



Universidad de Concepción
Facultad Farmacia

**EFEECTO DE LA TRANSFERENCIA ARTIFICIAL DE
MITOCONDRIAS OBTENIDAS DESDE LÍNEA CELULAR
HSC-3 SOBRE EL FENOTIPO Y METABOLISMO DE
LINFOCITOS T CD4⁺**

POR BÁRBARA EVELYN ANTILEF CÁCERES

Profesora Guía y patrocinante:

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

Profesor co-guía:

Dr. Andy J. Pérez de Armas
Departamento de Análisis Instrumental
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Agosto-2023

Concepción, Chile

I. PÁGINA DE DERECHO DE AUTOR

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

II. AGRADECIMIENTOS

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

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

III. TABLA DE CONTENIDOS:

VI. RESUMEN	8
VII. ABSTRAC	10
1.- INTRODUCCIÓN	12
1.1 Cáncer y respuesta inmune	12
1.1.1 Respuesta inmune defectuosa y fenotipo exhausto de Linfocitos T.....	18
1.2 Metabolismo y respuesta inmune celular:	28
1.3 Metabolómica	34
1.4 Metabolismo alterado en el microambiente tumoral	46
1.5 Transferencia mitocondrial:.....	51
1.5.1 Transferencia mitocondrial y Cáncer:.....	62
2. PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	65
2.1 Problema de investigación:	65
2.2 Pregunta de investigación:	66
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	67
3.1 Hipótesis	67
3.2 Objetivo General	67
3.3 Objetivos específicos:	68
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	69
4.1 Obtención de células receptora y dadora de mitocondrias:	69
4.1.1 Aislamiento de linfocitos T CD4 ⁺	69
4.1.2 Procesamiento de línea celular de cáncer:.....	71
4.1.3 Aislamiento de mitocondrias de células cancerosas:	71
4.2 MitoCeption	73
4.3 Ensayo de proliferación	74
4.4 Ensayo de expresión de moléculas de superficie:	75
4.5 Ensayo de secreción de citoquinas:.....	76
4.6 Análisis metabólico:.....	77
4.7 Análisis de producción de superóxido	79
4.8 Medición de glucosa y lactato en sobrenadante	80

4.9 Análisis de la captación de glucosa a través de 2NBDG.....	81
4.10 Análisis estadístico y análisis de datos.	82
5. RESULTADOS:.....	83
6. DISCUSIÓN:.....	100
7.- ANEXO:	111
7.1 Anexo n°1: Cálculo para el conteo de células en la cámara de Neubauer:..	111
7.2 Anexo n°2: Manejo de residuos biológicos:	111
7.3 Anexo n°3: Documento de proyecto aceptado por el comité de ética, bioética y bioseguridad de la Universidad de Concepción.....	112
8.- BIBLIOGRAFÍA:	113

IV. ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1 Representación de las funciones del linfocito TCD4⁺ en la inmunidad antitumoral. (Tay R et al.,2021).....	17
Ilustración 2: Expresión de PD-1 y su relación con la función efectora en linfocitos T CD8⁺ y TCD4⁺ a través de citometría de flujo (Ahmadzadeh M et al., 2009).....	23
Ilustración 3: Histogramas de la expresión de granzima B, perforina y CD107a de linfocitos TCD8⁺PD-1-, TCD8⁺PD-1HI y TCD8⁺PD-1int en carcinoma hepatocelular obtenidos a partir de citometría de flujo (Ma J et al., 2019)..	25
Ilustración 4: Representación del metabolismo dominante en cada etapa de diferenciación del linfocito T (Angajala A et al.,2018).....	32
Ilustración 5: Representación del metabolismo de células cancerosas y de células normales en medio normal como hipóxico (Xia L et al.,2021).	33
Ilustración 6: Correlación entre las estrategias ómicas utilizadas en biología celular (Sussulini A et al.,2017).	37
Ilustración 7: Diagrama que representa el flujo de trabajo estándar para un experimento de metabolómica. Indicando los diversos procesos en el análisis de metabolitos. (Wishart D et al.,2019).....	39
Ilustración 8: Representación de la alteración mitocondrial en linfocitos T infiltrantes de tumores (TILs) en comparación con linfocitos de bazo y ganglios linfáticos de drenaje (dLN) (Yu Y et al.,2020).....	48
Ilustración 9: Representación de la relación entre la masa mitocondrial y la captación de glucosa con la expresión de receptores inhibitorios en linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) y linfocitos de ganglio drenantes (dNL) y no drenantes (ndLN) (Scharping N et al.,2016).	50
Ilustración 10: Representación del mecanismo de transferencia mitocondrial a través de nanotubo tunelizado (Sahinbegovic H et al., 2020).....	55
Ilustración 11: Representación del mecanismo de transferencia mitocondrial a través de vesículas extracelulares (Torralba D et al., 2016).....	55
Ilustración 12: Representación de la transferencia mitocondrial desde célula madre mesenquimal (MSC) hacia células inmunitarias (Court A et al., 2020).....	60
Ilustración 13: Representación mediante imágenes de fluorescencia de la transferencia mitocondrial desde célula madre mesenquimal hacia linfocito T CD3⁺ (Court A et al., 2020).....	60
Ilustración 14: Representación de la diferenciación a célula T regs por transferencia mitocondrial desde células madre mesenquimales aisladas (MSC) (Court A et al., 2020).....	61
Ilustración 15: Depósito de desechos biológicos, Departamento de bioquímica clínica e inmunología, Universidad de Concepción.	111
Ilustración 16: Documento de aprobación del comité de ética, bioética y bioseguridad de la universidad de Concepción.	112

V. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Eficiencia del aislamiento y marcaje mitocondrial de las células dadoras de mitocondrias HSC-3.....	84
Figura 2: Resultados del proceso de Mitocaption hacia linfocitos T CD4 ⁺ a través de citometría de flujo..	86
Figura 3: Resultados del ensayo de proliferación a través de citometría de flujo.	88
Figura 4: Expresión de moléculas de superficie en los linfocitos TCD4 ⁺ a través de citometría de flujo.	90
Figura 5: Secreción de citoquinas en linfocitos T CD4 ⁺ mitoceptados a través de citometría de flujo.	92
Figura 6: Análisis del metaboloma a través de MetaboAnalyst.	94
Figura 7: Análisis estadístico de 4 señales del S-plot del OPLSDA.	95
Figura 8: Análisis de la producción de superóxido mitocondrial a través del tinte MitoSox.....	97
Figura 9: Representación del consumo y captación de glucosa de linfocitos TCD4 ⁺ mitoceptados y control.	99

VI. RESUMEN

El carcinoma oral de células escamosas (OSCC) es el tipo de cáncer oral más frecuente en Chile y el mundo. Se ha reportado que el microambiente tumoral del OSCC induce una alteración del linfocito T, promoviendo un fenotipo exhausto y una reprogramación metabólica. El organelo principal del metabolismo es la mitocondria y en los últimos años se ha indicado que diversas células tienen la capacidad de transferir mitocondrias, incluyendo la cancerosa. Sin embargo, a la fecha no se ha evaluado si la transferencia de mitocondrias desde células cancerosas hacia los linfocitos T promueve un fenotipo exhausto en el linfocito T helper. El objetivo de este trabajo fue analizar el fenotipo exhausto junto con cambios metabólicos en linfocitos TCD4⁺ post transferencia artificial de mitocondrias (MitoCeption) obtenidas desde la línea celular de cáncer oral HSC-3. La metodología se basó en la estandarización de la transferencia mitocondrial artificial utilizando mitocondrias aisladas y marcadas con MitoTrackerGreen desde células de cáncer oral hacia linfocitos T CD4⁺ a través de MitoCeption. Luego, se analizó la expresión de moléculas de superficie, proliferación y secreción de citoquinas mediada por transferencia mitocondrial tumoral a través de citometría de flujo para así analizar el fenotipo exhausto. Además, se analizó el metaboloma, la producción de superóxido y el metabolismo de la glucosa como lo es la captación y consumo de glucosa y concentración de lactato. En los resultados se observó que los linfocitos TCD4⁺ que adquirieron mitocondrias

presentaron un alza en la expresión de 2 proteínas inhibitoras (TIGIT y CTLA4) y 3 asociadas con fenotipo exhausto (PD-1, PLD-1 y LAG3), en comparación con el grupo control. Además, los linfocitos mitoceptados exhibieron una disminución significativa en la proliferación en comparación con las células control, no mitoceptadas. Para el análisis de citoquinas, se observó una disminución significativa en el grupo mitoceptado en la secreción de IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 e IL-4, citoquinas de la vía TH1 y TH2 en comparación con el control. Los análisis metabolómicos mostraron una reducción del cofactor de la piruvato deshidrogenasa denominado Vitamina B1 o tiamina y un aumento en la producción de superóxido mitocondrial en el grupo mitoceptado versus el control. También se observó un mayor consumo y captación de glucosa en los linfocitos TCD4⁺ mitoceptados con mitocondria tumoral, además de una mayor concentración de lactato en el sobrenadante de estas células a diferencia del control. Por lo tanto, la adquisición de mitocondrias aisladas desde células cancerosas HSC-3 por el linfocito T CD4⁺ induce estrés oxidativo mitocondrial en la célula receptora y una posible reducción del ciclo de Krebs, mediada por la baja de tiamina. Este efecto promueve un metabolismo glicolítico de rescate y un cambio en la funcionalidad del linfocito, promoviendo un fenotipo exhausto y una célula TCD4⁺ disfuncional, afectando así la respuesta anti-tumoral.

VII. ABSTRAC

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most frequent type of oral cancer in Chile and the world. Has been reported that the OSCC tumour microenvironment (TME) induces impaired T cell responses, promoting an exhausted phenotype and metabolic reprogramming. The mitochondria is the main metabolic organelle and in recent years it has been shown that several cells have the capacity to transfer mitochondria, including cancer cells. However, to date, it has not been evaluated whether mitochondrias transfer from cancer cells to T lymphocytes promotes an exhausted phenotype in T helper cells. The aim of this work was to analyse the exhausted phenotype with metabolic changes in TCD4⁺ lymphocytes after artificial transfer of mitochondria (MitoCeption) obtained from the oral cancer cell line HSC-3. The methodology was based on the standardization of artificial mitochondrial transfer using isolated mitochondria and labelled with MitoTrackerGreen from oral cancer cells to CD4⁺ T lymphocytes through MitoCeption. Then, surface molecule expression, proliferation and cytokine secretion mediated by tumor mitochondrial transfer were analyzed by flow cytometry in order to analysed the exhausted phenotype. Also, it was analysed the metabolome, the production of superoxide and glucose metabolism such as the catchment and consumption of glucose and concentration of lactate. The results showed that TCD4⁺ lymphocytes that acquired mitochondria had increased expression of 2 inhibitory proteins (TIGIT and CTLA4) and 3 proteins

associated with exhausted phenotype (PD-1, PLD-1 and LAG3), compared to the control group. In addition, the mitocepted lymphocytes exhibited a significant decrease in proliferation compared to the control, non-mitocepted cells. For cytokine analysis, a significant decrease was observed in the mitocepted group in the secretion of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10, and IL-4, TH1 and TH2 pathway cytokines compared to control. Metabolomic analysis showed a reduction in the pyruvate dehydrogenase cofactor called Vitamin B1 or thiamine and an increase in mitochondrial superoxide production in the mitocepted group versus the control. Also, its observed a high catchment and consumption of glucose in mitocepted CD4⁺ lymphocyte with tumoral mitochondria, in addition of a higher concentration of lactate in supernatant of this cells unlike the control. Therefore, the acquisition of isolated mitochondria from HSC-3 cancer cells by CD4⁺ T lymphocyte induces mitochondrial oxidative stress in the recipient cell and a possible reduction of the Krebs cycle, mediated by low thiamine. This effect promotes a salvage glycolytic metabolism and a change in lymphocyte functionality, promoting an exhausted phenotype and a dysfunctional TCD4⁺ cell, thus affecting the anti-tumor response.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer y respuesta inmune

El cáncer se considera la segunda causa principal de muerte después de las enfermedades cardíacas y se estima que el número de casos aumentará a más de 13,1 millones para 2030 (Sharaf B *et al.*, 2022). El cáncer es una enfermedad multifacética en la que ocurren diversas alteraciones a nivel genómico, epigenómico, transcriptómico, proteómico y/o metabólico (Missiroli S *et al.*, 2020). La mortalidad de los tumores malignos está determinada, en gran parte, por su actividad proliferativa descontrolada, la resistencia de las células tumorales a la muerte apoptótica y su capacidad de invadir los tejidos del anfitrión y metastatizar a distancia (Abbas. 2012). Uno de ellos es el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) que comprende más del 90% de los cánceres de cabeza y cuello. Este cáncer surge del revestimiento escamoso de las superficies mucosas del tracto aerodigestivo superior, incluida la cavidad oral, la faringe, la laringe y el tracto sinonasal (Stasikowska-Kanicka O *et al.*, 2018) Histológicamente, la progresión a HNSCC invasivo sigue una serie ordenada de pasos que comienza con hiperplasia de células epiteliales, seguida de displasia (leve, moderada y grave), carcinoma *in situ* y, finalmente, carcinoma invasivo. Sin embargo, cabe destacar que la mayoría de los pacientes diagnosticados con HNSCC no tienen antecedentes de una lesión premaligna 2030 (Johnson D *et*

al.,2020). Es un cáncer más prevalente en Hombres que en mujeres y como factores de riesgo se ha correlacionado con la exposición a carcinógenos derivados del tabaco, el consumo excesivo de alcohol o ambos (Johnson D *et al.*,2020). Se estima que ocurren 3 millones de nuevos casos alrededor del mundo, esta incidencia sigue aumentando y se prevé que aumente un 30 % para el año 2030 (Johnson D *et al.*,2020) y para el HNSCC de la cavidad oral (OSCC) se sabe que tiene una tasa de supervivencia general a 5 años de solo el 50% (Stasikowska-Kanicka O *et al.*,2018). Para estudios de investigación en este cáncer existen diversas líneas celulares de carcinoma de células escamosas orales, una de ellas es la HSC3, que corresponde a una línea celular de carcinoma de células escamosas de lengua humana.

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

entre el sistema inmunológico y el cáncer es la tolerancia, en donde las células cancerosas se consideran "propias". Esta tolerancia se mantiene mediante múltiples mecanismos, incluidos las células inmunitarias reguladoras, las citoquinas, quimioquinas inmunosupresoras y los llamados "puntos de control inmunológico" que modulan negativamente las funciones inmunitarias (Topalian S *et al.*, 2016).

En una respuesta antitumoral efectiva, el sistema inmunológico innato proporciona la respuesta inicial del cuerpo al dirigir leucocitos preprogramados especializados, como las células asesinas naturales (NK) y los macrófagos hacia las células tumorales. El sistema inmunológico adaptativo, por otro lado, tarda más en activarse y se centra en dianas antigénicas específicas en las células tumorales. La inmunidad adaptativa se basa en los linfocitos B y T, este último tanto linfocito T citotóxico (CD8⁺ o CTL), linfocitos T helper (CD4⁺ o Th) y linfocitos T reguladores (Tregs) (Bell R *et al.*, 2016). Los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTL) son células inmunes de la respuesta adaptativa especializados para atacar el cáncer, y unos de sus mecanismos son la vía de exocitosis de gránulos, por la cual se liberan perforina y granzimas A y B, que realizan las funciones de crear poros en la membrana plasmática de células tumorales y escindir sus sustratos intracelulares respectivamente. Además, secretan citoquinas como el interferón- γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α) para inducir citotoxicidad en las

células cancerosas (Farhood B *et al.*, 2018) e inducen la interacción fas-fasL donde los CTL expresan una proteína de membrana, llamada ligando de Fas (FasL), que se une al receptor mortal Fas, que se expresa en muchos tipos celulares, lo que da lugar a la activación de las caspasas y a la apoptosis de dianas que expresen Fas (Abbas. 2012).

Los linfocitos T CD4⁺ (Th) desempeñan un papel central en el sistema inmunitario y llevan a cabo múltiples funciones, incluida la activación, coordinación, modulación y regulación de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, para así lograr realizar respuestas inmunitarias eficaces contra una variedad de patógenos diferentes, manteniendo la autotolerancia y evitando la autoinmunidad. La regulación de las respuestas inmunitarias de las células Th se logra a través de la secreción de citocinas específicas que, junto con un factor de transcripción regulador "maestro", definen cada subconjunto de células TCD4⁺. En primer lugar, los linfocitos T CD4⁺ naive específicos de antígeno (Ag) se activan primero en los tejidos linfáticos mediante células presentadoras de Ag profesionales (APC) que presentan su antígeno específico en moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y proporcionan señales co-estimuladoras (Raphael I *et al.*, 2020). Las células T CD4⁺ median principalmente la inmunidad antitumoral al ayudar en las respuestas de las células CD8⁺ y producción de anticuerpos por las células B, así como a través de la secreción

de citocinas efectoras como el IFN- γ y TNF- α y, en contextos específicos, a través de la citotoxicidad directa contra las células tumorales en el fenotipo Th1. La ayuda hacia los linfocitos CTL CD8⁺ ocurre a través de la secreción de IL-2, que activa directamente los CTL CD8⁺ que expresan la subunidad α del receptor de IL-2 de alta afinidad (CD25) impulsando su función efectora, diferenciación y proliferación, y a al apoyar a las células dendríticas (CD) por medio de la regulación al alza del ligando CD40 que se acopla a su receptor afín CD40 en las DC para inducir y mantener el perfil tipo I de las DC (expresión de CD70 y secreción de IL-12), cuyas señales inducen fuertemente funciones efectoras antitumorales en los CTL CD8⁺, como la adquisición de citotoxicidad y la secreción de citoquinas citotóxicas como el IFN- γ , y también estimulan la diferenciación a efectora y memoria (Ilustración 1) (Tay R *et al.*, 2021).

Las células T, tanto TCD4⁺ y TCD8⁺ expresan una amplia gama de receptores co-estimuladores y co-inhibidores que pueden proporcionar señales positivas que impulsan la activación de las células T o señales inhibitorias que atenúan la función y/o diferenciación de las células T (McLane L *et al.*, 2015).

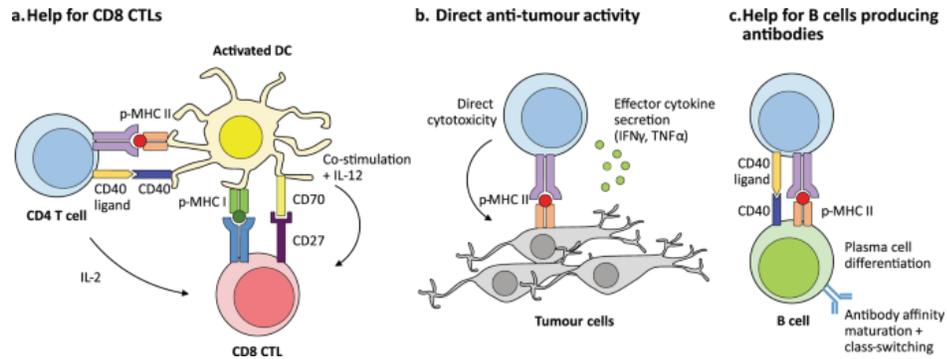


Ilustración 1 Representación de las funciones del linfocito TCD4⁺ en la inmunidad antitumoral. (A) Mecanismo indirecto e indirecto de colaboración entre el linfocito TCD4⁺ y CTL TCD8⁺ mediante interacción con célula dendrítica y mediante la liberación de IL-2 respectivamente. (B) Actividad antitumoral directa mediante la liberación de citoquinas efectoras. (C) Colaboración entre Linfocitos TCD4⁺ y células B productoras de anticuerpos, mediante la interacción CD40-CD40 ligando (Tay R *et al.*,2021).

Existe una población de linfocitos T CD4⁺ que corresponden a los linfocitos Tregs que contiene el factor de transcripción FOXP3 y algunas moléculas asociadas con la activación de las células T: CD25, CTLA-4 y LAG-3. Es una población celular que tienen un papel importante en la auto-tolerancia y la homeostasis inmunológicas durante las respuestas inmunitarias patológicas y fisiológicas ya que son capaces de suprimir la activación, proliferación y funciones efectoras de numerosos tipos de células, incluidos los linfocitos T CD4⁺ (principalmente Th1,2,17 y Th foliculares), CD8⁺, CD, los linfocitos B y las NK (Kanicka O *et al.*,2018) , al secretar citoquinas inmunosupresoras, privación de IL-2, inducción del catabolismo de triptófano y citotoxicidad (Olguín J *et al.*,2018)

1.1.1 Respuesta inmune defectuosa y fenotipo exhausto de Linfocitos T.

A pesar de la respuesta antitumoral de los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺, muchos tumores continúan creciendo, incluso con la presencia de células T específicas al antígeno tumoral infiltradas en el estroma tumoral (Ahmadzadeh M *et al.*, 2009). Esto se debe a un conjunto de características como la alteración del metabolismo, los marcadores de agotamiento, el pH del microambiente tumoral, diversos metabolitos liberados por las células tumorales y las células inmunosupresoras (Xu Y *et al.*, 2021). Con relación al HNSCC, el microambiente tumoral (TME) consta de una mezcla compleja y heterogénea de células tumorales y células del estroma, que incluyen células endoteliales, fibroblastos asociados al cáncer (CAF) y células inmunitarias. Las células tumorales y los CAF producen factores de crecimiento, como VEGF, que reclutan células endoteliales, estimulando la neovascularización y el suministro de oxígeno y nutrientes al tumor. A su vez, las células endoteliales secretan factores que favorecen la supervivencia y autorrenovación de las células madre cancerosas (CSC) (Johnson D *et al.*, 2020).

El componente inmunitario del TME consta de TILs (Linfocitos infiltrantes de tumores) y células de linaje mieloide (incluidos macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y MDSC) cuya composición varía según el subsitio anatómico y el agente etiológico. La inmunidad antitumoral en el TME está mediada en gran

medida por los linfocitos T efectores (T eff) y las células NK, mientras que la supresión inmune y el crecimiento de las células tumorales están mediados por las T reg, células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) y macrófagos M2 inmunosupresor, por ende los niveles elevados de células T eff CD8⁺ y células NK en el TME se asocian con una mejor supervivencia y los niveles elevados de linfocitos T regs, MDSC, macrófagos M2 se asocian con HNSCC en etapa avanzada o mal pronóstico (Johnson D *et al.*,2020).

Los tumores HNSCC evaden la vigilancia inmunológica por varios mecanismos diferentes, ya sea por la polarización a macrófago tipo M2, la disminución de los niveles de antígeno leucocitario humano (HLA) en las células tumorales y defectos en el procesamiento del antígeno producto de las alteraciones genéticas y epigenéticas, induciendo así una disminución del reconocimiento y la citólisis de las células tumorales. Además, existe un alza de citoquinas inmunosupresoras, principalmente IL-6, IL-10, VEGF y TGF- β , que promueven el reclutamiento o la actividad de MDSC, linfocitos Tregs y macrófagos M2 mientras que inhiben los efectos antitumorales de las células T eff y NK. También en etapas avanzadas se observa una regulación al alza de PDL-1, que atenúa la actividad citolítica de los linfocitos T. De manera similar, las MDSC y los linfocitos T regs reclutados en el TME de HNSCC expresan PDL-1 y el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA4) (Johnson D *et al.*,2020).

