



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Modelización in vitro de linfocitos T CD8 exhaustos
humanos para el estudio del metabolismo energético

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Ros Faustino, Carlos

Tutor/a: Jantus Lewintre, Eloisa

Cotutor/a externo: BENET GIMENEZ, MARTA

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

Universitat Politècnica de València

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D' ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL (ETSEAMN)



Instituto de Investigación
Sanitaria La Fe



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

 Biomarkers and
Precision Medicine Unit



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Modelización *in vitro* de linfocitos T CD8 exhaustos humanos para el estudio del metabolismo energético

Trabajo Final de Grado en Biotecnología Curso
Académico 2022-2023

Autor: Carlos Ros Faustino

Tutora Académica: Eloisa Jantus Lewintre

Tutora Externa: Marta Benet Giménez



VALENCIA, JULIO 2023

TÍTULO

Modelización *in vitro* de linfocitos T CD8 exhaustos humanos para el estudio del metabolismo energético.

RESUMEN

Los linfocitos desempeñan un papel crucial en el sistema inmunológico al ser responsables de reconocer y destruir células tumorales y patógenos invasores, contribuyendo así a la supresión y control de la enfermedad. Sin embargo, en algunos casos, los linfocitos no logran ejercer su función de manera efectiva debido a la disfunción que experimentan, lo que limita su capacidad para combatir el tumor o eliminar las infecciones de manera adecuada. La aparición de este subconjunto de linfocitos exhaustos está asociada con diversos factores, como la exposición crónica a antígenos, la presencia de microambientes tumorales inmunosupresores y las señales inhibitoras persistentes. La acumulación de linfocitos exhaustos en el microambiente tumoral se ha relacionado con una respuesta inmune ineficiente y la evasión de las células tumorales al sistema inmunitario. Por esta razón, el estudio de los linfocitos exhaustos es de gran interés en el ámbito de la inmunoterapia, ya que entender sus mecanismos moleculares y vías de señalización puede conducir al desarrollo de estrategias terapéuticas para revertir su disfunción y mejorar la respuesta inmune contra el cáncer.

El objetivo de este estudio es generar linfocitos exhaustos humanos con el fin de caracterizarlos y estudiar su metabolismo energético para obtener una comprensión más profunda de los procesos involucrados en su disfunción.

Con el propósito de alcanzar este objetivo, se recrea una infección crónica *in vitro* estimulando continuamente los correceptores del TCR para generar linfocitos exhaustos que exhiben similitudes transcripcionales y metabólicas con los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) exhaustos. La caracterización de los linfocitos exhaustos implicó, en primer lugar, el análisis de los niveles de receptores inhibidores mediante citometría de flujo y PCR cuantitativa (qPCR). Con el fin de evaluar la expresión de genes centrales en el metabolismo energético, así como el consumo de ATP a nivel de glucólisis y mitocondrias, se estudió el estado de las vías energéticas mediante qPCR y un ensayo que permite medir el metabolismo celular, como el analizador *Seahorse*. Para complementar el análisis, se realizó un estudio del perfil lipídico mediante espectrometría de masas para identificar posibles alteraciones lipídicas asociadas al agotamiento de los linfocitos y a su vez, se examinó la concentración de metabolitos energéticos en el medio de cultivo utilizando una cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MS).

En este trabajo se ha observado como la estimulación crónica *in vitro* conduce a la generación de linfocitos exhaustos, ofreciendo un modelo *in vitro* preciso para simular las condiciones clínicas. En cuanto al agotamiento de estos linfocitos se ha confirmado que se caracteriza por un aumento significativo en la expresión de los receptores inhibidores PD-1, TIM-3, LAG-3 y CTLA-4. Por otra parte, se ha demostrado que experimentan una reprogramación metabólica, con disfunción mitocondrial y disminución en la oxidación de ácidos grasos y fosforilación oxidativa, compensada por un incremento en la actividad de la glucólisis. Por último, la evaluación lipídica ha revelado una firma lipídica asociada al agotamiento, caracterizada por un aumento en los niveles de triglicéridos y ceramidas. Estos hallazgos son relevantes para desarrollar terapias inmunológicas más efectivas.

Este trabajo está alineado con los ODS 3, 9 y 17, promoviendo la salud, la innovación y la colaboración global.

