V. D. S., Nascente, E. D. P., Miguel, M. P., Alves, C. E. F., & Moura, V. M. B. D. D. (2021). Elucidating tumor immunosurveillance and immunoediting: a comprehensive review. *Ciência Animal Brasileira*, 22, e-68544.
26. Böttcher, S., & Reis e Sousa, M. (2020). Modulation of the tumor micro-environment by CD8+ T cell-derived cytokines: Implications for cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 11, 7610766. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.7610766>
27. 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.
28. MacIver, N. J., Michalek, R. D., & Rathmell, J. C. (2013). Metabolic regulation of T lymphocytes. *Annual review of immunology*, 31, 259.
29. Macintyre, A. N., Gerriets, V. A., Nichols, A. G., Michalek, R. D., Rudolph, M. C., Deoliveira, D., Anderson, S. M., Abel, E. D., Chen, B. J., Hale, L. P., & Rathmell, J. C. (2014). The Glucose Transporter Glut1 Is Selectively Essential for CD4 T Cell Activation and Effector Function. *Cell Metabolism*, 20(1), 61-72. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.05.004>
30. Thommen, D. S., & Schumacher, T. N. (2018). T cell dysfunction in cancer. *Cancer cell*, 33(4), 547-562.
31. Lin, W. P., Li, H., & Sun, Z. J. (2024). T cell exhaustion initiates tertiary lymphoid structures and turbocharges cancer-immunity cycle. *Ebiomedicine*, 104.
32. Huang, R.-Y., Francois, A., McGray, A. R., Miliotto, A., & Odunsi, K. (2017). Compensatory upregulation of PD-1, LAG-3, and CTLA-4 limits the efficacy of single-agent checkpoint blockade in metastatic ovarian cancer. *OncImmunity*, 6(1), e1249561. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1249561>

33. De Sousa Linhares, A., Leitner, J., Grabmeier-Pfistershammer, K., & Steinberger, P. (2018). Not all immune checkpoints are created equal. *Frontiers in immunology*, 9, 1909.
34. Giancchetti, E., & Fierabracci, A. (2018). Inhibitory receptors and pathways of lymphocytes: the role of PD-1 in Treg development and their involvement in autoimmunity onset and cancer progression. *Frontiers in immunology*, 9, 2374.
35. Wang, Q., Bardhan, K., Boussiotis, V. A., & Patsoukis, N. (2021). The PD-1 Interactome. *Advanced Biology*, 5(9), 2100758.
36. Vargas-Rojas, M. I., Jiménez-Álvarez, L., Ramírez, G., Torres-García, D., Barquera, R., Gastelum-Martínez, A. A., & Zúñiga, J. (2008). PD-1 y sus ligandos como reguladores de la respuesta inmune. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 21(4), 272-279.
37. Wang, M., Qin, L., Thia, K., Nguyen, T., MacDonald, S., Belobrov, S., ... & Neeson, P. J. (2024). Cancer cell-specific PD-L1 expression is a predictor of poor outcome in patients with locally advanced oral cavity squamous cell carcinoma. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 12(10), e009617.
38. Han, Y., Liu, D., & Li, L. (2020). PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *American journal of cancer research*, 10(3), 727.
39. Andrade, R., Restrepo, R., & Vélez, A. (2016). *Patología: Fundamentos básicos de medicina (3a edición)*. Corporación para investigaciones Biológicas CIB.
40. Bonora, M., Missiroli, S., Perrone, M., Fiorica, F., Pinton, P., & Giorgi, C. (2021). Mitochondrial control of genomic instability in cancer. *Cancers*, 13(8), 1914.