Además existe un estudio que evidencia una disfunción de los linfocitos T en HNSCC dado por un número reducido de linfocitos TCD8⁺, así como una disminución en la expresión de complejos mayores de histocompatibilidad e inducción de la apoptosis, debido a que las células SCC orales contienen vesículas extracelulares positivas para FasL (Ligando de FAS), que desencadenan la inducción de la apoptosis de las células T, además de la expresión de muerte programada-1 (PD-1), eludiendo la respuesta citotóxica (Curry J *et al.*,2014). También se observa la disminución de CD8⁺ y un aumento de T reg en pacientes con OSCC a diferencia de los sanos (Lim K *et al.*, 2014), además, en otro estudio se observó en células T CD4⁺ y CD8⁺ la expresión al alza de PD-1 y TIM-3, así como un alza de células Tregs Foxp3⁺CD4⁺ en OSCC (Dong Y *et al.*,2021).

La disfunción o alteración de los TILs ocurre debido a una serie de defectos funcionales conocidos colectivamente como "agotamiento" de los linfocitos T o fenotipo exhausto (Vardhana S *et al.*,2020). El agotamiento de los linfocitos T ocurre comúnmente durante las infecciones crónicas y el cáncer debido a la persistencia del antígeno y la inflamación. Está asociado a una pérdida progresiva de las funciones efectoras de las células T, un metabolismo alterado y un programa transcripcional único en comparación con las células T efectoras funcionales (Teff) y de memoria (Tmem) (Pauken K *et al.*, 2015). Las células T

exhaustas expresan altos niveles de receptores inhibitorios (RI), incluidos el PD-1, TIGIT, CTLA-4, LAG-3 y TIM-3, con una disminución de la secreción de IL-2 y la capacidad de destruir células malignas, la secreción del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y la producción de IFN- γ junto con granzima B (GzmB) en una etapa temprana, intermedia y avanzada del agotamiento (Jiang Y *et al.*, 2015), es decir, presentan una menor capacidad proliferativa, supervivencia y función efectora (Lim A *et al.*, 2020). Se sabe que los receptores inhibitorios (RI) han evolucionado para prevenir la sobreactivación de las células inmunitarias durante una respuesta inmune. Sin embargo, durante la infección crónica y el cáncer donde persiste el antígeno, los RI se expresan en niveles altos y sostenidos, lo que lleva a efectos nocivos sobre la capacidad de las células T específicas de antígeno para ejecutar o mantener respuestas inmunitarias sólidas (McLane L *et al.*, 2015). A continuación, se detalla los principales RI:

PD-1: El receptor co-inhibidor de muerte programada-1 (PD-1), también conocido como CD279, es una proteína transmembrana de 55 kDa con 288 aminoácidos de la familia B7-CD28, se expresa en diversas células incluidos los macrófagos, linfocitos B, células NK, monocitos, CD y linfocitos T, y principalmente en aquellas células que están constantemente expuestas al antígeno (Salmaninejad A *et al.*, 2020). Es inducido por el factor de transcripción NFATc1 (Oestreich K *et al.*, 2008) y es capaz de unirse los ligandos de PD-1 (PD-L1 y PD-L2) (Bardhan K *et al.*,

2016), producto de la unión regula negativamente las funciones de las células T, tanto la proliferación, la secreción de citoquinas y supervivencia celular (Tkachev *V et al.*, 2015), considerándolo un punto de control inmunológico que protege contra respuestas autoinmunes (Salmaninejad A *et al.*, 2020). Sin embargo, en el contexto del cáncer, interfiere con la respuesta inmunitaria protectora, ya que las células tumorales expresan PD-L1 como un "mecanismo inmunitario adaptativo", esta expresión está presente en varios tumores sólidos incluidos melanoma, cáncer colorrectal, cánceres de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, carcinoma pancreático y carcinoma hepatocelular (Kanicka O *et al.*, 2018). Por ende, la vía PD-1/PD-L1 controla la inducción y el mantenimiento de la tolerancia inmunitaria dentro del microambiente tumoral (Han Y *et al.*, 2020). El mecanismo de acción es a través de la fosforilación de los residuos de tirosina en los motivos ITIM e ITSM en la cola citoplásmica de PD-1, reclutando así SHP-1 y SHP-2, que a su vez desfosforilan las moléculas de señalización proximal aguas abajo de TCR y CD28, vías de señalización que son fundamentales para la supervivencia, la expansión y diferenciación de células T que reconocen antígenos tumorales (Bardhan K *et al.*, 2016).

En un estudio se observó un aumento de la expresión de PD-1 en CD8⁺ TIL junto con una disminución en la producción de citoquinas en PD-1⁺ frente a PD-1⁻ TIL de melanomas (Pardoll D, 2012) (Gros A *et al.*, 2014). En otro estudio se comparó

las características fenotípicas y funcionales de linfocitos T CD8⁺ y TCD4⁺ en lesiones de melanoma metastásico con células T de sangre periférica (PBL), cuyo resultado reveló una expresión elevada de PD-1 en TIL en comparación con los de PBL, junto con niveles disminuidos de IFN- γ e IL-2, citoquina importante para la proliferación de linfocitos T (Ilustración 2) (Ahmadzadeh M *et al.*, 2009).

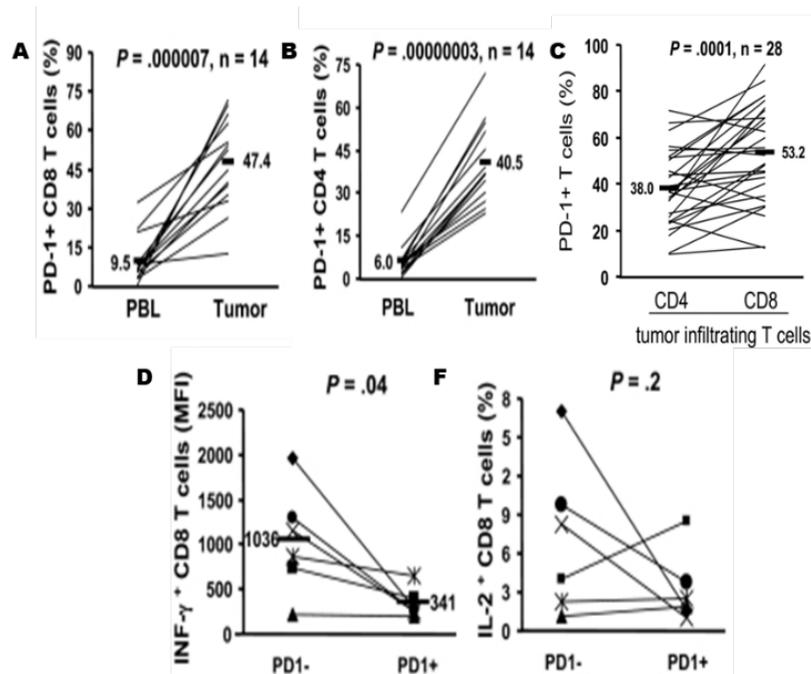


Ilustración 2: Expresión de PD-1 y su relación con la función efectora en linfocitos T CD8⁺ y TCD4⁺ a través de citometría de flujo. En A y B se observa la expresión de PD-1 en T CD8⁺ y T CD4⁺ TILs y en sangre periférica (PBL) respectivamente. En C se compara la expresión de PD1 entre TCD4⁺ y TCD8⁺ TILs. En D se observa la secreción de IFN- γ . E gráfico representativo de la secreción de IL-2 de los linfocitos T CD8⁺ PD-1⁻ y T CD8⁺PD-1⁺ (Ahmadzadeh M *et al.*, 2009).

Además, en otro estudio se observó un aumento en la secreción de citoquinas antiinflamatorias junto con la disminución de las proinflamatorias y expresión de moléculas efectoras junto con el marcador de desgranulación citotóxica de superficie (CD107a) en linfocitos T CD8⁺ que expresaban PD-1 en alto nivel (Ilustración 3) (Ma J *et al.*, 2019). Los altos niveles de PD-1 en linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺ infiltrantes de tumores en cáncer de pulmón se confirmaron al comparar tejido canceroso con tejido sano (Lipp J *et al.*,2022). Ahora centrándonos en el cáncer oral, la expresión de PD-1 se asoció negativamente con el estadio clínico, donde su expresión fue mayor en los pacientes con metástasis en los ganglios linfáticos (Dong Y *et al.*,2021), al igual que otro estudio donde se observó un incremento en la expresión de PDL-1 en muestras de pacientes con OSCC de peor pronóstico en comparación con OSCC de mejor pronóstico y control (Kanicka O *et al.*,2018). Además, se observó una expresión de PDL-1 medido como expresión de proteína y ARNm en las muestras de pacientes con OSCC y esto se asoció con una supervivencia general (SG) y supervivencia libre de enfermedad (DFS) desfavorables (Fu Z *et al.*,2022).

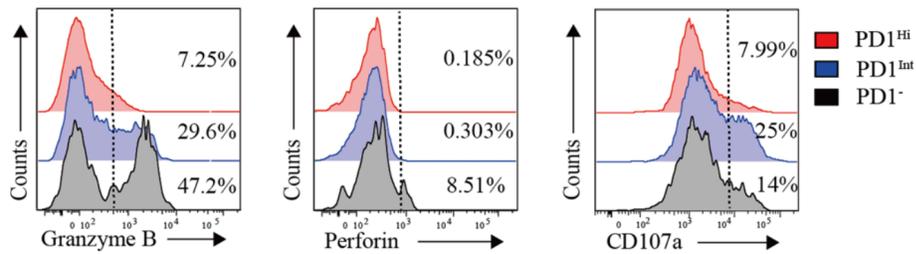


Ilustración 3: Histogramas de la expresión de granzima B, perforina y CD107a de linfocitos TCD8⁺PD-1⁻, TCD8⁺PD-1^{Hi} y TCD8⁺PD-1^{int} en carcinoma hepatocelular obtenidos a partir de citometría de flujo. Linfocitos T CD8⁺ con expresión intermedia (int) y alta (Hi) (Ma J *et al.*, 2019).

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

2020), además de impedir directamente la función de las células T al interrumpir su activación al unirse al CD155 en las CD o uniéndose directamente a CD226 (receptor coestimulador expresado en células inmunitarias) (Chauvin J *et al.*,2020). Su expresión se correlaciona con un mal pronóstico y la co-expresión con PD-1 se asocia con fenotipo disfuncional y menor secreción de citoquinas (Tang S *et al.*, 2020).

CTLA4: El antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) es una proteína intracelular en células T en reposo pero una vez que el receptor de células T y una señal co-estimuladora a través de CD28 participa en la activación del linfocito, el CTLA-4 se transloca a la superficie celular donde supera a CD28 para unirse a moléculas co-estimuladoras críticas (CD80, CD86) y media la señalización inhibitoria en la célula T, lo que resulta en detención tanto de la proliferación como de la activación (Ribas A *et al.*,2018). CTLA-4 también puede inhibir la proliferación de las células T mediante liberación de indoleamina-2, 3-dioxigenasa (IDO) e involucración en las vías de señalización de la célula T (Tang S *et al.*,2020).

LAG3: El gen 3 de activación de linfocitos (Lag-3) es un RI no ITIM que puede funcionar a través de un motivo KIEELE en su cola intracelular para regular negativamente la progresión del ciclo y otras funciones celulares. Lag-3 es

altamente expresado por las células T exhaustas durante infecciones crónicas y por TILs en muchos tipos de cáncer (McLane L *et al.*, 2015).

TIM3: Inmunoglobulina de células T que contiene dominio de mucina-3 (TIM-3) está regulado por el factor de transcripción T-bet y se expresa en varios subconjuntos de células T, incluidos Th1, CD8⁺, Tregs, pero también en CD, macrófagos y monocitos. Aunque se cree que TIM-3 exhibe funciones supresoras, no contiene un motivo ITIM en su dominio intracelular como PD-1 o TIGIT. Es capaz de unirse a la molécula soluble lectina tipo S galectina-9 (Gal-9), que está regulada positivamente por IFN- γ , induciendo mediante vías de señalización una disminución de IFN- γ , el aumento de la apoptosis en Th1 y las células T CD8⁺ citotóxicas *in vitro*. Además, es capaz de unirse a otros ligandos como la molécula de adhesión celular del antígeno carcinoembrionario 1 (CEACAM1), HMGB1 y fosfatidilserina (Catakovic K *et al.*, 2017).

Otra vía asociada a la alteración de los linfocitos son los estados metabólicos, que son reguladores críticos de las funciones efectoras de las células T, de modo que, los cambios en la disponibilidad de nutrientes pueden afectar la actividad de las células T. Por lo tanto, los efectos de las células cancerosas y el metabolismo de las células cancerosas en la TME pueden modular directamente las rutas y actividades metabólicas esenciales de las células T (Sugiura A *et al.*, 2018).

1.2 Metabolismo y respuesta inmune celular:

El metabolismo involucra una red de reacciones bioquímicas que convierten los nutrientes en pequeñas moléculas llamadas metabolitos. A través de estas conversiones y los metabolitos resultantes, las células generan la energía, los equivalentes redox y las macromoléculas (incluidas las proteínas, los lípidos, el ADN y el ARN) que necesitan para sobrevivir y mantener las funciones celulares (Xia L *et al.*,2021). Los alimentos (carbohidratos, proteínas y grasas) se convierten en energía (o trifosfato de adenosina [ATP]) a través del metabolismo (Kalyanaraman *et al.*,2017). Los carbohidratos se descomponen en glucosa, ahí sigue el proceso de glicolisis que implica la descomposición de la glucosa en dos moléculas de piruvato a través de diez reacciones enzimáticas secuenciales dentro del citosol. Esto ocurre a través del transporte de la glucosa a la célula a través de GLUT y cotransportadores de sodio y glucosa (SGLT) a través de la difusión facilitada y su permanencia en la célula a través de la hexoquinasa o glucoquinasa que forma la glucosa-6-fosfato (G6P) (Judge A *et al.*,2020). Una vez completadas todas las reacciones llega al producto de la glicolisis correspondiente al piruvato (Kalyanaraman *et al.*,2017) y acetil-coenzima A (CoA), este último se metaboliza a una serie de intermediarios en la vía del ácido tricarboxílico (TCA), o “ciclo de Krebs”, generando ATP y transportadores de alta energía (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato [NADPH]) que dan como resultado ATP adicionales. La proteína se descompone en aminoácidos que

ayudan a construir moléculas de piruvato y acetil-CoA. Las grasas se catabolizan a una molécula de tres carbonos de cadena pequeña, glicerol y ácidos grasos que ayudan a construir moléculas de piruvato y acetil-CoA (Kalyanaraman *et al.*,2017).

Mientras que la glucólisis y otros procesos metabólicos ocurren en el citoplasma de la célula, muchos procesos están compartimentados dentro de las mitocondrias. Una función clave de la mitocondria es el apoyo que proporciona al ciclo TCA a través de la generación de portadores de electrones para entrar en la cadena de transporte de electrones (CTE), así como en la generación de importantes intermediarios que pueden canalizarse a otros procesos. El movimiento de electrones a través del CTE genera cantidades sustanciales de ATP como parte del programa OXPHOS, pero también produce ROS (Patel C *et al.*,2017). La fosforilación oxidativa (OXPHOS) se refiere a la generación de ATP a partir de ADP y fosfato por la ATP sintasa (o complejo V) utilizando el gradiente de protones establecido a través de la membrana mitocondrial interna. La CTE o cadena respiratoria, consiste en el complejo I o NADH deshidrogenasa, el complejo II, el complejo III y el complejo IV presentes en la membrana mitocondrial interna. NADH y FADH₂, los equivalentes reductores generados por el ciclo TCA, se oxidan a NAD⁺ y FAD, respectivamente. Esto genera energía que se utiliza para bombear protones o iones de hidrógeno desde la matriz

mitocondrial hacia la fase de la membrana interna mediante los complejos I, III y IV y, en última instancia, el aceptor terminal de electrones (oxígeno) para generar dos moléculas de agua. Los gradientes de protones generan un gran componente eléctrico (potencial de membrana), lo que facilita la generación de ATP por el complejo V. La mayor parte del ATP se genera durante la oxidación de NADH y FADH₂ (gradientes de protones establecidos por complejos mitocondriales a través de la membrana mitocondrial interna) y la reducción de oxígeno a agua (Kalyanaraman *et al.*, 2017).

El metabolismo representa un mecanismo clave mediante el cual se puede regular el sistema inmunitario ya que está asociado con el destino y la función de células inmunitarias, como lo son los linfocitos T. Para apoyar la proliferación y función efectora las células se requiere la maquinaria para generar intermediarios bioenergéticos (Scharping N *et al.*, 2016). En la respuesta inmune adaptativa, los linfocitos T utilizan diferentes vías metabólicas para su diferenciación y estado de memoria (Ilustración 4) (Rangel G, *et al.*, 2021) (Angajala A *et al.*, 2018). Las células T naive (T_n) se mantienen en bajas tasas de glucólisis y oxidan predominantemente el piruvato derivado de glucosa a través de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) o activan la oxidación de ácidos grasos (FAO) para producir ATP (Pierce E *et al.*, 2015). Estas células al activarse a fenotipo efector reprograman su metabolismo para satisfacer las demandas bioenergéticas y

biosintéticas de la proliferación clonal y su función efectora, cambiando drásticamente de OXPHOS y FAO a la glucólisis y glutaminólisis que caracterizan a las células Teff, en este proceso al encontrar un antígeno afín, las células T absorben rápidamente glucosa y glutamina, generando lactato como subproducto (Lim A *et al.*, 2020) (McLane L *et al.*, 2015). De hecho, la co-estimulación mediada por CD28 coordina la expresión y el tráfico hacia la superficie celular de numerosos transportadores de nutrientes, incluidos GLUT-1, transportadores de glutamina, aminoácidos y transportadores de lactato monocarboxilato para facilitar la eliminación del lactato producido en la glucólisis aeróbica (Sugiura A *et al.*, 2018). No obstante, es importante recordar que la fosforilación oxidativa (OXPHOS) aún está aumentada, y a pesar de que predomina la glucólisis, la OXPHOS también juega un rol en la diferenciación a célula efectora, donde a través de la OXPHOS se generan ROS que pueden promover la señalización celular inducida por antígeno a través de la modulación de NFAT, lo que demuestra la interconexión entre el metabolismo (la generación de ROS) y la activación de las células T (activación de NFAT) (Patel C *et al.*, 2017). A diferencia de las células Teff, el programa metabólico dominante en las células Treg y Tmem (memoria) es la OXPHOS y FAO (Sugiura A *et al.*, 2018). Por lo tanto, el metabolismo de las células T es muy dinámico y la mitocondria, al ser el organelo principal, también cumple un rol de importancia en este proceso (Angajala A *et al.*, 2018).

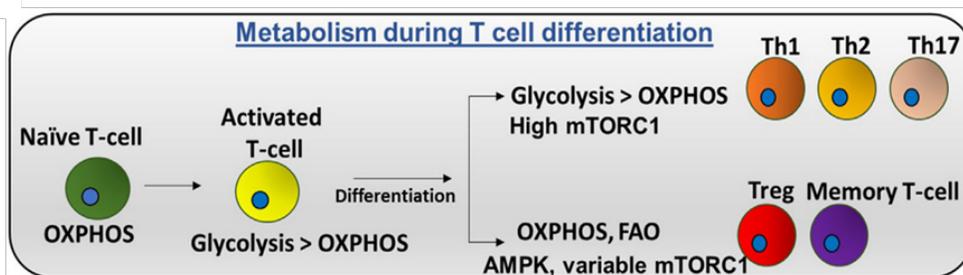


Ilustración 4: Representación del metabolismo dominante en cada etapa de diferenciación del linfocito T (Angajala A *et al.*,2018).

En el contexto tumoral, las células tumorales utilizan diferentes vías metabólicas para producir ATP y macromoléculas biológicas según la concentración de nutrientes externos y las diferentes condiciones de estrés, impulsando así el rápido crecimiento celular y proliferación, un sello distintivo del cáncer (Xia L *et al.*,2021). Para mantener una proliferación rápida, las células tumorales compiten por los nutrientes presentes en los fluidos intercelulares y secretan desechos metabólicos para remodelar la composición metabólica del entorno extracelular y crear un entorno favorable a la progresión del cáncer (Wang Y *et al.*,2020).

Las células cancerosas son altamente glicolíticas y absorben con mayor avidez la glucosa proceso facilitado por la sobreexpresión de varias isoformas de transportadores de glucosa de membrana (GLUT) (Kalyanaraman *et al.*,2017). También utilizan la vía de las pentosas fosfato (PPP) para la replicación celular, la vía del metabolismo de la serina, también utilizan la glutamina, serina, arginina,

ácidos grasos y sustancias lipídicas para generar energía para su propia proliferación. En condiciones hipóxicas, las células tumorales utilizan la glicolisis para generar ATP y ácido láctico a partir del piruvato, pero aun con oxígeno suficiente las células igualmente realizan glucólisis, proceso conocido como glucólisis aeróbica o efecto Warburg (Ilustración 5) (Xia L *et al.*,2021).

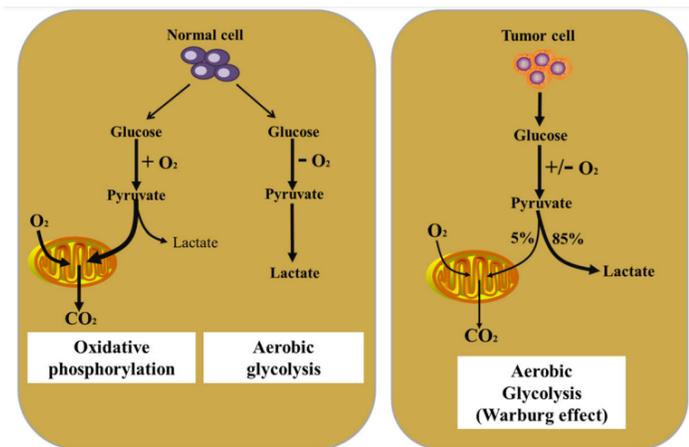


Ilustración 5: Representación del metabolismo de células cancerosas y de células normales en medio normal como hipóxico (Xia L *et al.*,2021).