PALABRAS CLAVE

Agotamiento; Disfunción mitocondrial; Glucólisis; Linfocitos T CD8⁺ exhaustos; Metabolismo lipídico; PD-1; Receptores inhibitorios; β -oxidación

AUTOR: Carlos Ros Faustino

TUTORA ACADÉMICA: Eloisa Jantus Lewintre

TUTORA EXTERNA: Marta Benet Giménez

LOCALIDAD Y FECHA: Valencia, Julio 2023

LICENCIA: Creative Commons. Reconocimiento - No Comercial - Sin Obra Derivada (by-nc-nd)

TITLE

In vitro modeling of human exhausted CD8 T lymphocytes for the study of energy metabolism.

ABSTRACT

Lymphocytes play a crucial role in the immune system as they are responsible for recognizing and destroying tumor cells and invading pathogens, thereby contributing to disease suppression and control. However, in some cases, lymphocytes fail to effectively perform their function due to the dysfunction they experience, limiting their ability to combat tumors or adequately eliminate infections. The emergence of this subset of exhausted lymphocytes is associated with various factors such as chronic antigen exposure, the presence of immunosuppressive tumor microenvironments, and persistent inhibitory signals. The accumulation of exhausted lymphocytes in the tumor microenvironment has been linked to an inefficient immune response and evasion of tumor cells from the immune system. For this reason, the study of exhausted lymphocytes is of great interest in the field of immunotherapy, as understanding their molecular mechanisms and signaling pathways can lead to the development of therapeutic strategies to reverse their dysfunction and enhance the immune response against cancer.

The aim of this study is to generate exhausted human lymphocytes in order to characterize them and study their energy metabolism to gain a deeper understanding of the processes involved in their dysfunction.

To achieve this goal, a chronic in vitro infection is recreated by continuously stimulating the TCR co-receptors to generate exhausted lymphocytes that exhibit transcriptional and metabolic similarities with exhausted tumor-infiltrating lymphocytes (TILs). Characterization of exhausted lymphocytes first involved the analysis of the levels of inhibitory receptors using flow cytometry and quantitative PCR (qPCR). To assess the expression of key genes in energy metabolism, as well as ATP consumption in glycolysis and mitochondria, the state of energy pathways was studied using qPCR and an assay that allows measurement of cellular metabolism, such as the Seahorse analyzer. To complement the analysis, a study of the lipidomic profile was conducted using mass spectrometry to identify potential lipid alterations associated with lymphocyte exhaustion. Additionally, the concentration of energy metabolites in the culture medium was examined using ultra-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-MS).

In this study, it has been observed that chronic in vitro stimulation leads to the generation of exhausted lymphocytes, providing a precise in vitro model to simulate clinical conditions. Regarding the exhaustion of these lymphocytes, it has been confirmed that it is characterized by a significant increase in the expression of inhibitory receptors PD-1, TIM-3, LAG-3, and CTLA-4. Furthermore, it has been demonstrated that exhausted lymphocytes undergo metabolic reprogramming, with mitochondrial dysfunction and decreased fatty acid oxidation and oxidative phosphorylation, compensated by an increase in glycolysis activity. Lastly, lipidomic evaluation has revealed a lipid signature associated with exhaustion, characterized by elevated levels of triglycerides and ceramides. These findings are relevant for the development of more effective immunotherapies.

This work aligns with SDGs 3, 9, and 17, promoting health, innovation, and global collaboration.

KEY WORDS

Exhausted CD8+ T lymphocytes; Exhaustion; Glycolysis; Inhibitory receptors; Lipid metabolism; Mitochondrial dysfunction; PD-1; β -oxidation

AUTHOR: Carlos Ros Faustino

ACADEMIC SUPERVISOR: Eloisa Jantus Lewintre

EXTERNAL SUPERVISOR: Marta Benet Giménez

LOCATION AND DATE: Valencia, July 2023

LICENSE: Creative Commons. Attribution – Non Commercial – No Derivatives (by-nc-nd)

AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar este espacio para expresar mi sincero agradecimiento a todos los que han formado parte de mi Trabajo de Fin de Grado.

En especial, me gustaría dedicar unas palabras de gratitud a mi tutora en institución Marta Benet, quien ha sido una guía excepcional en este viaje académico. Gracias por tu dedicación y apoyo incondicional a lo largo de todo este proceso. Gracias también por compartir tu experiencia y sabiduría con enseñanzas y consejos. Me has ayudado a descubrir mi verdadera pasión y a enfocarme en aquello que realmente me gusta.

También me gustaría agradecer a mis compañeros de la Unidad de Biomarcadores y Medicina de Precisión, por ofrecer su ayuda siempre que lo he necesitado y por crear un ambiente de trabajo colaborativo y enriquecedor.