41. Sainero-Alcolado, L., Liaño-Pons, J., Ruiz-Pérez, M. V., & Arsenian-Henriksson, M. (2022). Targeting mitochondrial metabolism for precision medicine in cancer. *Cell Death & Differentiation*, 29(7), 1304-1317.
42. Osellame, L. D., Blacker, T. S., & Duchon, M. R. (2012). Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, 26(6), 711-723.
43. Zhang, B., Pan, C., Feng, C., Yan, C., Yu, Y., Chen, Z., ... & Wang, X. (2022). Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation. *Redox Report*, 27(1), 45-52.
44. Chu, C. H., Tseng, W. W., Hsu, C. M., & Wei, A. C. (2022). Image analysis of the mitochondrial network morphology with applications in cancer research. *Frontiers in Physics*, 10, 855775.
45. Senft, D., & Ze'ev, A. R. (2016). Regulators of mitochondrial dynamics in cancer. *Current opinion in cell biology*, 39, 43-52.
46. Wallace, D. C. (2012). Mitochondria and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12(10), 685-698.
47. Beyoğlu, D., & Idle, J. R. (2021). Metabolic rewiring and the characterization of oncometabolites. *Cancers*, 13(12), 2900.
48. Godel, M., Ortone, G., Anobile, D. P., Pasino, M., Randazzo, G., Riganti, C., & Kopecka, J. (2021). Targeting mitochondrial oncometabolites: A new approach to overcome drug resistance in cancer. *Pharmaceutics*, 13(5), 762.
49. Dong, L. F., Rohlena, J., Zabalova, R., Nahacka, Z., Rodriguez, A. M., Berridge, M. V., & Neuzil, J. (2023). Mitochondria on the move: Horizontal

mitochondrial transfer in disease and health. *Journal of Cell Biology*, 222(3), e202211044.

50. Ni, H. M., Williams, J. A., & Ding, W. X. (2015). Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox biology*, 4, 6-13.
51. Picca, A., Faitg, J., Auwerx, J., Ferrucci, L., & D'Amico, D. (2023). Mitophagy in human health, ageing and disease. *Nature Metabolism*, 5(12), 2047-2061.
52. Onishi, M., Yamano, K., Sato, M., Matsuda, N., & Okamoto, K. (2021). Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy. *The EMBO journal*, 40(3), e104705.
53. Chaabane, W., User, S. D., El-Gazzah, M., Jaksik, R., Sajjadi, E., Rzeszowska-Wolny, J., & Łos, M. J. (2013). Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*, 61, 43-58
54. Tinari, A., Garofalo, T., Sorice, M., Esposti, M. D., & Malorni, W. (2007). Mitoptosis: different pathways for mitochondrial execution. *Autophagy*, 3(3), 282-284.
55. Su, J., Song, Y., Zhu, Z., Huang, X., Fan, J., Qiao, J., & Mao, F. (2024). Cell–cell communication: new insights and clinical implications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 196
56. Gurke, S., Barroso, J. F., & Gerdes, H. H. (2008). The art of cellular communication: tunneling nanotubes bridge the divide. *Histochemistry and cell biology*, 129, 539-550

57. Maeder, C. I., Shen, K., & Hoogenraad, C. C. (2014). Axon and dendritic trafficking. *Current opinion in neurobiology*, 27, 165-170.
58. Clancy, J. W., & D'Souza-Schorey, C. (2023). Tumor-derived extracellular vesicles: multifunctional entities in the tumor microenvironment. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 18(1), 205-229.
59. Nalewajska, M., Marchelek-Myśliwiec, M., Opara-Bajerowicz, M., Dziedziejko, V., & Pawlik, A. (2020). Connexins—therapeutic targets in cancers. *International journal of molecular sciences*, 21(23), 9119.2
60. Soares, A. R., Martins-Marques, T., Ribeiro-Rodrigues, T., Ferreira, J. V., Catarino, S., Pinho, M. J., ... & Girao, H. (2015). Gap junctional protein Cx43 is involved in the communication between extracellular vesicles and mammalian cells. *Scientific reports*, 5(1), 13243.
61. Liu, D., Gao, Y., Liu, J., Huang, Y., Yin, J., Feng, Y., ... & Gao, J. (2021). Intercellular mitochondrial transfer as a means of tissue revitalization. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 1-18
62. Spees, J. L., Olson, S. D., Whitney, M. J., & Prockop, D. J. (2006). Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration.
63. Lin, H. Y., Liou, C. W., Chen, S. D., Hsu, T. Y., Chuang, J. H., Wang, P. W., ... & Chuang, Y. C. (2015). Mitochondrial transfer from Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells to mitochondria-defective cells recaptures impaired mitochondrial function. *Mitochondrion*, 22, 31-44.
64. Acquistapace, A., Bru, T., Lesault, P. F., Figeac, F., Coudert, A. E., Le Coz, O., & Rodriguez, A. M. (2011). Human mesenchymal stem cells reprogram adult cardiomyocytes toward a progenitor-like state through partial cell fusion and mitochondria transfer. *Stem cells*, 29(5), 812-824.