1.3 Metabolómica

Para sostener el crecimiento maligno, las células cancerosas miden la disponibilidad de nutrientes para coordinar el metabolismo celular. La desregulación de las vías metabólicas, también conocida como reprogramación metabólica, es una característica clave de las células cancerosas. Las vías metabólicas reprogramadas remodelan el metaboloma del cáncer (es decir, la abundancia de metabolitos), lo que permite que las células cancerosas modulen la señalización oncogénica con metabolitos específicos. Las células cancerosas pueden detectar y utilizar las señales de un amplio espectro de metabolitos para promover la tumorigénesis y la metástasis, incluidos los metabolitos intermedios del metabolismo del carbono, los lípidos, los aminoácidos y los nucleótidos (Wang Y *et al.*,2020). Los metabolitos son productos intermedios o finales de reacciones biosintéticas que pueden representar directamente el estado fisiológico de las células. En comparación con otras técnicas "ómicas", a saber, genómica, transcriptómica y proteómica, la metabolómica está más cerca del fenotipo en un sistema biológico, lo que nos permite comprender mejor la interacción interna entre la genética, el estado de salud y los impactos ambientales (Shi Z *et al.*,2022). Esto se debe a que los metabolitos son el producto final de todos los procesos celulares y son el resultado directo de la actividad enzimática y proteica. Esto ocurre porque un simple cambio en el nivel de expresión de un gen o proteína no necesariamente se correlaciona

directamente con una variación en el nivel de actividad de una proteína, pero una alteración en un metabolito solo ocurre a través de dicho cambio (Worley B *et al.*, 2013).

Metabolómica es el término utilizado para describir el estudio de pequeñas moléculas o metabolitos presentes en muestras biológicas. Ejemplos de tales metabolitos incluyen lípidos, aminoácidos, vitaminas, ácidos biliares y cetoácidos. Los estudios de los niveles de concentración de estas moléculas en muestras biológicas tienen como objetivo mejorar la comprensión del efecto de un estímulo o tratamiento (Nyamundanda G *et al.*, 2010) y así proporcionar una instantánea global de todos los metabolitos de moléculas pequeñas en células y fluidos biológicos, libre de sesgos de observación inherentes a estudios más enfocados del metabolismo (Worley B *et al.*, 2013). La metabolómica se puede realizar en una amplia gama de sustratos, incluidos células, tejidos, órganos y biofluidos, y por lo general, se aplica como un medio valioso para la identificación de biomarcadores. Cuando se analizan células o sangre, el método a menudo se denomina “huellas dactilares metabólicas” y su análisis puede revelar información importante y complementaria a los conocimientos sobre el metabolismo y la señalización celulares (Wishart D *et al.*, 2019).

El enfoque de investigación básica implica la medición de metabolitos utilizando tecnología de detección de alto rendimiento y alta resolución, la adquisición de conjuntos de datos masivos, la obtención de diferentes metabolitos a través del análisis de datos, la búsqueda de vías metabólicas y la explicación de su importancia biológica (Han J *et al.*,2021).

El metaboloma se define comúnmente como la colección completa de metabolitos, o sustancias químicas de moléculas pequeñas, que se encuentran en un orgánulo, célula, órgano, biofluido u organismo determinado. El tamaño y la complejidad del metaboloma hacen la metabolómica una rama particularmente "difícil" de la "ciencia ómica". Comparado con el genoma humano (~20,300 genes) o el proteoma humano (620.000 especies de proteínas), el metaboloma (~1.000.000 metabolitos) es más grande y mucho más difícil de medir, dado que mientras que el genoma a consiste en combinaciones de sólo cuatro bases de nucleótidos y el proteoma consta de combinaciones de 20 aminoácidos proteogénicos, el metaboloma consta de cientos de miles de sustancias químicas individuales que pertenecen a miles de diferentes clases químicas (Ilustración 6) (Wishart D *et al.*,2019) (Sussulini A *et al.*,2017), por ende, los estudios metabolómicos suelen ser complejos y de gran dimensión (Nyamundanda G *et al.*,2010).

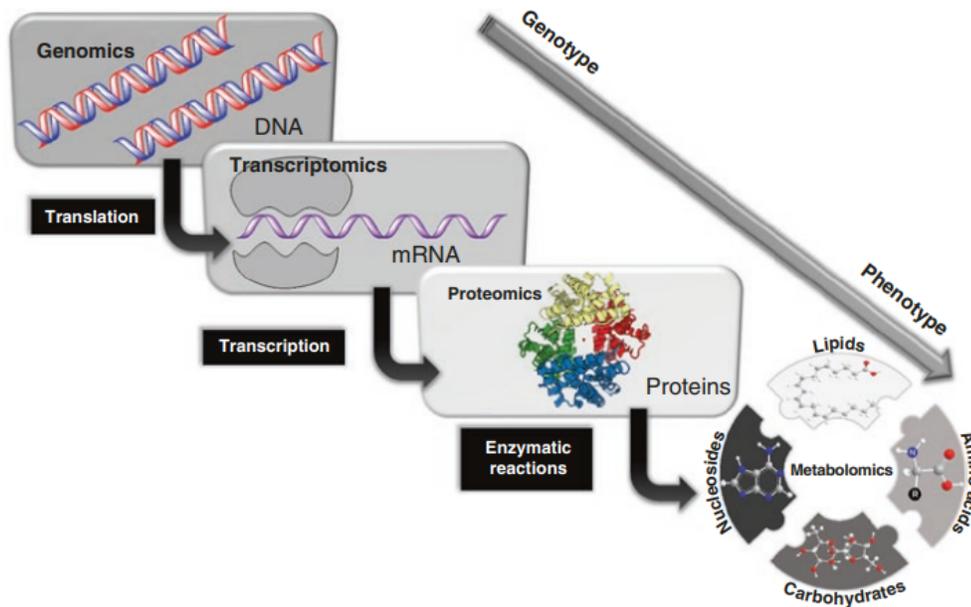


Ilustración 6: Correlación entre las estrategias ómicas utilizadas en biología celular
(Sussulini A *et al.*, 2017).

Esta complejidad química significa que las mediciones metabolómicas requieren una gama más amplia de instrumentación analítica que las mediciones genómicas o proteómicas. En particular, los investigadores deben utilizar una combinación de herramientas analíticas por ejemplo mediante espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas (MS), técnicas acopladas a sistemas de cromatografía de gases (GC) o líquidos (LC) a sistemas de movilidad de iones (IMS) o a sistemas de electroforesis capilar (CE). Esas

técnicas acopladas sirven para separar y aumentar la cobertura de detección de metabolitos. Por el contrario, la secuenciación de genes solo necesita un único tipo de instrumento (un secuenciador de ADN), mientras que la secuenciación/caracterización de proteínas normalmente necesita un solo tipo de espectrómetro de masas de alta resolución (Wishart D *et al.*,2019).

Hay dos enfoques de investigación que han surgido en metabolómica: estrategia dirigida y no dirigida. La metabolómica dirigida, conocida como perfil metabólico, se basa en el análisis cuantitativo de un grupo seleccionado de metabolitos. La metabolómica no dirigida se basa en la medición cualitativa y la comparación de tantos metabolitos como sea posible. Comúnmente, ambos enfoques se utilizan para determinar un amplio espectro de metabolitos en muestras biológicas de diferentes grupos de individuos (p. ej., sanos o enfermos, sensibles o no sensibles) o entre diferentes etapas de la enfermedad (etapa de cáncer o grado) (Bujak R *et al.*,2016), (Wishart D *et al.*,2019) (Shi Z *et al.*,2022).

El flujo de trabajo para el análisis del metaboloma implica 3 pasos básicos, todos con la misma importancia, en primer lugar, la preparación de la muestra, en segundo, la medición del metaboloma y en tercero, el análisis y procesamiento de datos (Jang C *et al.*,2018) (Ilustración 7) (Wishart D *et al.*,2019). Por lo general, una muestra biológica, como una biopsia de tejido, un órgano o una línea celular,

el cultivo se recolecta y se provoca la paralización de toda actividad metabólica (con nitrógeno líquido). A continuación, la muestra se homogeneiza y se extrae con solvente para producir una mezcla líquida que contiene el metaboloma (Wishart D *et al.*,2019). Posteriormente se realiza la medición de metabolitos mediante alguna de las técnicas especializadas antes mencionadas, siendo la cromatografía de líquidos o gases, acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (MS) la más ampliamente utilizada (Nyamundanda G *et al.*,2010) (Han J *et al.*,2021).

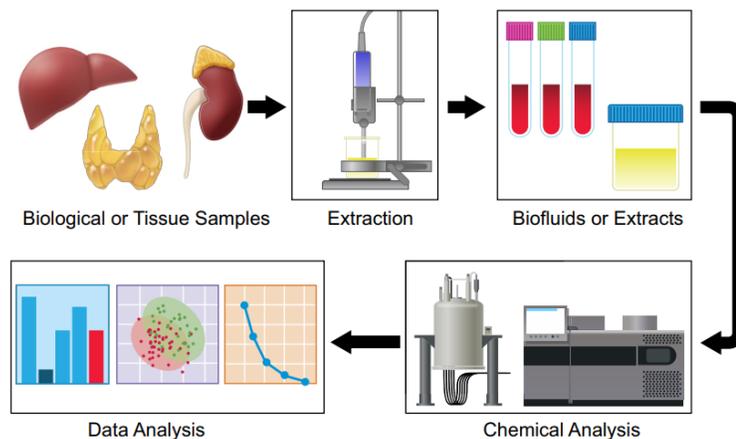


Ilustración 7: Diagrama que representa el flujo de trabajo estándar para un experimento de metabolómica. Indicando los diversos procesos en el análisis de metabolitos. (Wishart D *et al.*,2019).

El espectrómetro de masas (MS) tiene una capacidad inigualable para detectar metabolitos de baja abundancia. Para ser detectado los metabolitos de un extracto líquido deben ser ionizados, proceso que es realizado comúnmente mediante ionización por electronebulización (electrospray, ESI). Este es un proceso relativamente suave que produce un iones moleculares del metabolito intacto formándose aductos productos de la protonación de la molécula en modo de ionización positiva $(M+H)^+$ o mediante la pérdida de un protón en modo de ionización negativa $(M-H)^-$. Sin embargo, también se pueden generar muchos otros aductos y fragmentos, que complican los espectros de masas resultantes y el análisis de datos (Jang C *et al.*,2018). Luego, los metabolitos ionizados son conducidos al analizador de masas, donde los iones son separados por su relación masa/carga (m/z), siendo el tiempo-de-vuelo (TOF), y el cuadrupolo dos de los más utilizados. Los analizadores TOF hacen volar los iones por un tubo a alto vacío, donde la velocidad del ion depende de su relación masa/carga (m/z), a menor m/z más velocidad y más rápido son detectados. A diferencia del TOF, los cuadrupolos actúan como filtros de masas de baja resolución, filtrando todos los iones excepto los de un m/z particular de interés., por ende, se colocan comúnmente antes de los analizadores de masas de alta resolución, para hacer un espectrómetro de masas híbrido como un Q-TOF. Esto permite el aislamiento de iones de una masa o rango de masas, seguido de su fragmentación y el análisis de alta resolución de los iones fragmentados. Los espectros MS/MS

resultantes reflejan la estructura del ion original y se pueden utilizar para la identificación de metabolitos (Jang C *et al.*,2018).

Además, el hecho de utilizar una separación cromatográfica antes de la espectrometría de masas mejora la cobertura de detección del metaboloma y mejora la precisión cuantitativa de la espectrometría de masas (Jang C *et al.*,2018). Por ejemplo, la cromatografía de ultra-alta resolución (UHPLC) acoplada con espectrómetro de masas de cuadrupolo tiempo de vuelo (Q-TOF-MS) caracterizada por una alta eficiencia cromatográfica, selectividad y sensibilidad (Zheng Z *et al.*,2022) (Hao Y *et al.*,2020).

La cromatografía líquida separa los metabolitos en función de su partición entre el disolvente (fase móvil) y la fase estacionaria que puede ser un líquido contenido en las superficies de microesferas empaquetadas dentro de la columna (Jang C *et al.*,2018). La cromatografía líquida de fase inversa (RP-LC) es un tipo de cromatografía líquida que involucra partículas hidrofóbicas (típicamente C18) y elución con un gradiente de agua a solvente orgánico. Funciona bien para muchos metabolitos y lípidos polares, pero no logra retener los metabolitos hidrofílicos como los aminoácidos (Jang C *et al.*,2018). La cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC) es un modo alternativo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para separar compuestos polares (Buszewski B *et*

al.,2012). Involucra partículas hidrofílicas como fase estacionaria y elución con un gradiente de solvente orgánico a agua. Los métodos HILIC han avanzado sustancialmente durante la última década y permiten realizar análisis en modo de ionización positivo y negativo en el mismo instrumento (Jang C *et al.*,2018).

Para el análisis de datos, el primer paso es convertir los datos de espectrometría de masas sin procesar en una tabla anotada que indique las identidades e intensidades de los picos en las muestras. Esto implica algoritmos computacionales que seleccionan picos, alinean sus tiempos de retención entre muestras y anotan sus intensidades en cada muestra analizada. El punto de partida para interpretar los datos de metabolómica es comprender la relación entre las intensidades de las señales y las concentraciones (Jang C *et al.*,2018), para ello los investigadores deben emplear estadísticas multivariadas y una variedad de técnicas de agrupación y clasificación (Wishart D *et al.*,2019). Los datos metabolómicos son bastante complejos y requieren análisis quimiométricos que corresponden a herramientas para revelar metabolitos discriminantes entre muestras de control y de prueba. Estos análisis comprenden métodos no supervisados, como el análisis de componentes principales (PCA), y métodos supervisados, como el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y proyecciones ortogonales a estructuras latentes discriminantes

(OPLS-DA), que se emplean para la clasificación y descripción general de muestras (Sussulini A *et al.*,2017).

MetaboAnalyst es un conjunto de herramientas web fácil para el análisis, la interpretación y la integración completa de datos metabolómicos con otros datos ómicos. Además de proporcionar una variedad de procedimientos de normalización y procesamiento de datos, MetaboAnalyst contiene una amplia gama de funciones para tareas estadísticas, funcionales y de visualización de datos. Algunos de los enfoques más utilizados incluyen PCA, PLS-DA, OPLS-DA y análisis de vías metabólicas (MetPA) (Chong J *et al.*,2019). El análisis de componentes principales (PCA) es actualmente la técnica estadística más utilizada para analizar datos metabolómicos, esto se debe a al hecho de que es un método no paramétrico simple que puede proyectar los espectros de RMN o MS en un espacio dimensional más bajo, proporcionando una representación dimensional reducida de los datos originales (Nyamundanda G *et al.*,2010) llamadas componentes principales (CP), con el objetivo de encontrar el mejor resumen de los datos utilizando un número limitado de CP. La proyección a estructuras latentes (PLS) y la proyección ortogonal a estructuras latentes (OPLS) son métodos populares para el análisis estadístico multivariante en metabolómica. Para problemas de clasificación o discriminación, estos métodos se denominan PLS-DA y OPLS-DA, donde DA significa análisis discriminante y

son comúnmente aplicados en estudios de metabolómica no dirigida (Triba M *et al.*,2015). En el *loading* del S-plots, cada punto de datos representa un *feature* específico, que corresponden a un conjunto de características tanto masa, intensidad y tiempo de retención. En cada extremo de la “S”, indicaría que *features* están más enriquecidos o que *features* contribuyen más a la distinción entre ambos grupos. En otras palabras el modelo S-plot del OPLS-DA sirve para visualizar la influencia de un *feature* en el componente predictivo, combinando perfiles de carga de covarianza ($p[1]$) y correlación ($p(\text{corr})[1]$). La covarianza trazada en el eje x visualiza la contribución al componente predictivo, mientras que la correlación en el eje y (Jasna V *et al.*,2022).

Otro aspecto importante es la identificación de metabolitos la cual se requiere para estudios de metabolómica no dirigida, ya que, en la metabolómica dirigida, el metabolito o metabolito la clase de interés ya está definida. Para ello existen bases de datos tanto gratuitas como comerciales (Sussulini A *et al.*,2017). MetaboScape es un software que incorpora diferentes herramientas para identificar los compuestos detectados en los cromatogramas: SmartFormula, que determina la fórmula molecular de cada compuesto detectado a partir de su masa exacta y patrón isotópico; Compound Crawler, que busca estructuras moleculares para fórmulas moleculares dadas en bases de datos locales (AnalyteDB) y públicas en línea (ChEBI, ChemSpider y PubChem); y MetFrag,

que realiza la fragmentación *in silico* de las estructuras potenciales y las compara con los espectros de MS/MS adquiridos experimentalmente. Este software también permite la anotación en comparación con listas de analitos creadas previamente y bibliotecas espectrales MS/MS (Bruker Sumner MetaboBASE Plant Libraries 1.0 y Bruker HMDB Metabolite Library) (Olmo L *et al.*,2018). SIRIUS es un servicio web disponible que integra análisis de patrones isotópicos de alta resolución y árboles de fragmentación para la elucidación estructural y la identificación de los metabolitos (Jasna V *et al.*,2022).

1.4 Metabolismo alterado en el microambiente tumoral

Durante la activación de los linfocitos T, las mitocondrias, organelo principal del metabolismo experimentan cambios rápidos en este proceso, incluido el aumento de la masa, el número y el ADN mitocondrial. Esto sugiere que el metabolismo mitocondrial es crucial para la activación y proliferación de células T (Angajala A *et al.*, 2018). La dinámica mitocondrial, incluido el tráfico de mitocondrias y remodelación de la arquitectura mitocondrial, masa y actividad, son impulsores importantes para mantener la aptitud metabólica en respuesta a las perturbaciones metabólicas. Durante la privación de nutrientes, como por ejemplo en el microambiente tumoral, aumenta la fusión mitocondrial y la biogénesis permitiendo que las células respalden las demandas metabólicas. Sin embargo, durante este proceso se acumulan mitocondrias que deben ser eliminadas por mitofagia y cuando no operan de manera correcta resulta en un aumento de la masa mitocondrial asociado con un potencial de membrana mitocondrial reducido, un fenotipo mitocondrial que se observa en células envejecidas. La acumulación de mitocondrias dañadas reprograma aún más el epigenoma y transcriptoma a través de señales retrógradas alteradas que son controladas por los metabolitos generados a partir de las mitocondrias, y prevenir biogénesis mitocondrial (Yu Y *et al.*, 2020)

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

Con respecto a la alteración mitocondrial en cáncer, en un estudio se observó una mayor masa y potencial de membrana mitocondrial en TILs CD8⁺, medidos a través de una tinción de mitotracker green (MG) y Deep red (MDR), en comparación con linfocitos de bazo y ganglio, sin embargo, se observó que la proporción masa/potencial, indicador de la actividad mitocondrial por masa, se redujo en TILs sugiriendo que no podrían utilizar completamente la actividad mitocondrial y también se observó un menor número de copias de ADN mitocondrial (ADNmt), lo que sugiere que la calidad mitocondrial en los TILs podría verse comprometida, además de fenotipos mitocondriales dañados incluyendo estructuras de membrana rotas, estructura de crestas y disminución

del número de crestas y longitud de ellas, esto junto con un aumento en los ROS mitocondriales (Ilustración 8). Colectivamente, estos datos revelan que las células T CD8⁺ son propensas a acumular mitocondrias con potenciales de membrana mitocondrial comprometidos en el TME. También se observó que los TILs exhibían un aumento de la expresión de PD-1 y disminución de la expresión de T-bet en conjunto con una menor secreción de IFN- γ y TNF- α (Yu Y *et al.*,2020). (Yu Y *et al.*,2020).

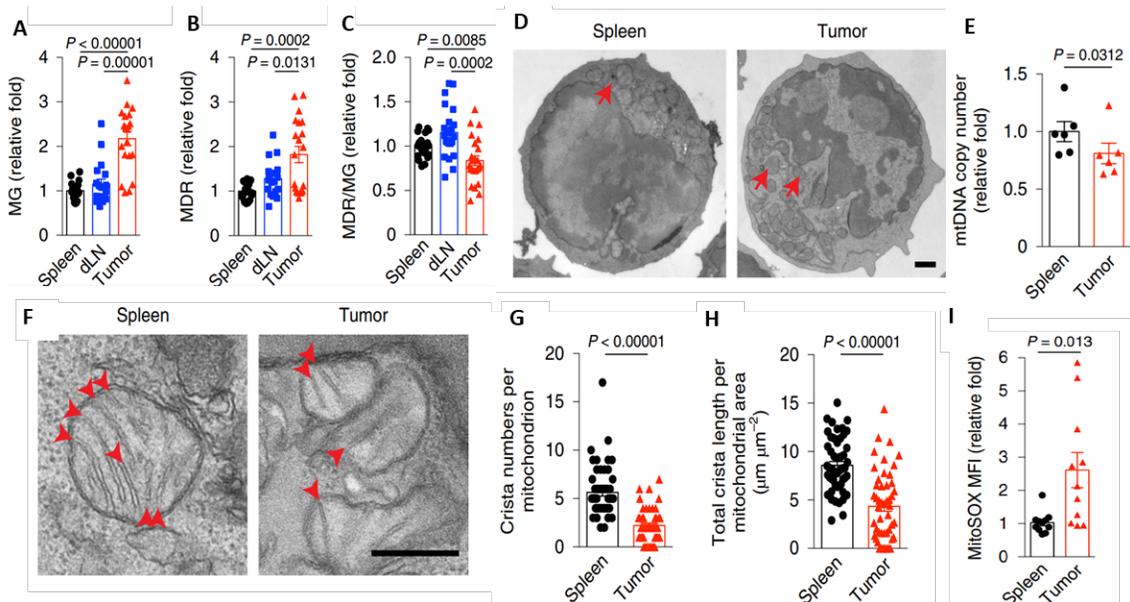


Ilustración 8: Representación de la alteración mitocondrial en linfocitos T infiltrantes de tumores (TILs) en comparación con linfocitos de bazo y ganglios linfáticos de drenaje (dLN). (A), (B) y (C) Representan las medidas individuales de MG, MDR y la relación MDR/MG respectivamente de linfocitos infiltrantes de tumores (TILs), linfocitos de bazo y ganglios linfáticos. (D) Visualización del n° de mitocondria por microscopia electrónica de transmisión. (E)

Cuantificación del ADN mitocondrial (mtADN) en linfocitos T de bazo y TILs. (F) Visualización de la morfología mitocondrial en linfocitos T de bazo y TILs por microscopía electrónica de transmisión. (G y H) Representación del número de crestas y largo en linfocitos T de bazo y tumor. (I) Representación de la producción de ROS entre TILs y bazo (Yu Y *et al.*,2020).

A diferencia de lo anterior en un estudio se observó una reducción de la masa mitocondrial, así como de la capacidad de absorber glucosa, medido a través del 2NBDG en los TILs CD8⁺ de diferentes modelos de tumores incluido el melanoma, adenocarcinoma, carcinoma de pulmón de Lewis y HNSCC. La pérdida de masa fue acompañada por una morfología anormal lo que concuerda con el estudio anterior. Además, se realizó un análisis del metabolismo a través de un analizador de flujo extracelular Seahorse, en el cual se observó que los TILs CD8⁺ exhibían un defecto en el consumo de oxígeno (OCR) y un aumento de la tasa de acidificación extracelular (ECAR), indicando una mayor dependencia al metabolismo glucídico, lo que les impide llevar a cabo funciones celulares críticas en el microambiente tumoral pobre en glucosa. Al igual que el anterior este estudio asoció la mitocondria con el fenotipo de agotamiento ya que se observó una correlación positiva con la expresión de moléculas co-inhibitorias como PD-1, LAG3 y TIM-1 en melanoma con la disminución de la masa mitocondrial (Ilustración 9) (Scharping N *et al.*,2016).