De la misma forma, agradecer al personal del Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana, con especial atención al Dr. Luis Larrea, María Jesús Vayá y María Guzman, por proporcionarnos las muestras sanguíneas de donantes sanos.

Por último, agradecer a mis compañeros de carrera por tan buenos momentos compartidos a lo largo de estos cuatro años.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 INMUNOTERAPIA	1
1.2 FUNCIÓN Y ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T CD8⁺	3
1.3 DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS T CD8⁺ EN LA RESPUESTA INMUNE	3
1.4 AGOTAMIENTO DE LAS CÉLULAS T	4
1.4.1 Características celulares y funcionales del agotamiento de células T	5
1.4.1.1 Pérdida progresiva de la función efectora	5
1.4.1.2 Capacidad de respuesta alterada a las citoquinas homeostáticas.....	5
1.4.1.3 Expresión sostenida de receptores inhibidores	6
1.4.1.4 Programa metabólico alterado	6
1.4.1.5 Estado transcripcional y epigenético	6
1.4.2 Señales que intervienen en el desarrollo del agotamiento de las células T	7
1.5 SUBCONJUNTOS DE LAS CÉLULAS T AGOTADAS	8
1.6 METABOLISMO ENERGÉTICO DE LAS CÉLULAS T	8
1.6.1 Reprogramación metabólica de células T efectoras en la estimulación aguda	9
1.6.2 Reprogramación metabólica de células T efectoras en la estimulación crónica	9
1.6.3 Metabolismo lipídico.....	11
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1. AISLAMIENTO, ÁCTIVACIÓN Y CULTIVO DE LINFOCITOS T CD8⁺ HUMANOS	13
3.1.1 Aislamiento.....	13
3.1.2 Activación y cultivo de linfocitos T CD8 ⁺ humanos.....	14
3.2 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE ACTIVACIÓN	15
3.3 ANÁLISIS DEL ESTADO DE ACTIVACIÓN Y AGOTAMIENTO POR CITOMETRÍA DE FLUJO	15
3.4 EXTRACCIÓN DE ARN, RT-PCR Y ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	16
3.4.1 Aislamiento de ARN y síntesis de ADN complementario (ADNc)	16
3.4.2 Ensayo de expresión por qPCR.....	16
3.5 ANÁLISIS METABÓLICO A TIEMPO REAL MEDIANTE SEAHORSE	17
3.5.1 Cultivos celulares ensayados.....	17
3.5.2 Proceso de preparación y ejecución del ensayo de aptitud física	17
3.6 ANÁLISIS LIPIDÓMICO	19
3.6.1 Procesado de las células para el análisis lipidómico	19
3.6.2 Análisis por UPLC-MS/MS.....	19
3.6.3 Procesado de los datos y análisis estadístico	20
3.7 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO POR METABOLÓMICA	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
4.1 CONDICIONES ÓPTIMAS DE ESTIMULACIÓN	21
4.2 AGOTAMIENTO DE LOS LINFOCITOS POR ESTIMULACIÓN CRÓNICA	22
4.2.1 Caracterización de los linfocitos exhaustos.....	22
4.2.2 Estado de activación.....	23