65. Islam, M. N., Das, S. R., Emin, M. T., Wei, M., Sun, L., Westphalen, K., ... & Bhattacharya, J. (2012). Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nature medicine*, 18(5), 759-765.
66. Liu, K., Ji, K., Guo, L., Wu, W., Lu, H., Shan, P., & Yan, C. (2014). Mesenchymal stem cells rescue injured endothelial cells in an in vitro ischemia-reperfusion model via tunneling nanotube like structure-mediated mitochondrial transfer. *Microvascular research*, 92, 10-18.
67. Moschoi, R., Imbert, V., Nebout, M., Chiche, J., Mary, D., Prebet, T., ... & Griessinger, E. (2016). Protective mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to acute myeloid leukemic cells during chemotherapy. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 128(2), 253-264.
68. Cho, Y. M., Kim, J. H., Kim, M., Park, S. J., Koh, S. H., Ahn, H. S., ... & Lee, H. K. (2012). Mesenchymal stem cells transfer mitochondria to the cells with virtually no mitochondrial function but not with pathogenic mtDNA mutations. *PloS one*, 7(3), e32778.
69. Zhang, H., Yu, X., Ye, J., Li, H., Hu, J., Tan, Y., Fang, Y., Akbay, E., Yu, F., Weng, C., Sankaran, V. G., Bachoo, R. M., Maher, E., Minna, J., Zhang, A., & Li, B. (2023). Systematic investigation of mitochondrial transfer between cancer cells and T cells at single-cell resolution. *Cancer Cell*, 41(10), 1788-1802.e10. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.09.003>.
70. Gholami, M. D., Saeedi, Y., Heydari, S., Garssen, J., & Falak, R. (2017). Exhaustion of T lymphocytes in the tumor microenvironment: Significance and effective mechanisms. *Cellular immunology*, 322, 1-14.
71. Fraga, M., Yáñez, M., Sherman, M., Llerena, F., Hernandez, M., Nourdin, G., ... & Nova-Lamperti, E. (2021). Immunomodulation of T helper cells by tumor microenvironment in oral cancer is associated with CCR8 expression and rapid membrane vitamin D signaling pathway. *Frontiers in immunology*, 12, 643298.

72. Juan, C. A., Pérez de la Lastra, J. M., Plou, F. J., & Pérez-Lebeña, E. (2021). The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. *International journal of molecular sciences*, 22(9), 4642.
73. Venditti, P., & Di Meo, S. (2020). The role of reactive oxygen species in the life cycle of the mitochondrion. *International journal of molecular sciences*, 21(6), 2173.
74. Nakajima, A., Kurihara, H., Yagita, H., Okumura, K., & Nakano, H. (2008). Mitochondrial extrusion through the cytoplasmic vacuoles during cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 283(35), 24128-24135.
75. Caruntu, A., & Caruntu, C. (2022). Recent Advances in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Clinical Medicine*, 11(21), 6406.
76. Gholizadeh, P., Eslami, H., Yousefi, M., Asgharzadeh, M., Aghazadeh, M., & Kafil, H. S. (2016). Role of oral microbiome on oral cancers, a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84, 552-558.
77. Li, Q., Hu, Y., Zhou, X., Liu, S., Han, Q., & Cheng, L. (2020). Role of oral bacteria in the development of oral squamous cell carcinoma. *Cancers*, 12(10), 2797.
78. Unuma, K., Aki, T., Funakoshi, T., Hashimoto, K., & Uemura, K. (2015). Extrusion of mitochondrial contents from lipopolysaccharide-stimulated cells: Involvement of autophagy. *Autophagy*, 11(9), 1520-1536.
79. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *science*, 324(5930), 1029-1033.