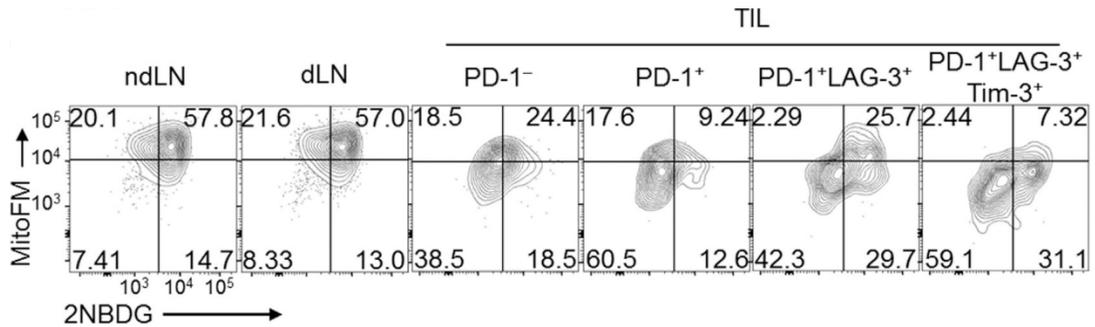


Ilustración 9: Representación de la relación entre la masa mitocondrial y la captación de glucosa con la expresión de receptores inhibitorios en linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) y linfocitos de ganglio drenantes (dNL) y no drenantes (ndLN) (Scharping N *et al.*, 2016).

En otro estudio se analizó el metabolismo en células T activadas CD8⁺ PD-1⁺, PD-1⁻, control (CTRL) y activadas (ACT), y se observó que la expresión de PD-1 indujo una disminución de lactato, una reducción de ECAR, un menor OCR en células PD1⁺, PD-1⁻ y CTRL a diferencia de las T ACT, pero al medir la relación OCR/ECAR, esta relación fue mayor en las células T activadas PD-1⁺ en contraste con PD-1⁻, CTRL y ACT, sugiriendo que estas células que expresan PD-1 utiliza preferentemente la fosforilación oxidativa en lugar de glucólisis para generar ATP. Además, se observó un número y longitud de crestas mitocondriales menor en las células T ACT PD-1⁺ que las células T ACT (Ogando J *et al.*, 2019).

1.5 Transferencia mitocondrial:

Basado en la relación entre el metabolismo y la función efectora del linfocito T, las mitocondrias al ser el organelo principal del metabolismo cumplen un rol importante en este proceso. Las mitocondrias son organelos dinámicos de doble membrana que están presentes en la mayoría de las células eucariotas y actúan en una variedad de funciones para mantener la homeostasis celular (Whitehall J *et al.*, 2019). Son conocidas como las "centrales eléctricas" de las células porque generan trifosfato de adenosina (ATP) a través de la fosforilación oxidativa (OXPHOS), albergan vías de metabolismo de lípidos esenciales (Pang Y *et al.*, 2021) y tienen funciones clave en la señalización celular, la proliferación, el metabolismo, la muerte celular (Qin Y *et al.*, 2021), el transporte de electrones en la fosforilación oxidativa, la regulación de ROS, la localización de proteínas proapoptóticas y la polarización de la membrana interna para la ATP sintasa. Para mantener estas funciones las mitocondrias realizan un equilibrio en la biogénesis, degradación y eventos de fisión y fusión altamente dinámicos que dependen del entorno y las necesidades de la célula (Beckermann K *et al.*, 2017). La dinámica mitocondrial permite la eliminación selectiva de las mitocondrias a través de la mitofagia y la biogénesis mitocondrial repone la reserva mitocondrial, manteniendo así un repertorio mitocondrial saludable dentro de la célula (Shanmughapriya S *et al.*, 2020).

Los linfocitos T deben regular estrechamente el número y la función mitocondrial para permitir la transición metabólica a estados efectores de linfocitos T glucolíticos (Beckermann K *et al.*,2017). La fisión mitocondrial genera discreta y fragmentadas mitocondrias que pueden aumentar la producción de ROS, facilitar la mitofagia, acelerar la proliferación celular y mediar la apoptosis. Además, las mitocondrias se alargan como mecanismo de supervivencia en respuesta a hambre de nutrientes y estrés, vinculando la fusión con la longevidad celular (Buck M *et al.*,2016).

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

Las células vecinas pueden compartir mitocondrias a través de varios mecanismos, que incluyen (i) la formación de vehículos extracelulares (VE), (ii) nanotubos tunelizados (TNT) formados en los sitios de contacto físico, (iii) eyección mitocondrial, o iv) fusión citoplásmica. Múltiples estudios han demostrado que los TNT, puentes citoplásmicos ultrafinos entre células, son el principal sistema de administración de mitocondrias en tejidos sanos y tumorales (Sahinbegovic H *et al.*, 2020). Los nanotubos tunelizadores facilitan el intercambio selectivo de orgánulos o vesículas de membrana y pequeñas moléculas solubles citoplasmáticas y de membrana. Son estructuras nanotubulares similares a los filopodios que se conectan con la célula objetivo formando así un puente que contienen un esqueleto compuesto principalmente de actina F y proteínas de transporte que facilitan el transporte activo de carga y mitocondrias a lo largo de estas estructuras (ilustración 11) (Shanmughapriya S *et al.*, 2020). La transferencia de mitocondrias a través de TNT suele ser principalmente unidireccional, sin embargo, también se ha informado de transferencia bidireccional. De manera similar, el medio hiperglucémico o acidificado, así como las citoquinas que estimulan la transición epitelial a mesenquimal, aumentan la transferencia mitocondrial a través de la formación de nanotubos tunelizados (Torralba D *et al.*, 2016).

Otro mecanismo corresponde al transporte mitocondrial a través de vesículas extracelulares (EV), que son vehículos de comunicación intercelular que participan en una serie de procesos fisiológicos y patológicos (Torralba D *et al.*, 2016), estas vesículas son poblaciones heterogéneas de vesículas de membrana que son liberadas en los espacios extracelulares por la mayoría de las células, incluidas las células tumorales (Fujita Y *et al.*, 2016), se pueden dividir en microvesículas, exosomas y cuerpos apoptóticos, según su origen, tamaño y composición molecular (Ilustración 12) (Torralba D *et al.*, 2016). También se clasifican en 3 subclases: vesículas extracelulares pequeñas (S-EV), vesículas extracelulares grandes (L-EV) y un grupo intermedio conocido como vesículas extracelulares pequeños a grandes (Takenaga K *et al.*, 2021). Numerosos informes ahora identifican a los EV como mediadores importantes de las vías de señalización extracelular a través de la transferencia directa de su carga por membrana. La biogénesis del desprendimiento de microvesículas se estimula mediante la activación de la membrana plasmática, como la entrada de calcio intracelular (Fujita Y *et al.*, 2016).

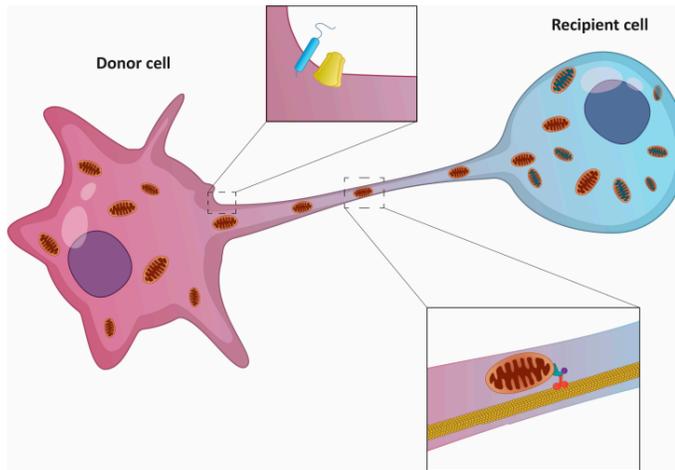


Ilustración 10: Representación del mecanismo de transferencia mitocondrial a través de nanotubo tunelizado (Sahinbegovic H *et al.*, 2020).

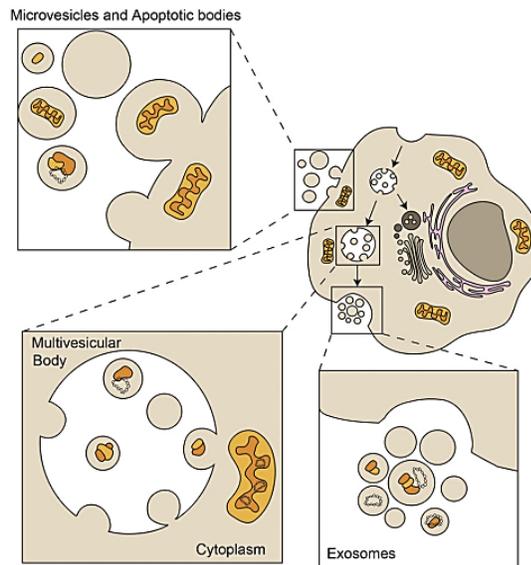


Ilustración 11: Representación del mecanismo de transferencia mitocondrial a través de vesículas extracelulares (Torralba D *et al.*, 2016).

Las transferencias mitocondriales ocurren tanto en condiciones fisiológicas, por ejemplo, en la homeostasis tisular y el mantenimiento de la troncalidad como en condiciones patológicas como la hipoxia, la inflamación y el cáncer. Las cargas transferidas pueden contener mitocondrias sanas o dañadas. Las mitocondrias sanas se transfieren de las células donantes para proteger a las células receptoras del estrés oxidativo y la apoptosis y para mejorar su respiración mitocondrial; a diferencia de las células estresadas, que pueden transferir las mitocondrias dañadas a las células receptoras para aliviar su carga de mitocondrias dañadas. Por ejemplo, en un accidente cerebrovascular, los astrocitos liberan mitocondrias saludables que ingresan a las neuronas para promover la viabilidad y producción de ATP (Hayakawa K *et al.*,2016) , también se ha indicado que los cardiomiocitos (CM), células de músculo liso altamente especializadas con una vida útil extremadamente larga y una baja tasa de renovación, que dependen de una gran reserva de mitocondrias para satisfacer sus demandas energéticas intensivas y recientemente se propuso la transferencia mitocondrial intercelular entre los CM y los macrófagos residentes en el corazón (cMAC) circundantes como una ruta extracelular por la cual los CM eliminan las mitocondrias disfuncionales (Pang Y *et al.*,2021). También en un estudio se observó una transferencia mitocondrial mediante nanotubos tunelizados desde MSC hacia macrófagos induciendo una mejora en su capacidad fagocítica (Jackson M *et al.*,2016), esto similar a otro estudio realizado posteriormente donde se observó que las MSC humanas suprimen la secreción

de citoquinas proinflamatorias, mejoran la capacidad fagocítica y promueven la expresión del marcador de macrófagos M2 en macrófagos humanos en presencia de líquido de lavado broncoalveolar de pacientes con ARDS (síndrome de dificultad respiratoria aguda) a través de transferencia mitocondrial a través de vesículas extracelulares (Morrison T *et al.*,2017). En un estudio se observó que existe transferencia mitocondrial de los eritroblastos hacia los macrófagos vía nanotubo tunelizado (TNT) y vesículas extracelulares (Yang C *et al.*,2021). En un estudio se observó que las células Jurkat transfieren mitocondrias a través de nanotubos tunelizados a las MSC, pero reciben pocas mitocondrias de las MSC, lo que genera quimiorresistencia (Wang J *et al.*,2018).

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

En relación a una transferencia mitocondrial hacia linfocitos T CD4⁺, en un estudio se observó transferencia de mitocondrias de las células reguladoras derivadas de mieloides (MDRC) hacia linfocitos T de sangre periférica tanto de donantes sanos como asmáticos a través de exosomas, este análisis fue a mediante un cocultivo entre exosomas del BAL (liquido broncoalveolar) marcados con Mito Tracker green con células T CD4⁺ y se observó a través de imageStream entregada por citometría de flujo exosomas Mito Tracker Green⁺ (MTG⁺) en el interior de linfocitos T CD4⁺ verificando una transferencia exosomal de mitocondrias y mediante un marcaje con la sonda MitoSox, tinte fluorescente rojo que evalúa la producción de superóxido, se observó que las células que adquirían las mitocondrias exhibían un aumento en la producción de superóxido presentando como un marcaje positivo a la sonda MitoSox (Hough K *et al.*,2018). También existe otro estudio donde se observó que la transferencia de mitocondrias desde MSC hacia linfocitos T th17 induce una disminución de su secreción de IL-17 (Luz-Crawford *et al.*,2019). Por otro lado, existe un estudio que evaluó la transferencia entre células madre mesenquimales (MSC) marcadas con MTG⁺ con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a través de cocultivo, que luego a través de FACS se evaluó el porcentaje de transferencia mitocondrial de células T CD3⁺, B CD19⁺ y natural killer (NK) CD56⁺, medido como el porcentaje de MTG⁺ (ilustración 14), y tal transferencia se confirmó mediante imágenes de fluorescencia (ilustración 15). En este estudio también se realizó transferencia mitocondrial utilizando el protocolo artificial denominado

MitoCeption, siendo la célula dadora de mitocondrias la MSC con previo marcaje con MTG hacia Linfocitos T CD3⁺, observando en ambas situaciones que los linfocitos T CD3⁺ son células permisivas a la transferencia mitocondrial (ilustración 16). También se evaluó la secreción de IFN- γ desde células T CD4⁺ y CD8⁺ post-transferencia mitocondrial en un ambiente inflamatorio, observando un descenso en la secreción de la citoquina y también se analizó el efecto de la transferencia mitocondrial artificial sobre la proliferación de linfocitos T CD3⁺ y no se observaron efectos significativos. Enfocándose en los linfocitos T CD4⁺ se observó que esta transferencia indujo un aumento la expresión de las transcripciones de ARNm involucrados en la diferenciación a células T reguladora y para comprobar que la transferencia induce una alteración en la diferenciación del linfocito TCD4⁺, se realizaron análisis funcionales con células T CD4⁺ sin tratamiento previo clasificadas con FACS. Las PBMC humanas se mitoceptaron, tiñeron y clasificaron para poblaciones de células vírgenes (CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻) Mito⁺ (que adquirieron mitocondrias) y Mito⁻ y se observó su diferenciación *in vitro* en ausencia o presencia de medios inductores de Treg (anti-CD3, IL-2 y TGF- β 1). Donde, en ambas condiciones, las células Mito⁺ presentaban porcentajes más altos de células Tregs con fenotipo FOXP3⁺CD25⁺ en comparación a Mito⁻ lo que reveló que la MitoCeption sólo era capaz de impulsar la diferenciación de las células Tregs (CD25⁺FoxP3⁺) (Court A *et al.*, 2020).

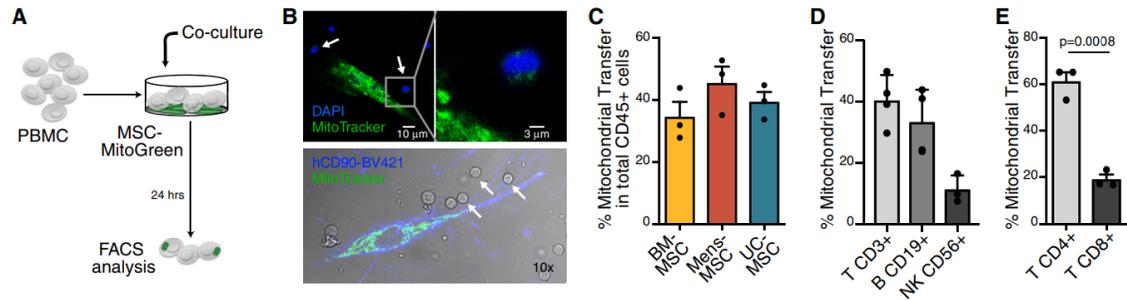


Ilustración 12: Representación de la transferencia mitocondrial desde célula madre mesenquimal (MSC) hacia células inmunitarias. Transferencia mitocondrial a través de cocultivo y previo marcaje mitocondrial en las MSC (figura A y B). En c se observa el porcentaje de transferencia mitocondrial hacia células CD45⁺ desde diversas MSCs, tales como de medula ósea (BM), menstrual y cordón umbilical. En D y E representa el porcentaje de transferencia mitocondrial hacia linfocito T CD3⁺, linfocito B CD19⁺ y célula NK CD56⁺ y hacia las dos poblaciones de linfocitos T, tanto TCD4⁺ y CD8⁺ (Court A *et al.*, 2020).

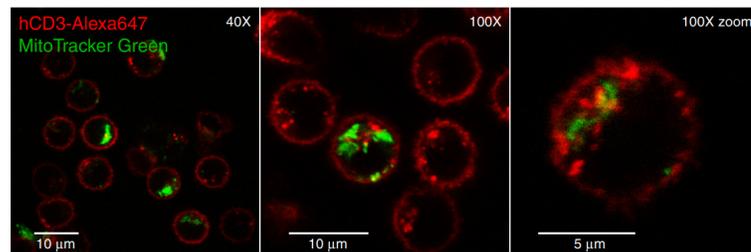


Ilustración 13: Representación mediante imágenes de fluorescencia de la transferencia mitocondrial desde célula madre mesenquimal hacia linfocito T CD3⁺ (Court A *et al.*, 2020).

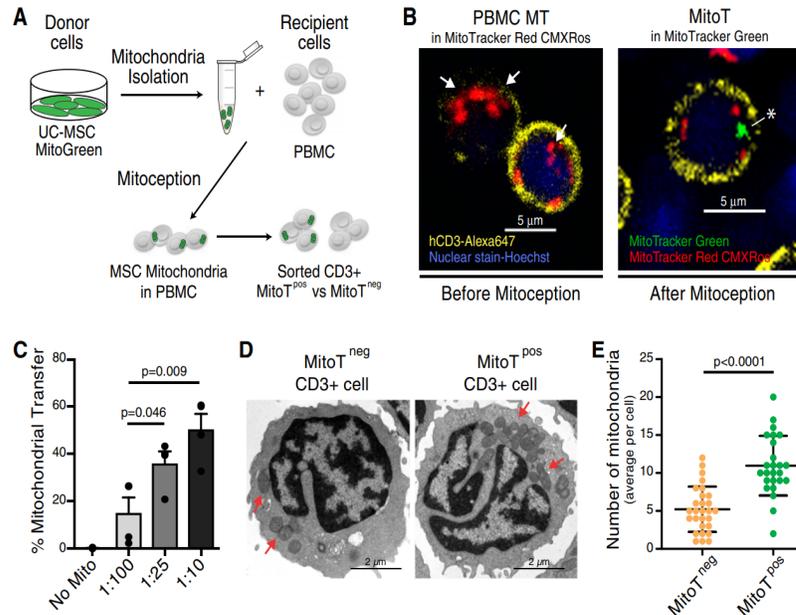


Ilustración 14: Representación de la diferenciación a célula T regs por transferencia mitocondrial desde células madre mesenquimales aisladas (MSC). (A) Representación de microscopía confocal de campo claro de células CD4⁺ Mito T neg (panel superior) y Mito T pos (panel inferior) sin tratamiento previo después de 5 días en cultivo con medio simple, las flechas rojas indican activación y proliferación. (B) Gráficos FACS que representan las poblaciones de Treg (CD127 bajo CD25⁺FoxP3⁺) después de la diferenciación de linfocitos T en medios con o sin citocinas y suplementos de anticuerpos (anti-CD3, IL-2 y TGF-β1). (C) Análisis FACS indicando el porcentaje de células T regs después de 5-7 días de diferenciación en medio simple y en medio de diferenciación (Court A *et al.*, 2020).

1.5.1 Transferencia mitocondrial y Cáncer:

La modulación de las mitocondrias tumorales es un mecanismo importante que ayuda a las células cancerosas a escapar del control del sistema inmunológico y desarrollar resistencia a los fármacos. Además de las células neoplásicas e inmunes, en el microambiente tumoral existen diversos tipos celulares que pueden controlar el estado de las mitocondrias en un tumor tanto directamente, por contacto célula-célula, como indirectamente, por la secreción de factores solubles y una variedad de vesículas extracelulares (Sahinbegovic H *et al.*, 2020) (Takenaga K *et al.*, 2021). Existen antecedentes que las células cancerosas adquieren mitocondrias de las células sanas circundantes para optimizar y reparar la maquinaria metabólica dañada y promover la supervivencia, siendo uno de sus donantes críticos las células del estroma mediante la formación de nanotubos tunelizados (Shanmughapriya S *et al.*, 2020). Las células cancerosas pueden liberar (por ejemplo, en caso de necrosis) mitocondrias completas o sus componentes, como el ADN mitocondrial (ADNmt), ATP, citocromo C o péptidos formilados, al espacio extracelular. Estos luego sirven como Patrones Moleculares Asociados al Daño (DAMP) que activan las células inmunes y las respuestas proinflamatorias e inmunosupresoras resultantes, por ende, inhibir o estimular el crecimiento y/o la capacidad metastásica del tumor. Sin embargo, el transporte de mitocondrias entre células también tiene consecuencias patológicas particularmente en el cáncer donde las células malignas tienden a tomar ventaja del entorno circundante (Sahinbegovic H *et al.*, 2020), por ejemplo

la adquisición de quimiorresistencia producto de la transferencia mitocondrial desde células endoteliales (Pasquier J *et al.*,2013), un aumento en el poder tumorigénico producto de la transferencia mitocondrial desde células madre mesenquimales hacia células con deficiencia de ADN mitocondrial (Dong L *et al.*,2017), una mejora en la capacidad invasiva en la célula receptora producto de la transferencia mitocondrial entre línea de células cancerígenas de cáncer de vejiga (Lu J *et al.*,2017) y los fibroblastos asociados al cáncer (CAF) altamente glucolíticos tienden a donar sus mitocondrias a las células cancerosas de próstata cercanas, estimulando así el OXPHOS de las células cancerosas, permitiendo así la plasticidad metabólica de las células cancerosas apoyando a la progresión del tumor (Valenti D *et al.*,2021). En el mieloma múltiple, las MSC entregan mitocondrias a las células de mieloma a través de TNT, lo que promueve su proliferación. Para las células de adenocarcinoma pulmonar A549, que pierden mitocondrias durante el tratamiento farmacológico, su metabolismo se puede restaurar después de recibir mitocondrias saludables provenientes de otras células, haciéndolas más invasivas (Qin Y *et al.*,2021).

En un estudio se observó la presencia de nanotubos tunelizados en muestras de carcinoma de células escamosas de laringe humana (LSCC), dicho estudio también indico la presencia de mitocondrias al interior de los nanotubos (Antanavičiūtė I *et al.*,2014). En un estudio se evaluó la transferencia mitocondrial

entre las células normales del estroma y las células cancerosas OSCC a través de un sistema de cocultivo *in vitro* y microscopía confocal para visualizar la transferencia mitocondrial. El cocultivo se utilizaron fibroblastos orales normales (NOF), los que fueron previamente marcados con MitoTrackerDeepRed (MTDR) y los queratinocitos orales normales (NOK) y OSCC se tiñeron con MitoTrackerGreen (MTG); y se observó posterior del cocultivo mitocondrias tanto verdes como rojas al interior de las OSCC y que tal transferencia de mitocondrias es mediante nanotubos tunelizados. Al igual que en un cocultivo sin contacto, también se observó transferencia mitocondrial, indicando un mecanismo de transferencia a distancia (Zhang Z *et al.*, 2020).

2. PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

2.1 Problema de investigación:

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

2.2 Pregunta de investigación:

¿Cuál es el efecto de la transferencia artificial de mitocondrias desde la línea celular de cáncer oral HSC-3, sobre el fenotipo y metabolismo de los linfocitos TCD4⁺ de individuos sanos?

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

La transferencia artificial de mitocondrias obtenidas de la línea celular de cáncer oral HSC-3 induce un fenotipo exhausto y altera el metabolismo de linfocitos TCD4⁺ aislados de individuos sanos.

3.2 Objetivo General

Analizar el fenotipo y metabolismo de los linfocitos T CD4⁺ post transferencia artificial de mitocondrias obtenidas desde la línea celular de cáncer oral HSC-3.

3.3 Objetivos específicos:

- 1.- Analizar la eficiencia de la transferencia artificial de mitocondrias obtenidas de líneas de cáncer oral en linfocitos TCD4⁺.

- 2.- Evaluar la proliferación, expresión de moléculas de superficie y la secreción de citoquinas de los linfocitos T CD4⁺ post-transferencia mitocondrial artificial.

- 3.-Analizar cambios metabólicos y metabolómicos en linfocitos T CD4⁺ post-transferencia mitocondrial artificial con mitocondrias tumorales de la línea celular HSC-3.

- 4.- Análisis de la producción de superóxido mitocondrial de los linfocitos T CD4⁺ post-transferencia mitocondrial artificial.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Obtención de células receptora y dadora de mitocondrias:

4.1.1 Aislamiento de linfocitos T CD4⁺

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC):

Se recolectó muestras de sangre periférica de donantes sanos con previo consentimiento informado, se aislaron PBMC a través de una centrifugación por gradiente de densidad con el reactivo Ficoll-Paque PLUS. Se diluyó en una razón 1:1 la sangre con PBS (Tampón fosfato salino) y lentamente se traspasó a un tubo inclinado con ficoll, se centrifugó a 2000rpm por 20 minutos a T° ambiente y se extrajo el anillo de PBMC con pipeta pasteur, el cual se lavó dos veces centrifugando por 10 minutos a 1000 y 1500 rpm respectivamente. Finalmente se realizó el conteo celular en una cámara de Neubauer (anexo n°1).

Aislamiento de linfocitos T CD4⁺ por MACS:

El aislamiento de linfocitos T CD4⁺ se realizó a través de una separación magnética de células activadas "MACS". Esta separación se basa en el marcaje con beads magnéticos acoplados a anticuerpos fluorescentes específicos hacia un tipo celular, por ende, permite el aislamiento de una población en particular gracias a un campo magnético generado por el equipo MACS y retiene a las

células unidas a los beads. En el protocolo la cantidad de buffer MACS y beads magnéticos depende del número de células contadas. Para el aislamiento de TCD4⁺, la muestra de PBMC se centrifugó y el pellet se resuspendió en 80 uL de buffer MACS y 20uL de microbeads CD4 por 10 millones de células y se incubó por 15 minutos en el refrigerador a 4°C, se lavó con 1 a 2 ml de buffer MACS por 10 millones centrifugando a 1500 rpm por 10 minutos y se resuspendió en 500uL de buffer MACS por 100 millones de células. Finalizando la preparación de la muestra se introduce la columna LS al equipo MACS, se lavó con 3 mL de buffer MACS y se le incorporó las PBMC marcadas, y se realizó 3 lavados de 3 mL de buffer MACS. Una vez terminados los lavados se retiró la columna y se incorporó en un falcón de 15 mL rotulado como células CD4⁺, ahí se lavó con 3 mL de buffer MACS y se retiró las células adheridas previamente, finalmente se centrifugó la población positiva a 1500 rpm por 10 minutos y se contó según el anexo n°1. (Miltenyi Biotec CD4 MicroBeads Human, N° de catálogo: 130-045-101).

La población enriquecida de linfocitos TCD4⁺ se llevó a flask pequeño con medio RPMI 10% SBF (Suero bovino fetal) e IL-2 a 37°C y se activó al día siguiente beads anti CD3/CD28 en una relación 1/4, es decir 6,25 uL por millón de células y se fue expandiendo en flask medianos con medio RPMI 10% SBF e IL-2.

4.1.2 Procesamiento de línea celular de cáncer:

La línea de cáncer HSC-3 se expandió en flask pequeños y grandes con medio DMEM alto en glucosa y 10% de SBF, se cambió el medio cada 3 días y se observó el crecimiento, el cual al ser entre 80-100%, las células fueron expandidas en otros flask grandes de acuerdo con las necesidades celulares para los siguientes experimentos, siendo las células no utilizadas congeladas a -80°C a través de un protocolo de congelamiento.

4.1.3 Aislamiento de mitocondrias de células cancerosas:

Se aisló mitocondrias de células tumorales de cáncer oral utilizando el kit de aislamiento mitocondrial para células cultivadas (ThermoFisher Scientific) con un marcaje previo con sondas MitoTrackerGreen FM precalentada previamente a una concentración de 100nm y se incubó a 37°C por 30 minutos, una vez terminado el marcaje se lavó a través de una centrifugación a 1500 rpm por 10 minutos y se extrajo el sobrenadante y se dejó el pellet listo para el aislamiento mitocondrial. (MitoTrackerGreen FM, n° catálogo:M7514). El protocolo del aislamiento se basa en la cantidad de células y está hecho para 20 millones, se comienza con sedimentar 2×10^7 células centrifugando la suspensión de células en un tubo de microcentrífuga de 2,0 mL a 900g durante 2 minutos, se desechó el sobrenadante y se agregó 800 μL de reactivo de aislamiento de mitocondrias A, se agitó en el vórtex intermedio durante 5 segundos y se dejó en hielo por 2

minutos exactos, luego se agregó 10 μ L del reactivo de aislamiento de mitocondrias B y se agitó en vórtex a velocidad máxima por 5 segundos. Se incubó en hielo por 5 minutos agitando a velocidad máxima cada minuto, luego se agregó 800 μ L de reactivo de aislamiento de mitocondrias C, se agitó por inversión y se centrifugó a 700g durante 10 minutos a 4°C, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de 2,0 mL y se centrifugó a 12.000g durante 15 minutos a 4°C, el sobrenadante resultante (fracción de citosol) se transfirió a un nuevo tubo y al pellet (mitocondrias aisladas) se le añadió 500 μ L de reactivo de aislamiento de mitocondrias C al sedimento y se centrifugó a 12.000g durante 5 minutos a 4°C, donde finalmente se desecó el sobrenadante y el pellet (mitocondrias) se dejó en hielo para mantener la integridad de la mitocondria. (Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells n°: 89874)

4.2 MitoCeption

La transferencia mitocondrial hacia linfocitos T CD4⁺ se realizó siguiendo el protocolo MitoCeption estandarizado a tubos eppendorf, el cual corresponde a centrifugar las células receptoras en medio crecimiento DMEM puro a 500g por 5 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y resuspendió el pellet en la suspensión celular de mitocondrias aisladas en 250 uL de medio DMEM dejando una población control sin mitocondrias, se pasó por vórtex medio por 5 segundos y se centrifugó a 500g por 10 minutos a 4°C y luego dejó incubando a 37°C durante toda la noche, una vez que haya pasado 1 día las células se lavaron centrifugando a 1500 rpm por 10 minutos, se guardó sobrenadante para análisis de secreción de citoquinas, lactato y glucosa, y se contaron y plaquearon en una proporción de 100.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se dejó incubando hasta los próximos análisis de expresión de moléculas de superficie, proliferación y captación de glucosa por 2NBDG.

4.3 Ensayo de proliferación

Se midió la proliferación de las células T utilizando el kit de proliferación de células CellTrace™ Violet según las instrucciones del fabricante, que se emplea para el marcaje de células in vitro e in vivo con el fin de rastrear múltiples generaciones a través de citometría de flujo, donde a medida que la aumenta la proliferación el índice de fluorescencia media (IFM) del tinte disminuye.

El marcaje se basa en primer lugar en preparar la sonda, en este trabajo se utilizó una concentración de 2uM de sonda en 1mL, y posterior a ello tanto la sonda preparada y las células a marcar, los linfocitos TCD4⁺ en 1 mL fueron precalentadas a 37°C durante 10 minutos, luego se introdujo la sonda a cada población de linfocitos TCD4⁺ llegando a una concentración de 1 uM de Cell trace Violet y se incubó por 20 minutos en el baño termorregulador protegido de la luz, mientras tanto se dejó en hielo medio con SBF, para que una vez terminado el tiempo de incubación, las células marcadas se dejaron en hielo y se incorporó 5 mL de medio con SBF frío para detener la reacción y se dejó en hielo por 5 minutos. Finalmente, las células se lavaron a 1500 rpm por 10 minutos y se resuspendieron en medio DMEM y se cuentan para tener el número de células y con él, se distribuyeron las condiciones de la MitoCeption, tanto las células que fueron mitoceptadas y las que se utilizaron como control. (CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit, Ref: C34557).

4.4 Ensayo de expresión de moléculas de superficie:

Se analizó la expresión de moléculas de superficie de los linfocitos TCD4⁺ control y mitoceptados a través de citometría de flujo. Para ello se rotularon tubos de acuerdo con los 3 paneles de anticuerpos utilizados y las condiciones controles de los paneles, el primer panel correspondió a los anticuerpos: CTLA4-APC y CD25-PE/Cy7, el segundo panel correspondió a: TIGIT-APC y PDL-1-PE/Cy7, y el tercero correspondió a: Lag3- PE/Cy7, PD-APC y Tim3-Alex780. La cantidad de anticuerpos dependió de la cantidad de células, las células que están plaqueadas post MitoCeption tanto control como mitoceptadas, una vez que se decidió las condiciones se retiraron las células de los pocillos con previa resuspensión, se llevó a cada tubo, se centrifugó a 1500rpm a 10 minutos y se guardó el sobrenadante resultante para análisis de citoquinas (día 3), y el pellet se resuspendió en la sonda de marcaje con los anticuerpos y PBS y se dejó incubando por 30 minutos en el refrigerador a 4°C, luego se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 200 uL de PBS y 10uL de beads de conteo y se llevó al citómetro de flujo. El análisis se realizará utilizando el software FlowJo.

4.5 Ensayo de secreción de citoquinas:

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

4.6 Análisis metabólico:

El análisis se realizó utilizando cromatografía de ultra-alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas de alta resolución con analizador de cuadrupolo-tiempo-de-vuelo (UHPLC-RH-QTOF-MS). Este protocolo se basó en 3 fases, n°1: extracción de metabolitos, n°2: reconstitución de extractos y n°3: Análisis por LC-MS. En la primera fase se retiraron las muestras de linfocitos T CD4⁺ mitoceptadas y control del nitrógeno líquido y se guardaron en hielo a 4°C para el análisis, se preparó el solvente de extracción que correspondió a MeOH (metanol) /H₂O/MTBE (metilterbutileter) bajo campana, se agregó 1mL a cada una de las muestras a 4 °C. Luego se agitó en un homogenizador a 30 Hertz durante 3 minutos y se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C. Una vez terminado se retiró cuidadosamente el sobrenadante (aproximadamente 900 µL) y se pasó a tubo eppendorf de 2 mL y se le agregó 400 µL de MTBE y 400 µL de agua (se observaron dos fases). La mezcla se agitará a 20 Hertz por 1 minuto y se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Como resultado se vieron 2 fases, una acuosa y una orgánica. Con cuidado se retiró la fase orgánica y se pasó a un nuevo tubo rotulado y con otra punta se retiró la fase acuosa y se llevó a un tubo con su rotulo respectivo. Finalmente, las muestras se llevaron a evaporar a 4°C durante toda la noche y una vez evaporadas se guardaron a -20°C para el siguiente paso que es la reconstitución de la muestra.

En la segunda fase denominada reconstitución, se retiraron las muestras de -20°C y se agregó 300 µL de Metanol al 80% en agua (v/v) a 4°C y se agitó en homogeneizador a 30 Hertz por 1 minuto. Luego se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C, del sobrenadante se retiró 150 µL y se llevó a un inserto dentro de un vial de análisis ámbar y 150 µL adicionales se llevaron a otros viales y se guardaron como contramuestra.

En la tercera fase, se preparó la fase móvil correspondiente a H₂O 0,1% AF (ácido fórmico, v/v), y CH₃CN 0,1% AF (v/v), 200 mL de cada solvente filtrados al vacío y se llevaron al equipo junto con los frascos, se incorporaron al equipo. El análisis metabolómico se llevó a cabo mediante LC-MS/MS en un ultra alto sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento y acoplado en tándem con un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo de cuadrupolo. Para el análisis de las muestras, la primera muestra se dejó como un blanco que correspondió al solvente de extracción y luego las muestras. La separación cromatográfica se realizó en una columna HILIC, con un gradiente del 100% de fase móvil terminando con un 50% de fase móvil. El volumen de inyección fue de 15 µl. DAD fue operado en el rango de longitud de onda de 200 nm a 600 nm. El espectrómetro de masas se operó en ESI positivo.

4.7 Análisis de producción de superóxido

Las células agrupadas tanto en el grupo control (Mito-) y mitoceptadp (Mito+) se centrifugaron a 1200 rpm por 10 minutos y se retiró todo el sobrenadante y se resuspendió en PBS tibio con la sonda Mito Sox Red a una concentración de 500 nm se dejó incubando por 30 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Una vez finalizado el tiempo de incubación, las células fueron lavadas gentilmente 3 veces con PBS tibio y finalmente las células fueron analizadas por citometría de flujo y por el microscopio confocal espectral SP8 LIGHTNING, leica.

4.8 Medición de glucosa y lactato en sobrenadante

Se recolecto el sobrenadante al día 1 y 3 post transferencia mitocondrial y luego se diluyeron en una relación 1:10 con agua bidestilada. De esta dilución se introdujeron 10 uL en una placa de 96 pocillos. Para la medición de glucosa se agregarán 200 uL del reactivo de glucosa de BioSystems y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Para la medición de lactato se realizó un mix entre los reactivos A y B del kit de BioSystems en la proporción de 80 uL del reactivo A y 20 uL del reactivo B para cada uno de los pocillos y se incubo 5 minutos a 37°C. una vez terminado el tiempo de incubación la placa se llevó al lector de microplaca para medir lactato a una longitud de 600 nm y glucosa a 500 nm. En ambos casos fue necesario el uso de curvas estándar para obtener la concentración correspondiente.

4.9 Análisis de la captación de glucosa a través de 2NBDG

Las muestras de linfocitos T CD4⁺ mitoceptados, tanto con mitocondria autóloga y mitocondria cancerosa, y linfocitos T CD4⁺ control, fueron centrifugadas a 1500rpm por 10 minutos, luego se retiró todo el sobrenadante y se dejó en PBS una hora en el incubador, posterior a ello se incorporó 100 uL del reactivo 2NBDG (preparado 1:1000 con PBS) y se incubó por 30 minutos a 37°C, una vez terminado, se detuvo la reacción incorporando 1 mL de PBS frío y las células se lavaron centrifugando a 1500 rpm por 5 minutos, al pellet celular se incubó con el reactivo live/dead por 15 minutos y se lavó con 1 mL de PBS y con una centrifugación a 1500 rpm por 10 minutos. Finalmente, las células se dejaron en 200 uL de PBS con beads de conteo y se llevaron al citómetro de flujo.

4.10 Análisis estadístico y análisis de datos.

El análisis estadístico se realizó mediante el programa GraphPad Prism 9, a través de las pruebas estadísticas T test y ANOVA, con $p < 0,05$ (*), $p < 0,0021$ (**), $p < 0,0002$ (***) y $p < 0,0001$ (****). La data de metabolómica se obtuvo mediante Metaboscape con la adquisición del *bucket table* y el análisis de los datos mediante el software MetaboAnalyts, donde se realizó análisis de componentes principales (PCA), análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLSDA), escaso PLS-DA (SPLSDA) y ortogonal PLS-DA (OPLSDA), para la data de las muestras de los grupos Mito+ (con mitocondria) y Mito- (sin mitocondria). La identificación de metabolitos se utilizó el programa Metaboscape en conjunto con la plataforma SIRIUS, identificando los metabolitos más significativos encontrados en el S-plot de la OPLSDA.

5. RESULTADOS:

Para evaluar la eficiencia de la transferencia mitocondrial artificial, uno de los pasos críticos es un eficiente marcaje y posterior aislamiento mitocondrial. En la Figura 1 A se observa una fotografía de microscopia electrónica de transmisión que muestra una mitocondria obtenida posterior al proceso de aislamiento. En la figura 1 B se evaluó el marcaje mitocondrial a través de MitoTrackerGreen (a una concentración de 100 nm) en las células HSC3 a través de imágenes de fluorescencia (Figura 1 B). Una vez determinado que el marcaje era positivo de forma cualitativa, se evaluó también de forma cuantitativa mediante citometría de flujo, representados en plots de la condición control negativo al marcaje. En estos resultados se identificó que el 99.7% de la población adquirió el tinte mitocondrial (Figura 1 C).

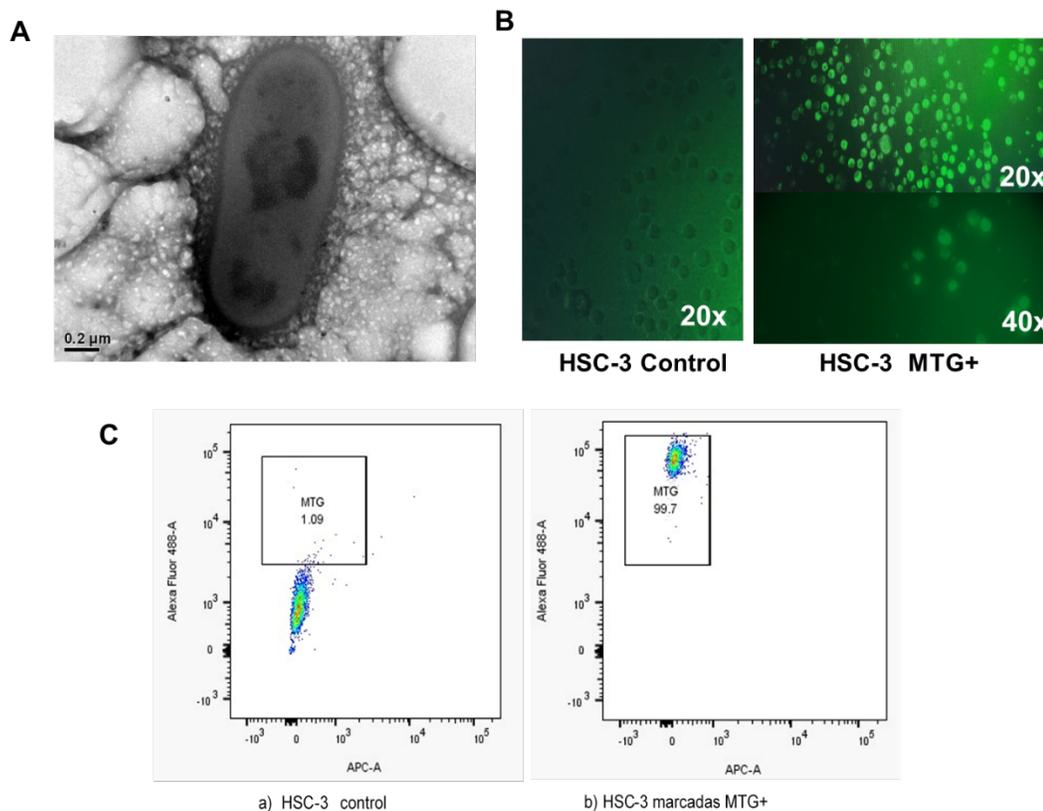


Figura 1: Eficiencia del aislamiento y marcaje mitocondrial de las células dadoras de mitocondrias HSC-3. A) Eficiencia del aislamiento mitocondrial a través de microscopía electrónica de transmisión. B) Imágenes de fluorescencia de HSC3 control, y positivas al marcaje con MitoTracker Green. C) Dot plots de la población positiva para MitoTrackerGreen a través del fluoróforo AlexaFluor 488-A y la viabilidad celular a través del LiveDead en el fluoróforo APC (aloficocianina) y el control negativo al marcador. Resultados obtenidos a través de FlowJo.

Posterior al marcaje y aislamiento, se analizó la eficiencia de la transferencia mitocondrial hacia el linfocito TCD4⁺. En la Figura 2 se representa la eficiencia de la transferencia mitocondrial a través del protocolo de MitoCeption, mediante la adquisición de mitocondrias marcadas verdes con MitoTrackerGreen en linfocitos T CD4⁺ (Figura 2A). En la figura se presentan plots representativos de citometría de flujo de la condición control negativa a la transferencia mitocondrial y el porcentaje de transferencia en la población mito⁺ (células que adquirieron mitocondrias cancerosas), dado por la expresión positiva del tinte mitocondrial. La transferencia también se evaluó por número de célula dadora de mitocondrias. La Figura 2 muestra la eficiencia de la transferencia mitocondrial por número de célula dadora de mitocondrias, utilizando 5 a 10 millones de células HSC-3 (Figura 2B). Hasta la fecha se han realizado un total de 9 transferencias mitocondriales representadas en la Figura 2C, donde se observa un promedio de 60% de transferencia mitocondrial (Figura 2C).

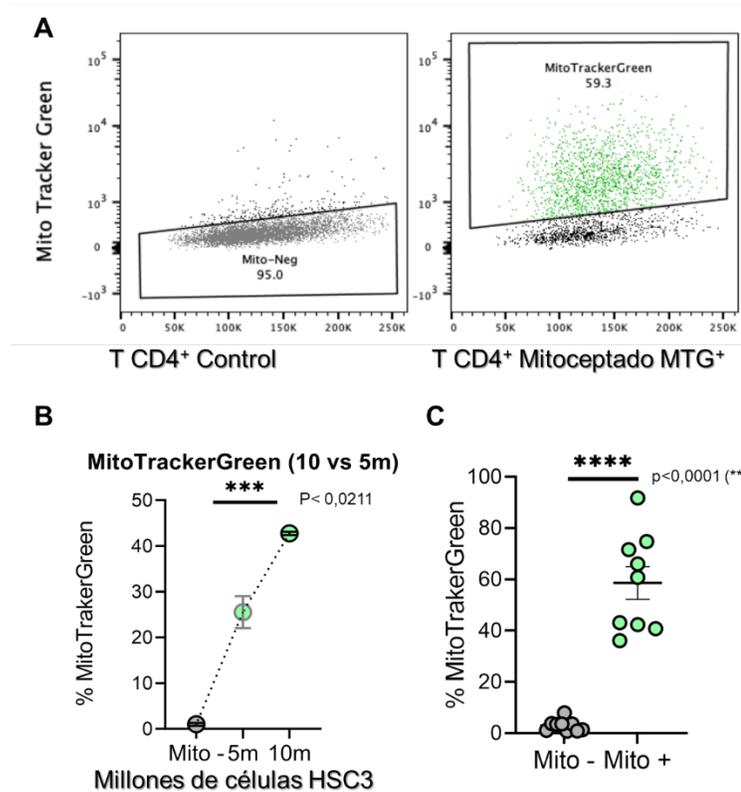


Figura 2: Resultados del proceso de Mitoception hacia linfocitos T CD4⁺ a través de citometría de flujo. A) Dot plots de citometría representativos de la condición control TCD4⁺ y mitoceptadas, indicando la población positiva a la adquisición de mitocondrias marcadas con MitoTracker Green (mito+) de color verde. B) Porcentaje de MitoTracker Green adquirido en el linfocito TCD4⁺, de la condición control (mito-) y Mitoceptadas desde 5 y 10 millones de células HSC-3. N=3, p<0,0211(*), prueba estadística One-way ANOVA. C) Porcentaje de MitoTrackerGreen adquirido en el linfocito TCD4⁺ en linfocitos TCD4⁺ mitoceptadas (Mito+) y control (Mito-). N=9, p<0,0001 (****), prueba estadística t test.