4.3 EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL	23
4.3.1 Marcadores inhibitorios y factores de transcripción	24
4.3.2 Genes relacionados con el metabolismo	25
4.4 ANÁLISIS DEL ESTADO DE LAS VÍAS PRODUCTORAS DE ENERGÍA	27
4.4.1 Estudio de la glucólisis y la respiración mitocondrial en linfocitos	27
4.4.2 Metabolismo energético en el microambiente tumoral.....	29
4.4.3 Composición de los medios de cultivo	31
4.5 ESTUDIO LIPIDÓMICO	32
5. CONCLUSIONES	36
6. BIBLIOGRAFÍA	37
7. ANEXO	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Activación de los linfocitos T.....	3
Figura 2: Fenotipos de las células T.....	4
Figura 3: Características de los linfocitos T exhaustos.....	5
Figura 4: Esquema de las vías reguladoras que intervienen en el desarrollo del agotamiento.....	8
Figura 5: Poblaciones de linfocitos T agotados.....	8
Figura 6: Reprogramación metabólica de las células T.....	10
Figura 7: Metabolismo lipídico de los linfocitos T.....	11
Figura 8: Extracción de linfocitos T CD8+.....	13
Figura 9: Cultivo y estimulación de linfocitos T CD8+.....	14
Figura 10: Experimento condiciones óptimas de estimulación.....	15
Figura 11: Análisis por citometría de flujo.....	15
Figura 12: Estudio de la expresión génica.....	16
Figura 13: Alteración de la fosforilación oxidativa en puntos específicos.....	18
Figura 14: Test de estrés mitocondrial.....	18
Figura 15: Análisis metabólico mediante <i>Seahorse</i>	19
Figura 16: Estudio de las condiciones de cultivo de los linfocitos T CD8+.....	21
Figura 17: Caracterización de los linfocitos exhaustos.....	22
Figura 18: Estudio del estado de activación.....	23
Figura 19: Estudio de la expresión génica de los marcadores exhaustos en linfocitos estimulados de forma aguda y en linfocitos exhaustos a día 15.....	24
Figura 20: Estudio de la expresión génica de enzimas implicadas en el metabolismo lipídico en linfocitos estimulados de forma aguda y en linfocitos exhaustos a día 15.....	26
Figura 21: Gráfico cinético condiciones estándar.....	27
Figura 22: Mapa energético en condiciones estándar.....	28
Figura 23: Parámetros evaluados en el <i>fitness assay</i> bajo condiciones estándar.....	28
Figura 24: Gráfico cinético condiciones limitantes.....	29
Figura 25: Parámetros evaluados en el <i>fitness assay</i> bajo condiciones limitantes.....	30
Figura 26: Mapa energético en condiciones limitantes.....	30
Figura 27: PCA <i>Score-plot</i> del estudio del perfil lipídico.....	32
Figura 28: <i>Heat map</i> del análisis del perfil lipídico.....	33
Figura 29: Diagrama de cajas del análisis del perfil de triglicéridos.....	34
Figura 30: Diagrama de cajas del análisis del perfil de ceramidas.....	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Enfoques actuales para abordar la disfunción de las células T en la inmunoterapia contra el cáncer.....	2
Tabla 2: Resultados del análisis metabolómico de los medios de cultivo.....	31
Tabla S1: Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).....	41
Tabla S2: Genes analizados utilizados en el ensayo de expresión por qPCR.....	42
Tabla S3: Cálculos promedio de los parámetros del Seahorse fitness assay del donante D110.....	43

LISTADO DE ABREVIATURAS

2B4: Receptor de <i>natural killer</i>	CFSE: Carboxifluoresceína Succinimidil Éster
ACC: Acetil-CoA carboxilasa	CO2: Dióxido de Carbono
ACLY: ATP-citrato liasa	CPT1A: Carnitina Palmitoiltransferasa 1A
ACN: Ácido acetonitrilo	CTLA-4: Antígeno de Linfocitos T Citotóxicos Asociado a Proteína 4
ADN: Ácido desoxirribonucleico	DDA: Adquisición dependiente de datos
AGC: Control Automático de Ganancia	DGAT2: Acil CoA:Diacylglicerol Aciltransferasa 2
Akt: Proteína Quinasa B	DIA: Adquisición independiente de datos
APC: Célula presentadora de antígenos	DMSO: Dimetilsulfóxido
ARN: Ácido Ribonucleico	dNTP: Desoxirribonucleótido Trifosfato
ARNm: ARN mensajero	EDTA: Ácido Etildiaminotetraacético
ATP: Adenosín Trifosfato	ESI: Electrospray de Ionización
BAM15: Desacoplador mitocondrial 2,4-dinitrofenilhidrazona	ETC: Cadena de Transporte de Electrones
BLIMP-1: Proteína 1 Represora de la Diferenciación de Plasmocitos	FA: Ácido Graso
BSA: Albúmina Sérica Bovina	FABP4: Proteína de Unión a Ácidos Grasos 4
CAR-T: Terapia con Receptor de Antígeno Quimérico T	FABP5: Proteína de Unión a Ácidos Grasos 5
CD127: Antígeno de Diferenciación 127	FAO: Oxidación de Ácidos Grasos
CD160: Antígeno de Diferenciación 160	FASN: Sintasa de Ácidos Grasos
CD25: Antígeno de Diferenciación 25	FATP2: Transportador de Ácidos Grasos 2
CD28: Antígeno de Diferenciación 28	FBS: Suero Fetal Bovino
CD3: Antígeno de Diferenciación 3	FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos
CD36: Antígeno de Diferenciación 36	GLUT: Transportador de Glucosa
CD4: Antígeno de Diferenciación 4	HIF1 α : Factor Inducible por Hipoxia 1 α
CD62L: Antígeno de Diferenciación 62L	UPLC-MS: Cromatografía Líquida de Alta Resolución - Espectrometría de Masas
CD69: Antígeno de Diferenciación 69	HSL: Lipasa Sensible a Hormonas
CD8: Antígeno de Diferenciación 8	IFN- γ : Interferón γ
cDNA: ADN complementario	IL-10: Interleucina 10
CE: Colesterol esterificado	IL-15: Interleucina 15
Cer: Ceramida	IL-2: Interleucina 2