80. Gogvadze, V., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2008). Mitochondria in cancer cells: what is so special about them?. *Trends in cell biology*, 18(4), 165-173.
81. Borchering, N., & Brestoff, J. R. (2023). The power and potential of mitochondria transfer. *Nature*, 623(7986), 283-291.
82. Scharping, N. E., Menk, A. V., Moreci, R. S., Whetstone, R. D., Dadey, R. E., Watkins, S. C., ... & Delgoffe, G. M. (2016). The tumor microenvironment represses T cell mitochondrial biogenesis to drive intratumoral T cell metabolic insufficiency and dysfunction. *Immunity*, 45(2), 374-388.
83. Saha, T., Dash, C., Jayabalan, R., Khiste, S., Kulkarni, A., Kurmi, K., Mondal, J., Majumder, P. K., Bardia, A., Jang, H. L., & Sengupta, S. (2022). Intercellular nanotubes mediate mitochondrial trafficking between cancer and immune cells. *Nature Nanotechnology*, 17(1), 98-106. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-01000-4>
84. 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>
85. Norris, R. P. (2021). Transfer of mitochondria and endosomes between cells by gap junction internalization. *Traffic*, 22(6), 174-179. <https://doi.org/10.1111/tra.12786>
86. Wang, C., & Xie, C. (2024). Unveiling the power of mitochondrial transfer in cancer progression: A perspective in ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research*, 17(1), 233. <https://doi.org/10.1186/s13048-024-01560-8>

87. Li, Yijie, et al. "Next generation sequencing-based analysis of mitochondrial DNA characteristics in plasma extracellular vesicles of patients with hepatocellular carcinoma." *Oncology letters* 20.3 (2020): 2820-2828.
88. Phinney, D. G., Di Giuseppe, M., Njah, J., Sala, E., Shiva, S., St Croix, C. M., Stolz, D. B., Watkins, S. C., Di, Y. P., Leikauf, G. D., Kolls, J., Riches, D. W. H., Deiuliis, G., Kaminski, N., Boregowda, S. V., McKenna, D. H., & Ortiz, L. A. (2015). Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle microRNAs. *Nature Communications*, 6(1), 8472. <https://doi.org/10.1038/ncomms9472>
89. Adamov, A., Bolyarova-Konova, T., Stanimirov, P., Aleksiev, E., Kandilarova, S. M., Miteva, M., Yankova, P., Ishkitiev, N., & Mihaylova, Z. (2024). Cytokines levels in saliva in periodontitis, oral potentially malignant disorders and squamous cell carcinoma. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 38(1), 2423777. <https://doi.org/10.1080/13102818.2024.2423777>
90. Riccardi, G., Bellizzi, M. G., Fatuzzo, I., Zoccali, F., Cavalcanti, L., Greco, A., ... & Barbato, C. (2022). Salivary biomarkers in oral squamous cell carcinoma: a proteomic overview. *Proteomes*, 10(4), 37.
91. Fukuda, M., Ehara, M., Suzuki, S., Ohmori, Y., & Sakashita, H. (2010). IL-23 promotes growth and proliferation in human squamous cell carcinoma of the oral cavity. *International Journal of Oncology*, 36(6), 1355-1365. https://doi.org/10.3892/ijo_00000620
92. Di Spirito, F., Di Palo, M. P., Folliero, V., Cannata, D., Franci, G., Martina, S., & Amato, M. (2023). Oral bacteria, virus and fungi in saliva and tissue samples from adult subjects with oral squamous cell carcinoma: an umbrella review. *Cancers*, 15(23), 5540.
93. Wherry, E. J., & Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature Reviews Immunology*, 15(8), 486-499. <https://doi.org/10.1038/nri3862>