Luego de evaluar la eficiencia de la transferencia mitocondrial, se analizó el efecto de la transferencia mitocondrial sobre la proliferación del linfocito TCD4⁺. La Figura 3 A representa dos histogramas de citometría de flujo indicando el índice de fluorescencia media (MFI) del reactivo Cell Trace Violet, el día 1 y 3 post transferencia mitocondrial (Figura 3A). En cada histograma se observa la condición pre-transferencia sin color, post transferencia del grupo control no mitoceptado (Mito-) en color gris y post-transferencia del grupo mitoceptado (Mito+) en color verde. En ambos días se observa una diferencia en la proliferación entre el grupo control y el grupo mitoceptado. En la Figura 3 B y Figura 3 C se observan dos gráficos que representan el delta del IFM del reactivo Cell Trace Violet al día 1 (Figura 3B) y el día 3 (Figura 3C) pos-transferencia mitocondrial, con respecto al control pre-transferencia respectivamente. Se observó que existe una diferencia significativa entre el grupo control y el mitoceptado para ambos días.

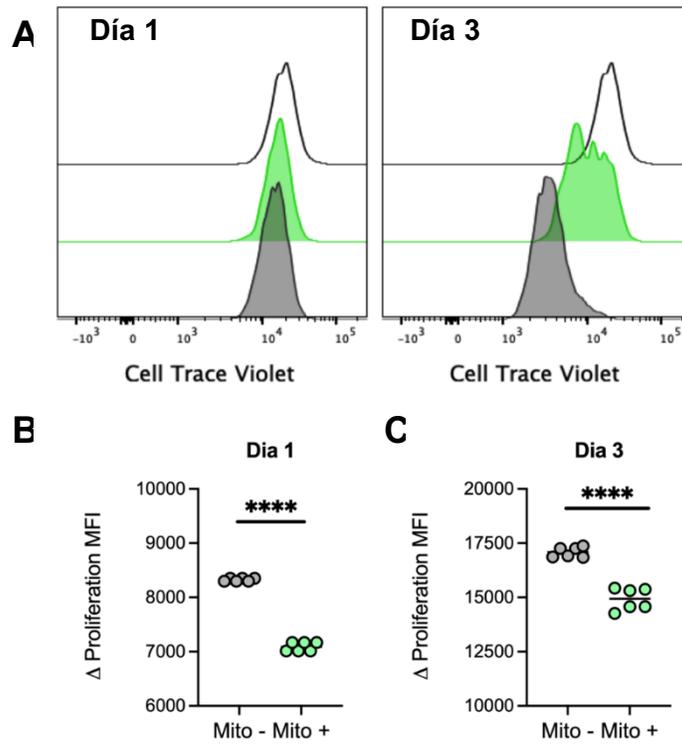


Figura 3: Resultados del ensayo de proliferación a través de citometría de flujo. A) Histograma representativo del índice de fluorescencia media (IFM) del reactivo Cell Trace Violet (CTV) de la población pre-transferencia (sin color), control Mito- (gris) y Mito+ (verde) post transferencia. B) Gráfico del delta del MFI del reactivo CTV al día 1. C) Gráfico del delta del MFI del reactivo CTV al día 3. Resultados obtenidos a través de FlowJo, N=6, $p < 0,0001$ (****), prueba estadística t test.

Luego se analizó el efecto de la transferencia mitocondrial sobre la expresión de diversas moléculas de superficie asociadas a un fenotipo exhausto del linfocito T CD4⁺. En la Figura 4 se representa el histograma representativo de citometría de flujo y el gráfico del porcentaje de expresión de las moléculas de superficie, tanto CD25 (Figura 4A), OX40 (Figura 4B), PD-1 (Figura 4C), PDL-1 (Figura 4D), LAG-3 (Figura 4E), TIM-3 (Figura 4F), TIGIT (Figura 4G) y CTLA-4 (Figura 4H), de la población control (Mito⁻) en color gris y mitoceptada (Mito⁺) en color verde. Se observaron diferencias significativas en 5 moléculas de superficie: PD-1, PDL-1, LAG-3 TIGIT y CTLA-4, dada esta diferencia significativa por un alza en el porcentaje de expresión en el grupo mitoceptado Mito⁺ en comparación con el grupo Mito⁻.

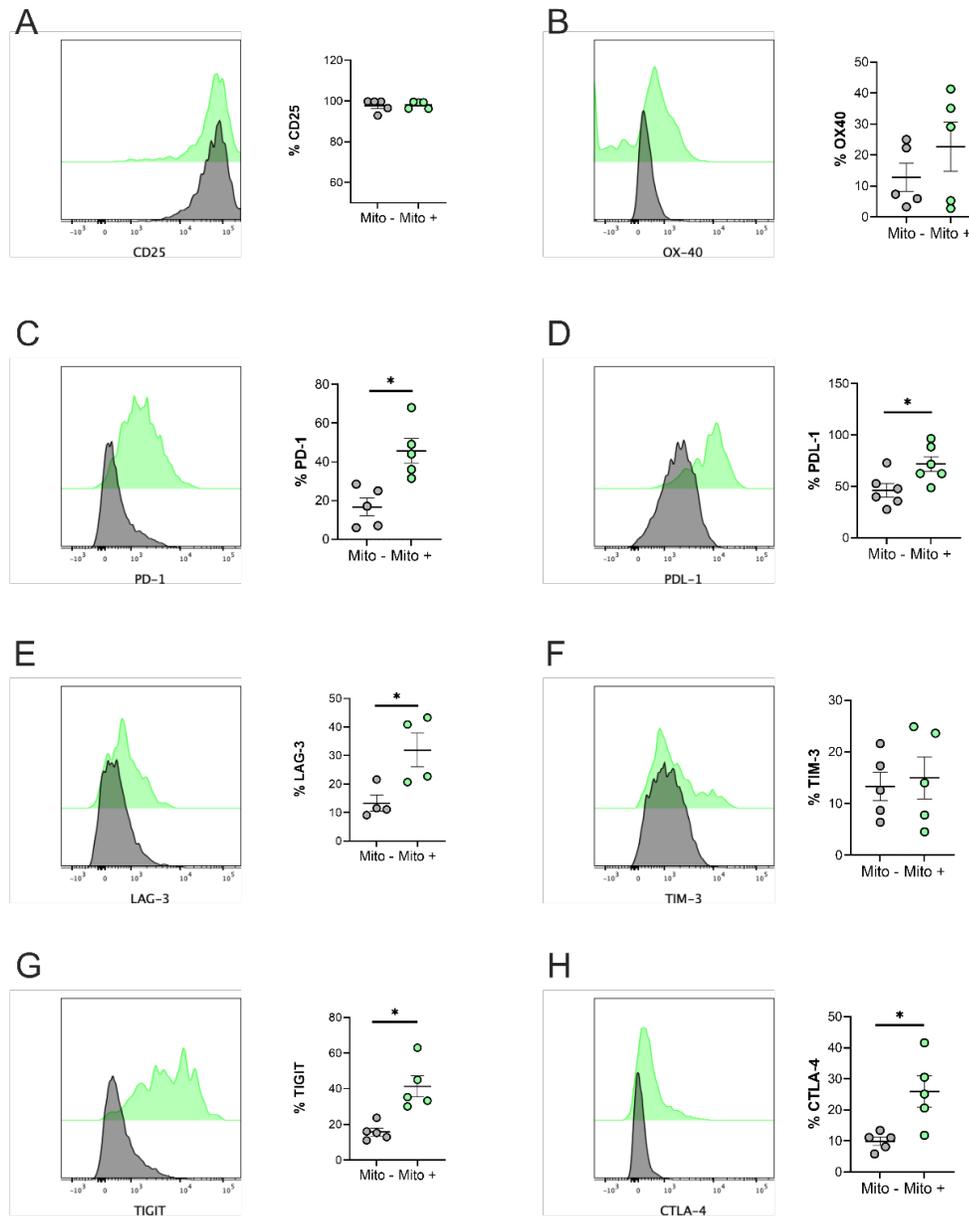


Figura 4: Expresión de moléculas de superficie en los linfocitos TCD4⁺ a través de citometría de flujo. Histogramas representativos del IFM y gráficos del porcentaje de expresión de (A) CD25, (B) OX40, (C) PD-1, (D) PDL-1, (E) LAG-3, (F) TIM-3, (G) TIGIT y (H) CTLA-4. Resultados a través de FlowJo, N=5, p<0,05 (*), prueba estadística t test.

Para confirmar el efecto de la transferencia mitocondrial sobre la inducción de un fenotipo exhausto, se analizó un efecto funcional como lo es la expresión de citoquinas por parte del linfocito T CD4⁺. La Figura 5 muestra la secreción de citoquinas del linfocito T CD4⁺, tanto control (Mito-) y mitoceptado (Mito+), se analizaron las siguientes citoquinas: IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-2, IL-4 e IL-17 (Figura 5). Se observó una disminución significativa en las citoquinas tipo Th1 y Th2: IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-4 en linfocitos T CD4⁺ mitoceptados (Mito+) con mitocondrias provenientes de células cancerosas a diferencia del control (Mito-).

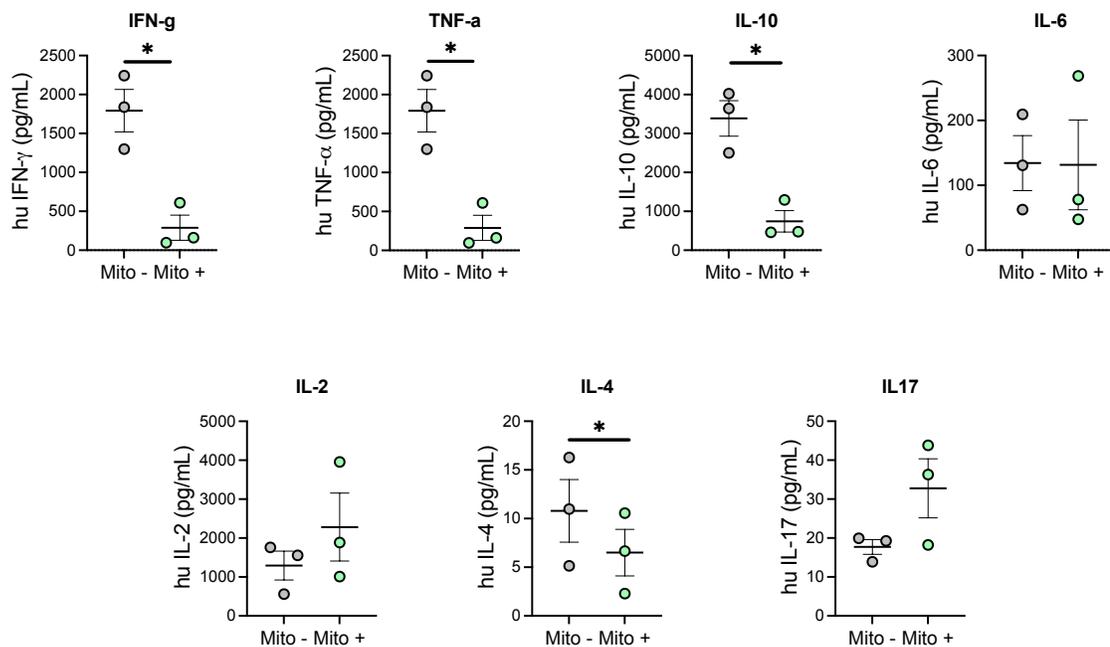


Figura 5: Secreción de citoquinas en linfocitos T CD4⁺ mitoceptados a través de citometría de flujo. Niveles de citoquinas IFN- γ , TNF-a, IL-10, IL-8, IL-2, IL-4 e IL-17 en el sobrenadante de la población TCD4⁺ control (Mito-) y mitoceptado (Mito+). N=3, p<0,05 (*), prueba estadística t test.

Debido a que la función efectora de los linfocitos TCD4⁺ esta de la mano con su metabolismo, se realizó un análisis metabolómico para analizar si la transferencia mitocondrial induce un cambio a nivel metabolómico. En este análisis, se obtuvo un *bucket table* de la información metabolómica de las células control (Mito-) y mitoceptada (Mito+), que se analizó en la plataforma MetaboAnalyst y se obtuvo el PCA, PLSDA y el OPLSDA (Figura 6 A, B y C) representándose las células control (Mito-) en color gris y las mitoceptadas (Mito+) en color verde. Además, se obtuvo el S-plot del OPLSDA (Figura 6 D), que indica las señales de metabolitos que se encuentran diferencialmente expresados en un grupo respecto al otro grupo, dando un total de 4 señales significativas (Figura 6 E). Estas señales se analizaron estadísticamente a través de GraphPad Prism 9 y se observó que no existe una diferencia significativa en ellos (Figura 7 A, B, C y D), pero a pesar de esto, si se observó una tendencia. Por tal motivo se realizó la identificación química de esos metabolitos que se representa en la tabla n°1 utilizando Metaboscape y el programa SIRIUS (Tabla 1).

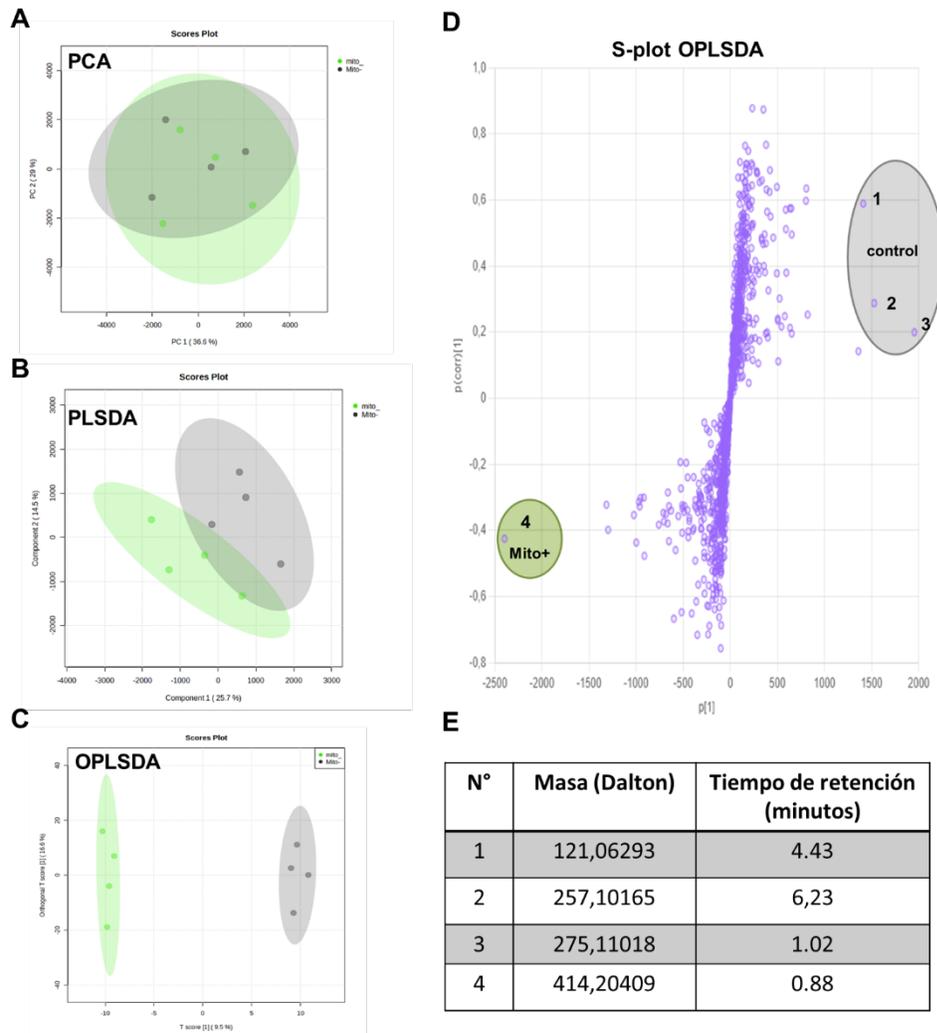


Figura 6: Análisis del metaboloma a través de MetaboAnalyst. Los gráficos de scores del PCA, PLSDA y OPLSDA se representan en la figura A), B) y C). D) S-plot del OPLSDA mostrando los metabolitos representativos tanto del grupo control (Mito-) en círculo azul y grupo mitoceptado (Mito+) en círculo verde. E) Tabla representativa de la masa y tiempo de retención de los metabolitos representativos mostrados en el S-plot.

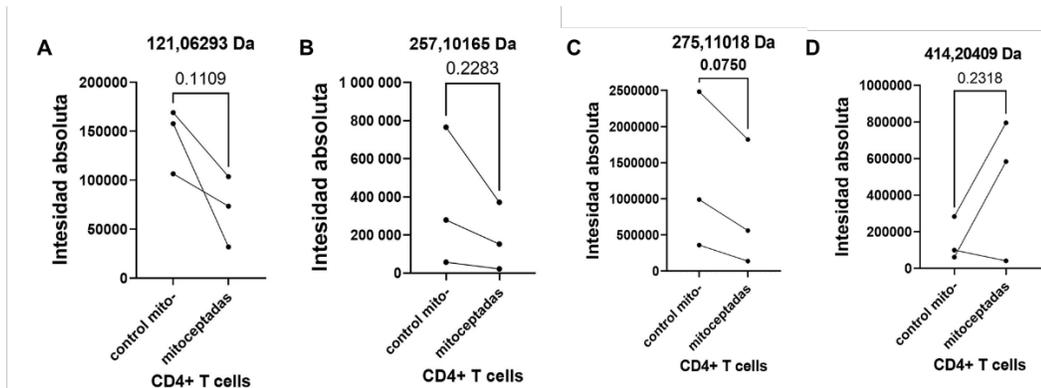


Figura 7: Análisis estadístico de 4 señales del plot del OPLSDA. Señal 121,0693 Da, 257,10165 Da, 275,11018 Da y 414,20409 Da representadas en el gráfico A), B), C) y E) respectivamente. N=3, p=0.1109, p=0,2283, p=0,075 y p=0,2318, prueba estadística T test.

Tabla de identificación de metabolitos del SPLIT del OPLSDA								
Peak n°	RT (minutos)	Nombre putativo metabolito	Clase metabolito	Formula Molecular	ESI (+) m/z	Masa Molecular	error m/z (ppm)	MS/MS Fragmentos
1	4.43	Vitamina B1 Tiamina	Vitamina	C ₁₂ H ₁₆ N ₄ O ₅ [M+H] ⁺	265,11087	264,10359	2,38	122.0701 144.0474 113.0288
2	1.02	Glycerophospholine sn-glycerol-3-phosphocholine	Glicerofosfolípido	C ₈ H ₂₀ N ₀ O ₆ P [M+H] ⁺	258,10935	257,10165	2,51	98.98289 104.10557 124.99842 184.07444

Tabla 1: Identificación de metabolitos a través de Metabescape y SIRIUS.

Dado que se ha indicado que las mitocondrias suelen estar dañadas en las células tumorales, se evaluó el efecto de la transferencia de una mitocondria tumoral sobre los niveles de producción de superóxido mitocondrial en el linfocito T CD4⁺, un indicador de estrés celular, tanto control (Mito-) y mitoceptado (Mito+). En la Figura 8 indica que la transferencia mitocondrial induce una mayor producción de superóxido a diferencia del control (Figura 8). Esto podría estar indicando que existe una baja en el ciclo de krebs en los linfocitos T CD4⁺ post transferencia con mitocondria tumoral.

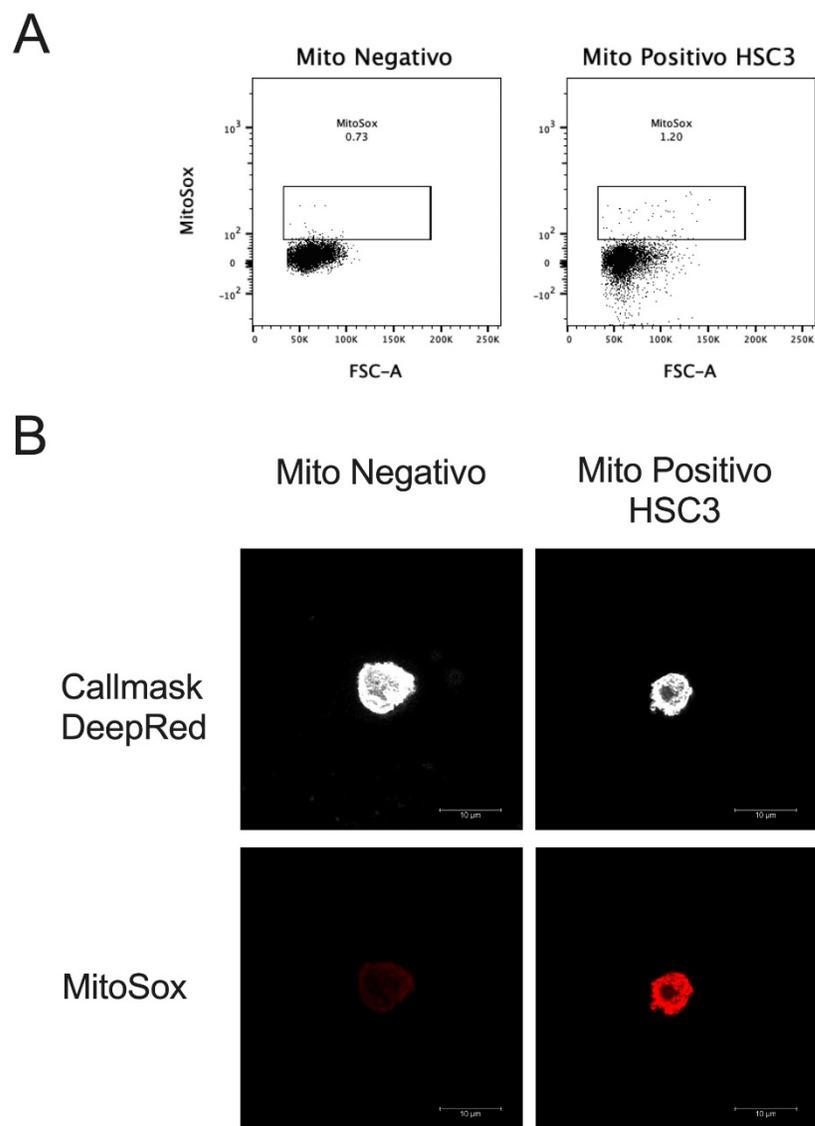


Figura 8: Análisis de la producción de superóxido mitocondrial a través del tinte MitoSox.