IL-7: Interleucina 7

IPA: Análisis de Componentes Independientes

IS: Estándar Interno

LAG-3: Proteína Asociada a Linfocitos T 3

LC: Cromatografía Líquida

LysoPC: Fosfatidilcolina Lisofosfolípido

MHCI: Complejo Mayor de Histocompatibilidad de Clase I

MHCII: Complejo Mayor de Histocompatibilidad de Clase II

MPEC: Células Efectoras Precursoras de Memoria

MS: Espectrometría de Masas

mTOR: Proteína Quinasa Blanco de Rapamicina en Mamíferos

MYC: Protooncogén Myc

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Reducido

NFAT: Factor de Activación de Células T Nucleares

NKG2A: Receptor de células asesinas naturales

OCR: Consumo de Oxígeno por Célula

ox-LDL: Lipoproteínas Oxidadas de Baja Densidad

OXPPOS: Fosforilación Oxidativa

PBMCs: Células Mononucleares de Sangre Periférica

PBS: Solución Salina Tamponada con Fosfato

PCA: Análisis de Componentes Principales

PD-1: Receptor Programado de Muerte 1

PD-L1: Ligando Programado de Muerte 1

PGE2: Prostaglandina E2

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa

PPAR α : Receptor Activado por Proliferadores Peroxisomales Alfa

PS: Fosfatidilserina

QC: Control de Calidad

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa

RBC: Glóbulos Rojos

RNAsaH: Ribonucleasa H

RPLPO: Proteína Ribosomal Lateral Grande P0

RPMI: Medio de Roswell Park Memorial Institute

SLEC: Células Efectoras de Vida Corta

SM: Esfingomielina

SREBP-1C: Proteína de Unión a Elementos Reguladores de Esteroles 1C

T CM: Células T de Memoria Central

T EM: Células T de Memoria Efectora

T SMC: Células T de Memoria de Vida Larga

TCA: Ciclo de Ácido Cítrico (Ciclo de Krebs)

Tcf-1: Factor de Transcripción T de Células T Específicas

TCR: Receptor de Antígeno de Células T

TG: Triglicérido

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante Beta

TIGIT: Inmunoglobulina de células T y dominio ITIM

TIL: Linfocitos Infiltrantes de Tumor

TIM-3: Proteína Reguladora de Inmunidad T Celular 3

TME: Microambiente Tumoral

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

TNFR: Receptor del Factor de Necrosis Tumoral

TOX: Factor Transcripcional TOX

1. INTRODUCCIÓN

La inmunoterapia es un enfoque prometedor para tratar el cáncer. Sin embargo, el fracaso del tratamiento en la mayoría de los pacientes pone de manifiesto la necesidad de comprender mejor los mecanismos implicados. Las condiciones limitantes de nutrientes en el microambiente tumoral (TME, por sus siglas en inglés) desempeñan un papel fundamental en el fracaso de la respuesta inmunitaria contra el cáncer (Vesely et al., 2022). El TME de los cánceres sólidos comprenden una gran variedad de células huésped infiltrantes y residentes (fibroblastos, células inmunitarias destacando los linfocitos T, células endoteliales), factores secretados y matriz extracelular. En este, las células cancerosas reprograman su metabolismo para satisfacer las demandas bioenergéticas, biosintéticas y redox necesarias para mantener la formación, el crecimiento y la diseminación del tumor. Además, el metabolismo reprogramado del TME contribuye a la evasión inmunitaria al agotar nutrientes claves necesarios para que se realice una respuesta inmunitaria adecuada, además de producir metabolitos inmunosupresores. Además, las células tumorales pueden regular al alza los ligandos de superficie, que median en la anergia (o agotamiento) de las células T, incluidos el ligando programado de muerte 1 (PD-L1, por sus siglas en inglés) y otros ligandos al interactuar con los receptores inhibidores de células T (Buck et al.; 2015). La comprensión del agotamiento de los linfocitos, conocidos como linfocitos exhaustos (exh), ha emergido como un campo de investigación crucial en el ámbito de la inmunología. Estas células inmunes se caracterizan por presentar una disfunción progresiva y una capacidad reducida para responder eficazmente a los estímulos inmunológicos. El origen de los linfocitos exh es multifactorial y se ha asociado principalmente con la exposición crónica a antígenos, la presencia de microambientes tumorales inmunosupresores y las señales inhibitoras persistentes (Wherry & Kurachi, 2015).