94. Larsen, M., Artym, V. V., Green, J. A., & Yamada, K. M. (2006). The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. *Current opinion in cell biology*, 18(5), 463-471.
95. Friocourt, F., & Chédotal, A. (2017). The Robo3 receptor, a key player in the development, evolution, and function of commissural systems. *Developmental neurobiology*, 77(7), 876-890.
96. Gara, R. K., Kumari, S., Ganju, A., Yallapu, M. M., Jaggi, M., & Chauhan, S. C. (2015). Slit/Robo pathway: a promising therapeutic target for cancer. *Drug discovery today*, 20(1), 156-164.
97. Tong, M., Jun, T., Nie, Y., Hao, J., & Fan, D. (2019). The role of the Slit/Robo signaling pathway. *Journal of Cancer*, 10(12), 2694.
98. Briggs, M. W., & Sacks, D. B. (2003). IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation. *EMBO reports*, 4(6), 571-574.
99. Vignal, E., Blangy, A., Martin, M., Gauthier-Rouviere, C., & Fort, P. (2001). Kinectin is a key effector of RhoG microtubule-dependent cellular activity. *Molecular and cellular biology*, 21(23), 8022-8034.
100. Guan, G., Cannon, R. D., Coates, D. E., & Mei, L. (2023). Effect of the Rho-Kinase/ROCK signaling pathway on cytoskeleton components. *Genes*, 14(2), 272.
101. Mukai, H., Toshimori, M., Shibata, H., Takanaga, H., Kitagawa, M., Miyahara, M., ... & Ono, Y. (1997). Interaction of PKN with α -actinin. *Journal of Biological Chemistry*, 272(8), 4740-4746.

102. Zhang, S., Kazanietz, M. G., & Cooke, M. (2020). Rho GTPases and the emerging role of tunneling nanotubes in physiology and disease. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 319(5), C877-C884.
103. Mettlen, M., Chen, P. H., Srinivasan, S., Danuser, G., & Schmid, S. L. (2018). Regulation of clathrin-mediated endocytosis. *Annual review of biochemistry*, 87(1), 871-896.
104. Gonda, A., Kabagwira, J., Senthil, G. N., & Wall, N. R. (2019). Internalization of exosomes through receptor-mediated endocytosis. *Molecular Cancer Research*, 17(2), 337-347.
105. Mulcahy, L. A., Pink, R. C., & Carter, D. R. F. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of extracellular vesicles*, 3(1), 24641.
106. Tian, T., Zhu, Y.-L., Zhou, Y.-Y., Liang, G.-F., Wang, Y.-Y., Hu, F.-H., & Xiao, Z.-D. (2014). Exosome Uptake through Clathrin-mediated Endocytosis and Macropinocytosis and Mediating miR-21 Delivery*. *Journal of Biological Chemistry*, 289(32), 22258-22267. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.588046>
107. Robinson, D. G., & Pimpl, P. (2014). Clathrin and post-Golgi trafficking: a very complicated issue. *Trends in plant science*, 19(3), 134-139.
108. Gu, F., Crump, C. M., & Thomas, G. (2001). Trans-Golgi network sorting. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58, 1067-1084.
109. Conner, S. D., & Schmid, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422(6927), 37-44.