A) Plots de Citometría de Flujo representativos del grupo control (Mito-) y mitoceptado (Mito+) con mitocondria tumoral. B) Imagen de Fluorescencia de la producción de superóxido mitocondrial en el grupo control (Mito-) y mitoceptada (Mito+), indicando el Callmask DeepRed que representa la membrana celular y el MitoSox indicador de superóxido.

Dado que se observó que la transferencia mitocondrial induce aumento de superóxido y una baja en la tiamina, un cofactor involucrado en la vía glucolítica y el ciclo de krebs, se realizó un análisis de la glucolisis midiendo la captación y consumo de glucosa de los linfocitos T CD4⁺ del grupo control (Mito-) y mitoceptado (Mito+). Se observó una mayor captación de glucosa a través del 2-NBDG (Figura 9 A, B y C) en el grupo mitoceptado (Mito+) con mitocondria tumoral a diferencia del control (Mito-). Además, esta mayor captación se confirma a través de la cuantificación de la concentración de glucosa en sobrenadante, donde se observa un mayor consumo en el grupo mitoceptado (Mito+) con mitocondria tumoral (Figura 9 D). Como la captación de glucosa está en alza producto de la transferencia mitocondrial, se realizó una cuantificación de la secreción de lactato en el sobrenadante del grupo control (Mito-) y mitoceptado (Mito+) y se observó que la transferencia mitocondrial induce un alza en la secreción de lactato a diferencia del control (Figura 9 E).

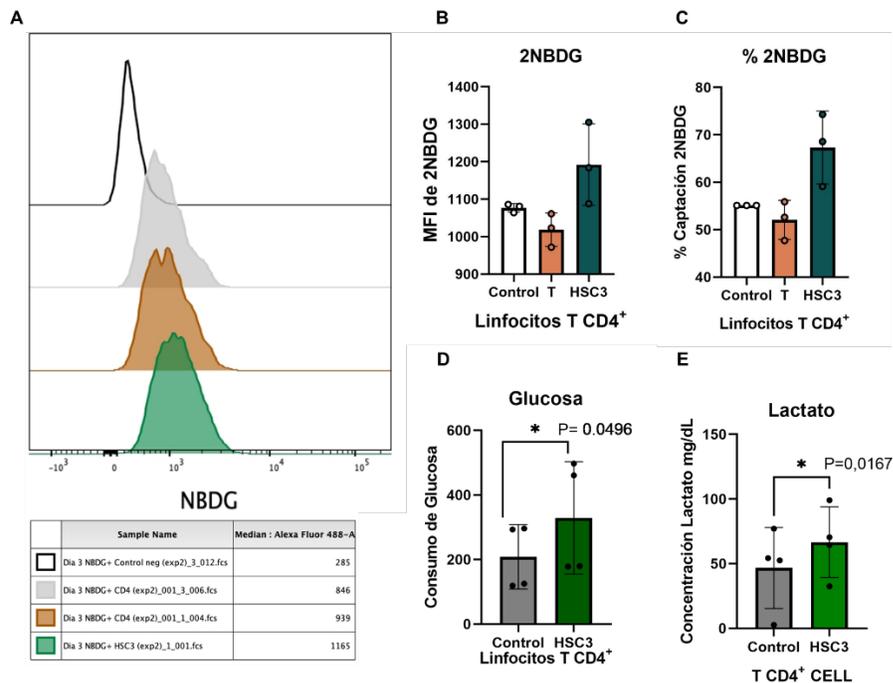


Figura 9: Representación del consumo y captación de glucosa de linfocitos TCD4+ mitoceptados y control. A) Histograma de citometría de flujo representativo del IFM (índice de fluorescencia media) del reactivo 2-NBDG, para 4 condiciones, una basal del reactivo, una de la población control (color gris), una del grupo mitoceptado con mitocondria autóloga (color naranja) y una del grupo mitoceptado con mitocondria tumoral (color verde). B) Gráfico representativo del IFM del 2-NBDG para el grupo control (Mito-) y mitoceptado (Mito+). N=3, prueba estadística t test. C) Porcentaje de la captación de glucosa (% 2-NBDG) del grupo control (Mito-) y mitoceptado (Mito+) al día 3 post-transferencia. N=3, prueba estadística t test. D) Gráfico representativo del consumo de glucosa del grupo control (Mito-), mitoceptado (Mito+) al día 3 post-transferencia, N=4, con $p < 0.05$ (*), prueba estadística t test. E) Gráfico de la concentración de lactato en sobrenadante al día 3 post-transferencia mitocondrial del grupo control (Mito-) y mitoceptado (Mito+) con mitocondria tumoral. N=4, $p < 0.05$ (*), prueba estadística t test.

6. DISCUSIÓN:

El sistema inmune cumple un papel clave en la defensa contra diversas patologías y así como en las enfermedades autoinmunes (Ostroumov D *et al.*, 2018). El linfocito T, tanto el linfocito TCD8⁺ y CD4⁺, mediadores de la respuesta inmune adaptativa celular, ejecutan sus funciones mediante respuestas tanto directas, a través de la liberación de moléculas citotóxicas, como indirectas, en la modulación y coordinación de otras células inmunitarias respectivamente y con ello realizan una defensa contra diversos patógenos (Bell R *et al.*,2016) (Tay R *et al.*,2021). El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo (Han Y *et al.*, 2020) y por ende su estudio es primordial. Con el avance de la ciencia se ha podido descubrir algunos de sus mecanismos de ataque, de crecimiento y proliferación; y también de mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria. La investigación acerca de este hecho es amplia, se han observado diversos mecanismos incluyendo la liberación de metabolitos desde la célula tumoral al microambiente tumoral que altera respuestas de los linfocitos T, también existe una alteración del pH, alteración del metabolismo de diversas células en el microambiente tumoral (Xu Y *et al.*,2021) e inducción de muerte a células inmunitarias mediante la liberación de vesículas que contienen FAS-L (ligando de FAS) (Wieckowski E *et al.*, 2013).

Uno de los cánceres que evade la respuesta inmunitaria del linfocito T es el carcinoma de células escamosas, siendo el más frecuente con un 90% de los cánceres de cabeza y cuello (HNSCC), incluyendo el de la cavidad oral (OSCC). Se sabe que los linfocitos al adentrarse al microambiente tumoral exhiben un fenotipo exhausto caracterizado por la expresión de receptores inhibitorios (Curry J *et al.*,2014) (Dong Y *et al.*,2021) y el cáncer oral no es la excepción a este fenómeno. El fenotipo exhausto se define como un conjunto de características que hacen que una célula inmune no realice su función efectora correctamente, tales características son una baja en la proliferación, secreción de citoquinas y un alza en la expresión de receptores inhibitorios (Jiang Y *et al.*,2015) (Lim A *et al.*, 2020). Lo que al cáncer beneficia puesto a que esta célula inmunitaria al estar sin su función efectora le permite a cáncer proliferar sin la respuesta inmunitaria antitumoral.

Se sabe que el metabolismo está asociado con la ejecución de la función efectora de las células inmunitarias (Scharping N *et al.*,2016) y la mitocondria, el principal organelo de los procesos metabólicos, también se ha visto alterada en el microambiente tumoral (Yu Y *et al.*,2020), y se sabe que las células tumorales utilizan mecanismos de transferencia mitocondrial para obtener beneficios tales como, quimiorresistencia (Pasquier J *et al.*,2013), un aumento en el poder tumorigénico (Dong L *et al.*,2017) y una mejora en la capacidad invasiva en la

célula receptora (Lu J *et al.*,2017) (Qin Y *et al.*,2021). En el contexto del cáncer oral existe un estudio que indica la presencia de nanotubos tunelizados, un mecanismo de transferencia mitocondrial, en el carcinoma de células escamosas de laringe humana (LSCC). Dicho estudio también indicó la presencia de mitocondrias al interior de los nanotubos (Antanavičiūtė I *et al.*,2014), de igual manera para el carcinoma oral de células escamosas (Zhang Z *et al.*, 2020). A estos hechos, junto con el estado exhausto del linfocito T, se sumó el descubrimiento de una cantidad abrupta de proteínas mitocondriales en el secretoma del carcinoma de células escamosas orales, y que estas no se encontraban en el tejido sano. Esta sumatoria de hechos fue que llevó al desarrollo de este estudio, evaluar si es que existe una relación entre fenotipo exhausto y transferencia mitocondrial en el microambiente tumoral. Y efectivamente, al estandarizar el método de transferencia artificial mediante MitoCeption, se observó que la mitocondria adicional a tener un rol metabólico también tiene un papel en la inducción de un fenotipo exhausto, esto analizado a través de un protocolo de transferencia artificial.

En primer lugar, se observó que el linfocito TCD4⁺ es una célula permisiva a la transferencia mitocondrial, utilizando una mitocondria tumoral marcada y aislada con alta eficiencia desde una línea celular de cáncer oral. Esta transferencia fue efectiva en un promedio de un 60%, porcentaje similar a otro estudio de

transferencia mitocondrial hacia el linfocito T, pero utilizando una célula madre mesenquimal como célula dadora de mitocondrias (Court A *et al.*, 2020).

Posterior al proceso de MitoCeption se observó que las células que adquirirían mitocondrias exhibieron una disminución significativa en la proliferación a diferencia de las células control, no mitoceptadas, esto medido al día 1 y 3 post-transferencia mitocondrial artificial, indicando que el hecho de adquirir una mitocondria desde una célula cancerosa de cáncer oral induce que el linfocito tenga una menor proliferación en contraste a un linfocito que no adquirió mitocondria. Además, al medir la expresión de moléculas de superficie, se observó que las células que adquirirían mitocondrias obtenidas desde la célula tumoral exhibían un aumento significativo en la expresión de proteínas asociadas a la baja de la respuesta inmunitaria del linfocito T y la inducción de un fenotipo exhausto, tales como PD-1, TIGIT, CTLA-4, PDL-1 y Lag3 (p: 0,0088; 0,0184; 0,0299; 0,0205; 0,0232 respectivamente), indicando que tal adquisición de mitocondria influye en una de las vías de expresión de estas proteínas, induciendo así un efecto inmuno-regulador en la función efectora del linfocito TCD4⁺. Estas moléculas inhibitorias son moléculas ya conocidas en el contexto del cáncer y se han asociado a efectos negativos en los pacientes (Dong Y *et al.*,2021).

Además, ya que uno de los mecanismos de los linfocitos T para inducir citotoxicidad a las células cancerosas es la liberación de citoquinas, en este estudio se observó que los linfocitos TCD4⁺ que adquirían mitocondrias desde la línea de cáncer HSC-3, disminuyeron significativamente en la secreción de 4 citoquinas, correspondientes a IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 e IL-4, citoquinas de la vía TH1 y TH2 (p: 0,0149; p: 0,0149; 0,0150; p: 0,0353 respectivamente) en comparación con el control, no mitoceptada. Este hecho indica que la mitocondria también estaría induciendo un efecto inmuno-regulador en las vías de señalización para la secreción de estas citoquinas, de manera selectiva en comparación con otras citoquinas de las cuales no se observó una diferencia significativa, sin embargo, también se puede ver una tendencia de la citoquina IL-17, pero se necesitan más estudios que confirmen el hecho y evaluar a profundidad el efecto inmuno-regulador.

Las citoquinas IFN-gamma y TNF-alpha, corresponden a citoquinas citotóxicas que secretan los linfocitos T para inducir citotoxicidad hacia una célula maligna, por ende, tiene lógica asociar una expresión de receptores inhibitorios con una disminución de estas citoquinas. La IL-4 e IL-10 son citoquinas de la vía TH2 asociadas a la inmunidad humoral y la producción de anticuerpos, por ende, esta transferencia podría estar asociada al mantenimiento y regulación de las respuestas inmunes del linfocito B en el microambiente tumoral, pero aún faltan

estudios que acrediten este hecho. La IL-10 causó intriga debido a que corresponde a una citoquina antiinflamatoria que al cáncer le favorecería elevar, pero al observar esta disminución indica que este fenotipo exhausto no está asociado a un alza de citoquinas antiinflamatorias, sino con disminuir las citoquinas inflamatorias, además la IL-10 es expresada por células T reguladoras, por ende, al contrario de otro estudio, una transferencia mitocondrial con mitocondrial tumoral no estaría induciendo una diferenciación a linaje regulador, lo cual aún no se ha comprobado y se necesitaría un ensayo de diferenciación celular del linfocito T, medición de factores de transcripción y ensayos de inmunosupresión para abordar este aspecto, lo que quedaría como una proyección a futuro.

Ya que el metabolismo está asociado con la función inmunitaria, puesto a que, el linfocito T adapta su metabolismo para cumplir con sus respectivas funciones de los diversos estadios de diferenciación, en este estudio al realizarse el análisis multivariado del ensayo metabolómico, en los resultados del PCA y PLSDA obtenidos por la plataforma MetaboAnalyst, no se pudo obtener una separación por grupo de los donantes, tanto el grupo TCD4⁺ control (Mito-) y mitoceptado (Mito+), esto es debido a que a los diferentes donantes no pueden agruparse en un mismo grupo, ya que poseen patrones moleculares y genómicos distintos. En el OPLSDA sí se pudo ver una separación, pero fue forzada por el prueba

estadística, a pesar de ello, a través de la gráfica S-plot del OPLSDA se observaron los *features* que se expresan mayoritariamente tanto para el grupo control (Mito-) y para el grupo mitoceptado (Mito+), los señales fueron graficadas y estadísticamente evaluadas por GraphPad prism9 y a pesar de que no se observó una diferencia significativa, pero si se pudo observar una tendencia, lo que en este contexto igual se tomó importancia, encontrando una baja de la tiamina o Vitamina B1 y de glicerolfosfocolina en los linfocitos TCD4⁺ mitoceptados (Mito+) a diferencia del control (Mito-).

La Vitamina B1 o tiamina tiene una forma activa correspondiente al pirofosfato de tiamina (TPP) formado a través de la tiamina pirofosfoquinasa-1 (TPK1) que es transportado a la mitocondria a través de un transportador codificado por el gen SLC25A (Zastre J *et al.*, *et al.*,2013). Dentro de la mitocondria, la tiamina es utilizada como cofactor por el piruvado deshidrogenasa (PDH) formando a partir de piruvato el acetil-CoA, y la α -cetoglutarato deshidrogenasa (α -KGDH) en el ciclo tricarboxílico (CTA) formando succinil-CoA, también está involucrado en la ruta de las pentosas fosfato (PPP) apoyando a la enzima transcetolasa (TKT) formando ribosa-5-fosfato para la síntesis de ARN y ADN (Peterson C *et al.*, 2020) (Zastre J *et al.*, *et al.*,2013). Además, la tiamina está involucrada en varias funciones en el sistema inmunológico, tiene un rol antioxidante al proteger a los neutrófilos de la oxidación de sus grupos sulfhidrilo, suprime la activación de los

macrófagos por estrés oxidativo de NF-KB y así permite la liberación de citoquinas, quimioquinas, factores de crecimientos y proteínas de la respuesta inmune, tiene un rol en la secreción de inmunoglobulinas y también está relacionada con las dependientes de hemina oxigenasas cuya acción en el sistema inmunitario afecta a la liberación de los miembros específicos de la ICAM (molécula intracelular de adhesión de proteínas), éstas se unen a las integrinas durante las reacciones inmunológicas que a su vez afecta la actividad de las células T. En el ámbito del cáncer se ha informado que la Vitamina B1 inhibe la actividad intracelular de p53, durante la replicación y la apoptosis (Manzetti S *et al.*, 2014).

Debido a la importancia de las enzimas dentro de las mitocondrias, la disponibilidad de tiamina dicta la homeostasis del oxígeno molecular y la producción de ATP mitocondrial. Estas dos variables influyen en la totalidad del metabolismo (Marrs C *et al.*,2021). En nuestros resultados la tendencia de la Vitamina B1, es a una disminución en el grupo de linfocitos TCD4⁺ mitoceptados (Mito+) a diferencia del control (Mito-), esto con un p: 0,1109 evaluado a través de la prueba estadística t test. Existen antecedentes que, al haber tiamina insuficiente, esto altera la respiración mitocondrial induciendo un estado de pseudohipoxia, lo que, a diferencia de la hipoxia isquémica, está a pesar de haber

suficiente oxígeno, las mitocondrias no pueden utilizarlo de manera efectiva (Marrs C *et al.*,2021).

Además, sumando el hecho que la tiamina tiene un rol protegiendo del estrés a los neutrófilos y actúa como cofactor en el metabolismo del piruvato en la mitocondria, se realizó un análisis de la producción de superóxido mitocondrial de los linfocitos T CD4⁺ mitoceptados (Mito+) y control (Mito-), y se observó que la transferencia mitocondrial induce producción de superóxido en los linfocitos T CD4⁺ mitoceptado (Mito+) a diferencia del control (Mito-), esto medido a través del reactivo MitoSox que a medida que se produce superóxido va emitiendo una fluorescencia de color rojo en las células. El hecho de inducir producción de superóxido indica e la mitocondria adquirida por transferencia induce estrés oxidativo en la célula, lo que apoyaría el hecho de que la vía de producción de energía por el ciclo de krebs esta deficiente en los linfocitos T CD4⁺ mitoceptados (Mito+), ya sea por la baja del cofactor tiamina y por la producción de superóxido mitocondrial. Esto indicaría que se ve favorecida la vía glucolítica del metabolismo del linfocito T CD4⁺, lo que se confirma en los resultados de la captación y consumo de glucosa donde se observó un alza en la captación y un mayor consumo de glucosa en los linfocitos TCD4⁺ mitoceptados (Mito+) a diferencia del control (Mito-).

Además, como la tiamina también actúa como cofactor en la conversión del piruvato en Acetil-CoA y la tiamina se encuentra a la baja en los linfocitos TCD4⁺ mitoceptados (Mito+), se estaría favoreciendo la vía de producción de lactato, lo que concuerda con los resultados obtenidos al cuantificar la secreción de lactato en sobrenadante en los linfocitos TCD4⁺ mitoceptados (Mito+) y control (Mito-), donde se observó una mayor concentración de lactato por linfocitos TCD4⁺ mitoceptados (Mito+) a diferencia del control (Mito-). En el microambiente tumoral se sabe que las células cancerosas consumen mayoritariamente todos los nutrientes del medio, por ende, los linfocitos al adquirir esta mayor captación de glucosa en el momento de introducirse en el microambiente tumoral, no podrían sustentarse puesto a que las células cancerosas consumirían la glucosa de mayor medida del microambiente, en otras palabras, se podría estar indicando que la transferencia mitocondrial acorralaría al linfocito T CD4⁺ a una vía metabólica de la cual no puede sustentarse y sobrevivir, por ende, no ejecutar su función inmunitaria de manera efectiva.

Sumando estos resultados, y al ser el primer estudio realizado en esta índole, podría indicar un nuevo mecanismo utilizado por la célula tumoral para realizar el escape inmunológico de la respuesta inmune adaptativa del linfocito TCD4⁺ a través de la inducción de este fenotipo exhausto junto con una alteración metabólica y estrés oxidativo por producción de superóxido mitocondrial. Este

proceso de transferencia mitocondrial al ser artificial permite evaluar solo el efecto de la mitocondria sin considerar otros factores que se pueden encontrar en el co-cultivo celular y que puedan estar induciendo tales efectos. Por ende, al ya encontrarse que la transferencia mitocondria induce una inmuno-regulación en el linfocito TCD4⁺ esto permite el paso de más investigaciones en esta índole, como, por ejemplo, identificar el mecanismo de transferencia utilizado, estímulos que induzcan tal proceso, si es que la mitocondria se introduce en la red mitocondrial endógena, así como evaluar un mecanismo bidireccional de transferencia mitocondrial, lo que serían las proyecciones de este trabajo de investigación.

7.- ANEXO:

7.1 Anexo n°1: Cálculo para el conteo de células en la cámara de Neubauer:

n° : Factor de dilución $(10) \times 10$ (factor de la cámara) $\times \mu\text{l}$ (PBS o medio) $\times n^\circ$ contado

7.2 Anexo n°2: Manejo de residuos biológicos:

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



Ilustración 15: Depósito de desechos biológicos, Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología, Universidad de Concepción.

7.3 Anexo nº3: Documento de proyecto aceptado por el comité de ética, bioética y bioseguridad de la Universidad de Concepción.

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



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

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


DRA. M. ANDREA RODRÍGUEZ TASTETS

PRESIDENTA

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



Ilustración 16: Documento de aprobación del comité de ética, bioética y bioseguridad de la universidad de Concepción.