Por todos estos factores, la comprensión del metabolismo en la función de las células T puede abrir nuevas posibilidades en la inmunoterapia. Siendo de gran interés el conocimiento de los mecanismos moleculares y las vías de señalización involucradas en la disfunción de los linfocitos, para el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas a revertir el agotamiento de los linfocitos y mejorar la respuesta inmune contra el cáncer (Farhood et al., 2019).

1.1 INMUNOTERAPIA

En los últimos años, la inmunoterapia ha revolucionado el tratamiento del cáncer, logrando un éxito general en pacientes con diversos tipos de cáncer. Sin embargo, aún hay pacientes que no responden a esta estrategia, y algunas incluso experimentan una progresión acelerada de la enfermedad. Un obstáculo importante en la eficacia de la inmunoterapia es el agotamiento de las células T CD8⁺, que son cruciales en el control del tumor, perdiendo su capacidad para eliminar las células cancerosas una vez que se infiltran en el entorno inmunosupresor del tumor (Guo et al., 2021).

Por lo tanto, se ha despertado un gran interés en el campo de la inmunoterapia en revitalizar a las células T CD8⁺ exh. Se han investigado los mecanismos intrínsecos y extrínsecos que gobiernan el agotamiento de estas células, incluyendo el análisis del paisaje transcripcional y epigenético, así como el metabolismo, capaz de determinar el destino de las células T CD8⁺ infiltradas en el tumor (Beltra et al., 2020; Amitrano & Kim, 2023).

La revitalización de las células T exh mediante la inhibición del punto de control inmunitario ha sido un avance significativo en la inmunoterapia contra el cáncer. Inicialmente, los objetivos se centraron en los puntos de control referentes al receptor programado de muerte 1 (PD-1, por sus siglas en inglés) y al antígeno de linfocitos T citotóxicos asociado a proteína 4 (CTLA-4, por sus siglas en inglés) y se logró una gran mejora en el tratamiento de varios tipos de cáncer, especialmente el melanoma (Larkin et al., 2015). Sin embargo, a medida que se ha profundizado en la comprensión de los mecanismos subyacentes del agotamiento de las células T, se han descubierto otros puntos de control inmunitario alternativos, como la proteína asociada a linfocitos t 3 (LAG-3, por sus siglas en inglés), Inmunoglobulina de células T y dominio ITIM (TIGIT, por sus siglas en inglés), proteína reguladora de inmunidad T celular

3 (TIM-3, por sus siglas en inglés), receptor de células asesinas naturales NKG2A, entre otros (Andrews et al., 2019).

En la actualidad, se están desarrollando cada vez más inhibidores de puntos de control inmunitarios para su uso clínico en el tratamiento del cáncer. Algunos ejemplos de estos inhibidores aprobados por la FDA incluyen Ipilimumab (anti-CTLA4), Nivolumab y Pembrolizumab (anti-PD-1), así como Atezolizumab, Durvalumab y Avelumab (anti-PD-L1) (Larkin et al., 2015). Aunque la terapia anti-PD-1/PD-L1 ha demostrado ser eficaz en el tratamiento del cáncer, es importante tener en cuenta que existe un grupo considerable de pacientes que no responden a esta terapia. Es por esto, que para mejorar la eficacia de la terapia anti-PD-1 se está investigando el uso combinado de diferentes inhibidores de puntos de control inmunitarios. Al combinar estas terapias, se espera mejorar las tasas de respuesta y prolongar la supervivencia en pacientes no respondedores (Mahoney et al., 2015).

Además, se ha observado éxito terapéutico al combinar la terapia de células CAR-T con el bloqueo de puntos de control inmunitarios. Esta combinación ha demostrado sinergia, ya que las células CAR-T mejoran la respuesta antitumoral y los inhibidores de puntos de control potencian aún más la actividad de las células CAR-T, lo que resulta en un mayor control de la enfermedad en ciertos tipos de cáncer (Cherkassky et al., 2016).