110. McMahon, H. T., & Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(8), 517-533.
111. Doherty, G. J., & McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annual review of biochemistry*, 78(1), 857-902.
112. Pantazopoulou, A., & Glick, B. S. (2019). A kinetic view of membrane traffic pathways can transcend the classical view of Golgi compartments. *Frontiers in cell and developmental biology*, 7, 153.
113. 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>
114. Tishchenko, A., Azorín, D. D., Vidal-Brime, L., Muñoz, M. J., Arenas, P. J., Pearce, C., ... & Aasen, T. (2020). Cx43 and associated cell signaling pathways regulate tunneling nanotubes in breast cancer cells. *Cancers*, 12(10), 2798.
115. Hammerling, B. C., & Gustafsson, Å. B. (2014). Mitochondrial quality control in the myocardium: cooperation between protein degradation and mitophagy. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 75, 122-130.
116. Wang, L., Klionsky, D. J., & Shen, H. M. (2023). The emerging mechanisms and functions of microautophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 24(3), 186-203.
117. Lemasters, J. J. (2014). Variants of mitochondrial autophagy: Types 1 and 2 mitophagy and micromitophagy (Type 3). *Redox Biology*, 2, 749-754. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.06.004>

118. Zhang, H., Yu, X., Ye, J., Li, H., Hu, J., Tan, Y., Fang, Y., Akbay, E., Yu, F., Weng, C., Sankaran, V. G., Bachoo, R. M., Maher, E., Minna, J., Zhang, A., & Li, B. (2023). Systematic investigation of mitochondrial transfer between cancer cells and T cells at single-cell resolution. *Cancer Cell*, 41(10), 1788-1802.e10. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.09.003>

119. Rodriguez, A.-M., Nakhle, J., Griessinger, E., & Vignais, M.-L. (2018). Intercellular mitochondria trafficking highlighting the dual role of mesenchymal stem cells as both sensors and rescuers of tissue injury. *Cell Cycle*, 17(6), 712-721. <https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1445906>

12. ANEXOS

a. Manejo de residuos

El material biológico de residuo remanente a la separación de células será eliminado según las normas establecidas por el Plan de manejo de sustancias y residuos peligrosos de la Universidad de Concepción (MATPEL).

b. Consentimiento informado

La obtención de las muestras de sangre periférica fue obtenidas gracias a por voluntarios sanos después de la aprobación del consentimiento informado.

Acta de Consentimiento

Título del Estudio: "ESTUDIO DE LA REPROGRAMACIÓN METABÓLICA DE CÉLULAS T HELPER EN LA RESPUESTA ANTI-TUMORAL EN PACIENTES CON CÁNCER ORAL"

1. Confirmando que leí y entendí toda la información detallada en el folleto informativo que explica el estudio y tuve la oportunidad de hacer todas las preguntas necesarias.
2. Autorizo y doy mi consentimiento para una toma de muestra de sangre de 10mL (equivalente a 4 cucharadas de té) y el uso del tejido de mi procedimiento quirúrgico odontológico.
3. Entiendo y estoy de acuerdo, que se estudiarán varios parámetros relacionados con el proceso del desarrollo del cáncer y el sistema inmune desde el material obtenido de mis muestras.
4. Entiendo que mi participación es libre y voluntaria y que puedo retirarme cuando quiera del estudio, dando aviso al investigador principal para excluir mis datos.
5. Entiendo que los datos de mi ficha clínica relacionados con el estudio, deberán ser revisados por el Investigador Responsable y los odontólogos indicados para este estudio, únicamente por motivos científicos, por lo que acepto y doy mi autorización para que ellos tengan acceso a este historial médico.
6. Estoy de acuerdo con informar mi participación en este estudio a mi médico tratante.
7. Estoy de acuerdo con ser parte de este estudio y entiendo, autorizo y acepto que mis muestras pueden ser guardadas y usadas para investigaciones, parte de este estudio.

Fecha ___/___/___

Nombre del Paciente/Participante

Firma Paciente/Participante

Nombre del
Investigador responsable

Firma Investigador Responsable

Nombre Director del Centro
o delegado/ Ministro de Fe

Director del Centro o delegado/
Ministro de Fe