8.- BIBLIOGRAFÍA:

- Abbas, Lichtman, Pillai, (2012). *Inmunología Celular y Molecular*. 7ª Edición, (558)
- Ahmadzadeh, M., Johnson, L. A., Heemskerk, B., Wunderlich, J. R., Dudley, M. E., White, D. E., & Rosenberg, S. A. (2009). Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*, 114(8), 1537–1544. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-195792>
- Angajala, A., Lim, S., Phillips, J. B., Kim, J. H., Yates, C., You, Z., & Tan, M. (2018). Diverse Roles of Mitochondria in Immune Responses: Novel Insights Into Immuno-Metabolism. *Frontiers in immunology*, 9, 1605. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01605>
- Antanavičiūtė, I., Rysevaitė, K., Liutkevičius, V., Marandykina, A., Rimkutė, L., Sveikatiėnė, R., Uloza, V., & Skeberdis, V. A. (2014). Long-distance communication between laryngeal carcinoma cells. *PLoS one*, 9(6), e99196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099196>
- Bardhan, K., Anagnostou, T., & Boussiotis, V. A. (2016). The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Frontiers in immunology*, 7, 550. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00550>
- Beckermann, K. E., Dudzinski, S. O., & Rathmell, J. C. (2017). Dysfunctional T cell metabolism in the tumor microenvironment. *Cytokine & growth factor reviews*, 35, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2017.04.003>
- Bell, R. B., Leidner, R. S., Crittenden, M. R., Curti, B. D., Feng, Z., Montler, R., ... Urba, W. J. (2016). OX40 signaling in head and neck squamous cell carcinoma: Overcoming immunosuppression in the tumor microenvironment. *Oral Oncology*, 52, 1–10. [doi:10.1016/j.oraloncology.2015.11.001](https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.11.001)
- Buck, M. D., O'Sullivan, D., Klein Geltink, R. I., Curtis, J. D., Chang, C. H., Sanin, D. E., Qiu, J., Kretz, O., Braas, D., van der Windt, G. J., Chen, Q., Huang, S. C., O'Neill, C. M., Edelson, B. T., Pearce, E. J., Sesaki, H., Huber, T. B., Rambold, A. S., & Pearce, E. L. (2016). Mitochondrial Dynamics Controls T Cell Fate through Metabolic Programming. *Cell*, 166(1), 63–76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.035>
- Bujak, R., Dagher-Wojtkowiak, E., Kaliszan, R. y Markuszewski, MJ (2016). Métodos basados en PLS y basados en la regularización para la selección de variables relevantes en datos de metabolómica no dirigidos. *Fronteras en biociencias moleculares*, 3, 35. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00035>
- Buszewski, B., & Noga, S. (2012). Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)--a powerful separation technique. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 402(1), 231–247. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5308-5>
- Caicedo, A., Fritz, V., Brondello, J. M., Ayala, M., Dennemont, I., Abdellaoui, N., de Fraipont, F., Moisan, A., Prouteau, C. A., Boukhaddaoui, H., Jorgensen, C., & Vignais, M. L. (2015). MitoCeption as a new tool to assess the effects of mesenchymal stem/stromal cell mitochondria on cancer cell metabolism and function. *Scientific reports*, 5, 9073. <https://doi.org/10.1038/srep09073>
- Catakovic, K., Klieser, E., Neureiter, D., & Geisberger, R. (2017). T cell exhaustion: from pathophysiological basics to tumor immunotherapy. *Cell communication and signaling : CCS*, 15(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s12964-016-0160-z>

- Chauvin, J. M., & Zarour, H. M. (2020). TIGIT in cancer immunotherapy. *Journal for immunotherapy of cancer*, 8(2), e000957. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-000957>
- Chen, S., Wainwright, D. A., Wu, J. D., Wan, Y., Matei, D. E., Zhang, Y., & Zhang, B. (2019). CD73: an emerging checkpoint for cancer immunotherapy. *Immunotherapy*, 11(11), 983–997. <https://doi.org/10.2217/imt-2018-0200>
- Court, A. C., Le-Gatt, A., Luz-Crawford, P., Parra, E., Aliaga-Tobar, V., Bátiz, L. F., Contreras, R. A., Ortúzar, M. I., Kurte, M., Elizondo-Vega, R., Maracaja-Coutinho, V., Pino-Lagos, K., Figueroa, F. E., & Khoury, M. (2020). Mitochondrial transfer from MSCs to T cells induces Treg differentiation and restricts inflammatory response. *EMBO reports*, 21(2), e48052. <https://doi.org/10.15252/embr.201948052>
- Curry, J. M., Sprandio, J., Cognetti, D., Luginbuhl, A., Bar-ad Voichita, Pribitkin, E., & Tuluc, M. (2014). Tumor Microenvironment in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Seminars in Oncology*, 41(2), 217–234. doi:10.1053/j.seminoncol.2014.03.
- Chong, J., Wishart, D. S., & Xia, J. (2019). Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Current protocols in bioinformatics*, 68(1), e86. <https://doi.org/10.1002/cpbi.86>
- Dong, L. F., Kovarova, J., Bajzikova, M., Bezawork-Geleta, A., Svec, D., Endaya, B., Sachaphibulkij, K., Coelho, A. R., Sebkova, N., Ruzickova, A., Tan, A. S., Kluckova, K., Judasova, K., Zamecnikova, K., Rychtarcikova, Z., Gopalan, V., Andera, L., Sobol, M., Yan, B., Pattnaik, B., ... Neuzil, J. (2017). Horizontal transfer of whole mitochondria restores tumorigenic potential in mitochondrial DNA-deficient cancer cells. *eLife*, 6, e22187. <https://doi.org/10.7554/eLife.22187>
- Dong, Y., Wang, Z., Mao, F., Cai, L., Dan, H., Jiang, L., Zeng, X., Li, T., Zhou, Y., & Chen, Q. (2021). PD-1 blockade prevents the progression of oral carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 42(6), 891–902. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgab035>
- Farhood, B., Najafi, M., & Mortezaee, K. (2018). CD8+ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. *Journal of Cellular Physiology*. doi:10.1002/jcp.27782
- Fu, Z. M., Zhang, D. J., Guo, Y. Y., Han, S., Guo, F., Bai, J., Wan, Y. N., Guan, G. F., Sun, K. W., & Yang, N. (2022). Expression of PD-L1 and CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes predict survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular and clinical oncology*, 16(3), 59. <https://doi.org/10.3892/mco.2022.2492>
- Fujita, Y., Yoshioka, Y., & Ochiya, T. (2016). Extracellular vesicle transfer of cancer pathogenic components. *Cancer science*, 107(4), 385–390. <https://doi.org/10.1111/cas.12896>
- Gros, A., Robbins, P. F., Yao, X., Li, Y. F., Turcotte, S., Tran, E., Wunderlich, J. R., Mixon, A., Farid, S., Dudley, M. E., Hanada, K., Almeida, J. R., Darko, S., Douek, D. C., Yang, J. C., & Rosenberg, S. A. (2014). PD-1 identifies the patient-specific CD8+ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *The Journal of clinical investigation*, 124(5), 2246–2259. <https://doi.org/10.1172/JCI73639>
- Han, J., Li, Q., Chen, Y., & Yang, Y. (2021). Recent Metabolomics Analysis in Tumor Metabolism Reprogramming. *Frontiers in molecular biosciences*, 8, 763902. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.763902>
- Han, Y., Liu, D. y Li, L. (2020). Vía PD-1/PD-L1: investigaciones actuales en cáncer. *Revista estadounidense de investigación del cáncer*, 10 (3), 727–742.

- Hao, Y., Huo, J., Wang, T., Sun, G., & Wang, W. (2020). Chemical profiling of *Coptis* rootlet and screening of its bioactive compounds in inhibiting *Staphylococcus aureus* by UPLC-Q-TOF/MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 180, 113089. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.113089>
- Hayakawa, K., Esposito, E., Wang, X., Terasaki, Y., Liu, Y., Xing, C., Ji, X., & Lo, E. H. (2016). Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature*, 535(7613), 551–555. <https://doi.org/10.1038/nature18928>
- Hough, K. P., Trevor, J. L., Strenkowski, J. G., Wang, Y., Chacko, B. K., Tousif, S., Chanda, D., Steele, C., Antony, V. B., Dokland, T., Ouyang, X., Zhang, J., Duncan, S. R., Thannickal, V. J., Darley-Usmar, V. M., & Deshane, J. S. (2018). Exosomal transfer of mitochondria from airway myeloid-derived regulatory cells to T cells. *Redox biology*, 18, 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.06.009>
- Ishii, N., Takahashi, T., Soroosh, P., & Sugamura, K. (2010). OX40–OX40 Ligand Interaction in T-Cell-Mediated Immunity and Immunopathology. *Advances in Immunology*, 63–98. doi:10.1016/s0065-2776(10)05003-0
- Jackson, M. V., Morrison, T. J., Doherty, D. F., McAuley, D. F., Matthay, M. A., Kissenpfennig, A., O'Kane, C. M., & Krasnodembskaya, A. D. (2016). Mitochondrial Transfer via Tunneling Nanotubes is an Important Mechanism by Which Mesenchymal Stem Cells Enhance Macrophage Phagocytosis in the In Vitro and In Vivo Models of ARDS. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 34(8), 2210–2223. <https://doi.org/10.1002/stem.2372>
- Jang, C., Chen, L., & Rabinowitz, J. D. (2018). Metabolomics and Isotope Tracing. *Cell*, 173(4), 822–837. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.055>
- Jasna V. Campos, Sebastián Riquelme, Lukas Pecio, Lubia Guedes, Claudia Mardones, Rosa Alzamora, Luis E. Arteaga-Pérez, Rafael Rubilar, Oliver Fiehn, Andy J. Pérez, (2022). Constitutive and inducible defense in *Eucalyptus* determines the feeding host of *Gonipterus platensis*, denoting specific plant-insect coevolution and a strategy for resistance improvement, *Industrial Crops and Products*, Volume 189, 115811, ISSN 0926-6690, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115811>.
- Jiang, Y., Li, Y., & Zhu, B. (2015). T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell death & disease*, 6(6), e1792. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.162>
- Johnson, D. E., Burtneis, B., Leemans, C. R., Lui, V., Bauman, J. E., & Grandis, J. R. (2020). Head and neck squamous cell carcinoma. *Nature reviews. Disease primers*, 6(1), 92. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00224-3>
- Judge, A., & Dodd, M. S. (2020). *Metabolism. Essays in biochemistry*, 64(4), 607–647. <https://doi.org/10.1042/EBC20190041>
- Kalyanaraman B. (2017). Teaching the basics of cancer metabolism: Developing antitumor strategies by exploiting the differences between normal and cancer cell metabolism. *Redox biology*, 12, 833–842. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.018>
- Lim, A. R., Rathmell, W. K., & Rathmell, J. C. (2020). The tumor microenvironment as a metabolic barrier to effector T cells and immunotherapy. *eLife*, 9, e55185. <https://doi.org/10.7554/eLife.55185>
- Lim, K. P., Chun, N. A., Ismail, S. M., Abraham, M. T., Yusoff, M. N., Zain, R. B., Ngeow, W. C., Ponniah, S., & Cheong, S. C. (2014). CD4+CD25hiCD127low regulatory T cells are increased in oral squamous cell carcinoma patients. *PLoS one*, 9(8), e103975. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103975>

- Lipp, J. J., Wang, L., Yang, H., Yao, F., Harrer, N., Müller, S., Berezowska, S., Dorn, P., Marti, T. M., Schmid, R. A., Hegedüs, B., Souabni, A., Carotta, S., Pearson, M. A., Sommergruber, W., Kocher, G. J., & Hall, S. (2022). Functional and molecular characterization of PD1+ tumor-infiltrating lymphocytes from lung cancer patients. *Oncoimmunology*, 11(1), 2019466. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2021.2019466>
- Lu, J., Zheng, X., Li, F., Yu, Y., Chen, Z., Liu, Z., Wang, Z., Xu, H., & Yang, W. (2017). Tunneling nanotubes promote intercellular mitochondria transfer followed by increased invasiveness in bladder cancer cells. *Oncotarget*, 8(9), 15539–15552. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14695>
- Luz-Crawford, P., Hernandez, J., Djouad, F., Luque-Campos, N., Caicedo, A., Carrère-Kremer, S., Brondello, J. M., Vignais, M. L., Pène, J., & Jorgensen, C. (2019). Mesenchymal stem cell repression of Th17 cells is triggered by mitochondrial transfer. *Stem cell research & therapy*, 10(1), 232. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1307-9>
- Ma, J., Zheng, B., Goswami, S., Meng, L., Zhang, D., Cao, C., Li, T., Zhu, F., Ma, L., Zhang, Z., Zhang, S., Duan, M., Chen, Q., Gao, Q., & Zhang, X. (2019). PD1Hi CD8+ T cells correlate with exhausted signature and poor clinical outcome in hepatocellular carcinoma. *Journal for immunotherapy of cancer*, 7(1), 331. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0814>
- Maimela, N. R., Liu, S., & Zhang, Y. (2019). Fates of CD8+ T cells in Tumor Microenvironment. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 1–13. doi:10.1016/j.csbj.2018.11.004
- Manzetti, S., Zhang, J., & van der Spoel, D. (2014). Thiamin function, metabolism, uptake, and transport. *Biochemistry*, 53(5), 821–835. <https://doi.org/10.1021/bi401618y>
- Marrs, C., & Lonsdale, D. (2021). Hiding in Plain Sight: Modern Thiamine Deficiency. *Cells*, 10(10), 2595. <https://doi.org/10.3390/cells10102595>
- McLane, L. M., Abdel-Hakeem, M. S., & Wherry, E. J. (2015). CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. *Annual Review of Immunology*, 37(1). doi:10.1146/annurev-immunol-041015-055318
- Missiroli, S., Perrone, M., Genovese, I., Pinton, P., & Giorgi, C. (2020). Cancer metabolism and mitochondria: Finding novel mechanisms to fight tumours. *EBioMedicine*, 59, 102943. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102943>
- Morrison, T. J., Jackson, M. V., Cunningham, E. K., Kissenpfennig, A., McAuley, D. F., O'Kane, C. M., & Krasnodembskaya, A. D. (2017). Mesenchymal Stromal Cells Modulate Macrophages in Clinically Relevant Lung Injury Models by Extracellular Vesicle Mitochondrial Transfer. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 196(10), 1275–1286. <https://doi.org/10.1164/rccm.201701-0170OC>
- Nyamundanda, G., Brennan, L. & Gormley, I.C. Probabilistic principal component analysis for metabolomic data. *BMC Bioinformatics* 11, 571 (2010). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-571>
- Oestreich, K. J., Yoon, H., Ahmed, R., & Boss, J. M. (2008). NFATc1 regulates PD-1 expression upon T cell activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(7), 4832–4839. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.7.4832>
- Ogando, J., Sáez, M. E., Santos, J., Nuevo-Tapióles, C., Gut, M., Esteve-Codina, A., Heath, S., González-Pérez, A., Cuezva, J. M., Lacalle, R. A., & Mañes, S. (2019). PD-1 signaling affects cristae morphology and leads to mitochondrial dysfunction in human CD8+ T lymphocytes. *Journal for immunotherapy of cancer*, 7(1), 151. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0628-7>

- Olguín, J. E., Medina-Andrade, I., Molina, E., Vázquez, A., Pacheco-Fernández, T., Saavedra, R., Pérez-Plasencia, C., Chirino, Y. I., Vaca-Paniagua, F., Arias-Romero, L. E., Gutierrez-Cirlos, E. B., León-Cabrera, S. A., Rodríguez-Sosa, M., & Terrazas, L. I. (2018). Early and Partial Reduction in CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells during Colitis-Associated Colon Cancer Induces CD4+ and CD8+ T Cell Activation Inhibiting Tumorigenesis. *Journal of Cancer*, 9(2), 239–249. <https://doi.org/10.7150/jca.21336>
- Olmo-García, L., Kessler, N., Neuweger, H., Wendt, K., Olmo-Peinado, J. M., Fernández-Gutiérrez, A., Baessmann, C., & Carrasco-Pancorbo, A. (2018). Unravelling the Distribution of Secondary Metabolites in *Olea europaea* L.: Exhaustive Characterization of Eight Olive-Tree Derived Matrices by Complementary Platforms (LC-ESI/APCI-MS and GC-APCI-MS). *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(10), 2419. <https://doi.org/10.3390/molecules23102419>
- Pang, Y., Zhang, C., & Gao, J. (2021). Macrophages as Emerging Key Players in Mitochondrial Transfers. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 747377. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.747377>
- Pardoll D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews. Cancer*, 12(4), 252–264. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>
- Pasquier, J., Guerrouahen, B. S., Al Thawadi, H., Ghiabi, P., Maleki, M., Abu-Kaoud, N., Jacob, A., Mirshahi, M., Galas, L., Rafii, S., Le Foll, F., & Rafii, A. (2013). Preferential transfer of mitochondria from endothelial to cancer cells through tunneling nanotubes modulates chemoresistance. *Journal of translational medicine*, 11, 94. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-94>
- Patel, C. H., & Powell, J. D. (2017). Targeting T cell metabolism to regulate T cell activation, differentiation and function in disease. *Current opinion in immunology*, 46, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.04.006>
- Pauken, K. E., & Wherry, E. J. (2015). Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends in immunology*, 36(4), 265–276. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.02.008>
- Peterson, C. T., Rodionov, D. A., Osterman, A. L., & Peterson, S. N. (2020). B Vitamins and Their Role in Immune Regulation and Cancer. *Nutrients*, 12(11), 3380. <https://doi.org/10.3390/nu12113380>
- Qin, Y., Jiang, X., Yang, Q., Zhao, J., Zhou, Q., & Zhou, Y. (2021). The Functions, Methods, and Mobility of Mitochondrial Transfer Between Cells. *Frontiers in oncology*, 11, 672781. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.672781>
- Rangel Rivera, G. O., Knochelmann, H. M., Dwyer, C. J., Smith, A. S., Wyatt, M. M., Rivera-Reyes, A. M., Thaxton, J. E., & Paulos, C. M. (2021). Fundamentals of T Cell Metabolism and Strategies to Enhance Cancer Immunotherapy. *Frontiers in immunology*, 12, 645242. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.645242>
- Raphael, I., Joern, R. R., & Forsthuber, T. G. (2020). Memory CD4+ T Cells in Immunity and Autoimmune Diseases. *Cells*, 9(3), 531. <https://doi.org/10.3390/cells9030531>
- Ribas, A., & Wolchok, J. D. (2018). Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science (New York, N.Y.)*, 359(6382), 1350–1355. <https://doi.org/10.1126/science.aar4060>
- Sahinbegovic, H., Jelinek, T., Hrdinka, M., Bago, J. R., Turi, M., Sevcikova, T., ... Simicek, M. (2020). Intercellular Mitochondrial Transfer in the Tumor Microenvironment. *Cancers*, 12(7), 1787. [doi:10.3390/cancers12071787](https://doi.org/10.3390/cancers12071787)

- Salmaninejad, A., Valilou, S. F., Shabgah, A. G., Aslani, S., Alimardani, M., Pasdar, A., & Sahebkar, A. (2019). PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy. *Journal of Cellular Physiology*. doi:10.1002/jcp.28358
- Scharping, N. E., Menk, A. V., Moreci, R. S., Whetstone, R. D., Dadey, R. E., Watkins, S. C., Ferris, R. L., & Delgoffe, G. M. (2016). The Tumor Microenvironment Represses T Cell Mitochondrial Biogenesis to Drive Intratumoral T Cell Metabolic Insufficiency and Dysfunction. *Immunity*, 45(2), 374–388. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.07.009>
- Sena, L. A., Li, S., Jairaman, A., Prakriya, M., Ezponda, T., Hildeman, D. A., Wang, C. R., Schumacker, P. T., Licht, J. D., Perlman, H., Bryce, P. J., & Chandel, N. S. (2013). Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling. *Immunity*, 38(2), 225–236. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.10.020>
- Shanmughapriya, S., Langford, D., & Natarajaseenivasan, K. (2020). Inter and Intracellular mitochondrial trafficking in health and disease. *Ageing research reviews*, 62, 101128. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101128>
- Sharaf, B. M., Giddey, A. D., Alniss, H., Al-Hroub, H. M., El-Awady, R., Mousa, M., Almehtdi, A., Soares, N. C., & Semreen, M. H. (2022). Untargeted Metabolomics of Breast Cancer Cells MCF-7 and SkBr3 Treated With Tamoxifen/Trastuzumab. *Cancer genomics & proteomics*, 19(1), 79–93. <https://doi.org/10.21873/cgp.20305>
- Shi, Z., Li, H., Zhang, W., Chen, Y., Zeng, C., Kang, X., Xu, X., Xia, Z., Qing, B., Yuan, Y., Song, G., Caldana, C., Hu, J., Willmitzer, L., & Li, Y. (2022). A Comprehensive Mass Spectrometry-Based Workflow for Clinical Metabolomics Cohort Studies. *Metabolites*, 12(12), 1168. <https://doi.org/10.3390/metabo12121168>
- Stasikowska-Kanicka, O., Wągrowaska-Danilewicz, M., & Danilewicz, M. (2018). Immunohistochemical Analysis of Foxp3+, CD4+, CD8+ Cell Infiltrates and PD-L1 in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Pathology oncology research : POR*, 24(3), 497–505. <https://doi.org/10.1007/s12253-017-0270-y>
- Sugiura, A., & Rathmell, J. C. (2018). Metabolic Barriers to T Cell Function in Tumors. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 200(2), 400–407. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701041>
- Sussulini, Alessandra (2017). [Advances in Experimental Medicine and Biology] *Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications Volume 965 || Metabolomics: Definitions and Significance in Systems Biology*. , 10.1007/978-3-319-47656-8(Chapter 1), 3–17. doi:10.1007/978-3-319-47656-8_1
- Takenaga, K., Koshikawa, N., & Nagase, H. (2021). Intercellular transfer of mitochondrial DNA carrying metastasis-enhancing pathogenic mutations from high- to low-metastatic tumor cells and stromal cells via extracellular vesicles. *BMC molecular and cell biology*, 22(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s12860-021-00391-5>
- Tang, S., Ning, Q., Yang, L., Mo, Z., & Tang, S. (2020). Mechanisms of immune escape in the cancer immune cycle. *International Immunopharmacology*, 86, 106700. doi:10.1016/j.intimp.2020.106700
- Tay, R. E., Richardson, E. K., & Toh, H. C. (2021). Revisiting the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy-new insights into old paradigms. *Cancer gene therapy*, 28(1-2), 5–17. <https://doi.org/10.1038/s41417-020-0183-x>
- Tkachev, V., Goodell, S., Opipari, A. W., Hao, L. Y., Franchi, L., Glick, G. D., Ferrara, J. L., & Byersdorfer, C. A. (2015). Programmed death-1 controls T cell survival by regulating oxidative

metabolism. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 194(12), 5789–5800. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402180>

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

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

Triba, M. N., Le Moyec, L., Amathieu, R., Goossens, C., Bouchemal, N., Nahon, P., Rutledge, D. N., & Savarin, P. (2015). PLS/OPLS models in metabolomics: the impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters. *Molecular bioSystems*, 11(1), 13–19. <https://doi.org/10.1039/c4mb00414k>

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

Vardhana, S. A., Hwee, M. A., Berisa, M., Wells, D. K., Yost, K. E., King, B., Smith, M., Herrera, P. S., Chang, H. Y., Satpathy, A. T., van den Brink, M., Cross, J. R., & Thompson, C. B. (2020). Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation limits the self-renewal of T cells exposed to persistent antigen. *Nature immunology*, 21(9), 1022–1033. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0725-2>

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

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

Wang, Y. P., Li, J. T., Qu, J., Yin, M., & Lei, Q. Y. (2020). Metabolite sensing and signaling in cancer. *The Journal of biological chemistry*, 295(33), 11938–11946. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.007624>

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

Wishart, D. S. (2019). Metabolomics for Investigating Physiological and Pathophysiological Processes. *Physiological Reviews*, 99(4), 1819–1875. doi:10.1152/physrev.00035.2018

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

Worley, B., & Powers, R. (2013). Multivariate Analysis in Metabolomics. *Current Metabolomics*, 1(1), 92–107. <https://doi.org/10.2174/2213235X11301010092>

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

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

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

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

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

Zastre, J. A., Sweet, R. L., Hanberry, B. S., & Ye, S. (2013). Linking vitamin B1 with cancer cell metabolism. *Cancer & metabolism*, 1(1), 16. <https://doi.org/10.1186/2049-3002-1-16>

Zhang, Z., Gao, Z., Rajthala, S., Sapkota, D., Dongre, H., Parajuli, H., Suliman, S., Das, R., Li, L., Bindoff, L. A., Costea, D. E., & Liang, X. (2020). Metabolic reprogramming of normal oral fibroblasts correlated with increased glycolytic metabolism of oral squamous cell carcinoma and precedes their activation into carcinoma associated fibroblasts. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 77(6), 1115–1133. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03209-y>

Zheng, Z., Hu, H., Zeng, L., Yang, H., Yang, T., Wang, D., Zhang, C., Deng, Y., Zhang, M., Guo, D., & Deng, F. (2022). Analysis of the characteristic compounds of *Citri Sarcodactylis Fructus* from different geographical origins. *Phytochemical analysis : PCA*, 33(1), 72–82. <https://doi.org/10.1002/pca.306>