Por otro lado, la combinación de bloqueos de puntos de control inmunitarios con otros enfoques inmunorreguladores ha mostrado resultados prometedores en el campo de la inmunoterapia. Al utilizar diferentes estrategias para modular la respuesta inmune, se busca mejorar la eficacia del tratamiento y superar la resistencia que algunos pacientes presentan a las terapias convencionales. Estos enfoques inmunorreguladores adicionales pueden incluir la radioinmunoterapia y quimioinmunoterapia, así como terapias dirigidas a los receptores coestimuladores, células inmunosupresoras, hipoxia, citoquinas, vías metabólicas, factores de transcripción negativos y epigenética (Hossain et al., 2021).

La combinación de múltiples enfoques busca aprovechar sinergias y ampliar el espectro de respuesta inmunológica frente al cáncer. Los resultados clínicos han mostrado que esta estrategia puede mejorar la supervivencia y generar respuestas duraderas en pacientes previamente no respondedores. Sin embargo, es importante continuar investigando y realizando ensayos clínicos (Tabla 1) para comprender mejor los mecanismos de acción y optimizar la combinación de estos enfoques inmunorreguladores en beneficio de los pacientes.

Tabla 1. Enfoques actuales para abordar la disfunción de las células T en la inmunoterapia contra el cáncer.

ENSAYO CLÍNICO	TIPO DE CÁNCER	REFERENCIA
Sintilimab (anti-PD-1)	Cáncer de pulmón primario	NCT04026841
Tremelimumab (anti-CTLA-4)	Carcinoma urotelial	NCT03557918
AGEN2034 (anti-PD-1) con AGEN1884 (anti-CTLA-4)	Cáncer de cuello uterino de segunda línea	NCT03894215
TSR-022 (anti-PD-1) con TSR-033 (anti-LAG-3)	Tumores sólidos metastásicos	NCT02817633
Combinación de radioterapia con anti-PD1 (pembrolizumab o nivolumab)	Melanoma	NCT04017897
Gemcitabina/Cisplatino (quimioterapéuticos) con Nivolumab (anti-PD-1)	Cáncer de vías biliares	NCT03311789
Metformina (Varios efectos sobre el metabolismo de la glucosa) con Nivolumab (Anti-PD-1)	cáncer de pulmón de células no pequeñas irreseccable o metastásico	NCT03048500
Guadecitabina (inhibe la metilación del ADN) y Mocetinostat (inhibe la histona desacetilasa) con Pembrolizumab (anti-PD-L1)	Cáncer de pulmón	NCT03220477
JCAR014 (CAR-T específico de CD-19) con Durvalumab (anti PD1)	Linfoma no Hodgkin	NCT02706405
TILs activados con anti-PD-1	Cáncer colorrectal Estadio III	NCT03904537

Nota: Los códigos de referencia se han obtenido de clinicaltrials.gov. PD-1: proteína de muerte celular programada 1; CTLA-4: proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos; LAG-3: gen 3 de activación de linfocitos.

1.2 FUNCIÓN Y ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T CD8⁺

Los linfocitos T son un tipo de células del sistema inmunológico que desempeñan un papel crucial en la respuesta inmunitaria adaptativa. Dentro de la población de linfocitos T, se distinguen dos subtipos principales: los linfocitos T CD4⁺ y los linfocitos T CD8⁺. Estos subtipos se diferencian por los antígenos que expresan en su superficie, conocidos como CD4 y CD8, respectivamente (Mittrücker et al., 2014).

La activación de los linfocitos T ocurre a través de interacciones de célula a célula cuando el complejo del receptor de antígeno de células T (TCR) se encuentra con antígenos peptídicos presentados por células presentadoras de antígenos (APC). Las APC presentan antígenos a través del complejo principal de histocompatibilidad I (MHCI) o II (MHCII), que interactúan con los subconjuntos de células T CD8⁺ y CD4⁺, respectivamente. Los linfocitos T CD8⁺, también conocidos como linfocitos T citotóxicos, se dirigen a células infectadas por virus y desencadenan la muerte celular mediante diversos mecanismos, como la secreción de citoquinas proinflamatorias, la interacción entre el ligando Fas y el receptor Fas, y la liberación de gránulos citolíticos que contienen perforina y granzima B, induciendo la apoptosis de las células diana (Figura 1) (Wik & Skálhegg, 2022).

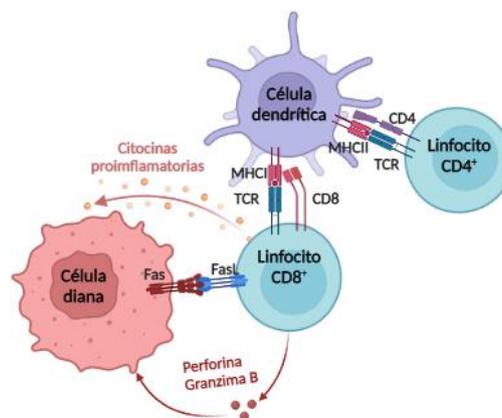


Figura 1. Activación de los linfocitos T. Representación gráfica de las interacciones entre el TCR y el MHCI/II para la activación de los linfocitos T, y mecanismos de los linfocitos CD8⁺ para inducir la apoptosis. FAS: Factor de apoptosis de células T. FASL: Ligando de FAS; MHCI: Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I; MHCII: Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase 2; TCR: Receptor de células T; CD8: Cluster de diferenciación 8; CD4: Cluster de diferenciación 4. Elaboración propia. Creado con BioRender.com.

Los linfocitos T CD8⁺ desempeñan un papel importante en la inmunidad contra patógenos y tumores intracelulares, así como en la regulación de trastornos autoinmunes y alérgicos. Estas células son activadas mediante el reconocimiento de péptidos específicos presentados por el MHCI en las APC en los órganos linfáticos periféricos. Además, las señales coestimuladoras (CD28) y las citoquinas (IL-2) proporcionadas por las APC y/o las células T CD4⁺ influyen en la diferenciación y expansión de los linfocitos T CD8⁺. Posteriormente, las células T CD8⁺ experimentan un proceso de diferenciación y expansión masiva para generar un gran número de células efectoras, capaces de migrar a la periferia del organismo. Dado que las moléculas del MHCI se expresan en la mayoría de las células nucleadas, las células T CD8⁺ efectoras pueden reconocer su antígeno objetivo presentado por casi todas las células del cuerpo, excepto los eritrocitos (Mittrücker et al., 2014).

1.3 DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS T CD8⁺ EN LA RESPUESTA INMUNE

Durante una infección aguda o tras la vacunación, las células T *naive* se activan y se diferencian en células efectoras de vida corta (SLEC, por sus siglas en inglés) o células efectoras precursoras de la memoria (MPEC, por sus siglas en inglés) (Dolina et al., 2021). Durante esta fase de diferenciación, las células T experimentan una robusta proliferación celular, reprogramación transcripcional, cambios epigenéticos y reajustes metabólicos globales. Adquieren las características distintivas de las células T efectoras, como la capacidad de ejercer funciones efectoras, alterar su localización tisular y experimentar una expansión numérica dramática. En la fase de contracción posterior, tras la eliminación

del antígeno, la mayoría de las células efectoras de vida corta (SLEC) expandidas mueren por apoptosis, pero una pequeña fracción de células correspondiente a las células efectoras precursoras de la memoria (MPEC) persiste y se convierte en células T de memoria (Kaech & Cui, 2012).

Las células T de memoria tienen la capacidad de regular a la baja el programa de activación de las células efectoras y desactivar las moléculas efectoras, al tiempo que conservan la habilidad de reactivar rápidamente las funciones efectoras cuando se encuentran nuevamente con el mismo antígeno. Durante esta transición, también experimentan cambios en su capacidad de localización y distribución. Además, desarrollan una característica distintiva de autorrenovación que no depende del estímulo antigénico, mostrando una proliferación lenta similar a las células madre, impulsada por las citoquinas IL-7 e IL-15 (Wherry & Kurachi, 2015). Debido a su preferencia de distribución tisular y la capacidad de proliferación lenta en respuesta a las citoquinas homeostáticas, las células T de memoria se clasifican en memoria central (T_{CM}) residentes en ganglios linfáticos y circulación sanguínea, proporcionan una respuesta inmune sostenida, memoria efectora (T_{EM}) localizadas en tejidos periféricos, responden rápidamente ante reinfecciones, memoria residente (T_{RM}) presentes en tejidos periféricos, brindan protección inmediata en el lugar de infección, y células madre de memoria (T_{SMC}) capaces de autorrenovarse y mantener la memoria a largo plazo en el sistema inmunológico (Figura 2) (Verdon et al., 2020). Un aspecto crucial para el desarrollo de células T de memoria persistentes y altamente funcionales es que, después del pico de expansión de las células efectoras, este programa de diferenciación hacia células T de memoria ocurre en ausencia de una estimulación antigénica continua y altos niveles de inflamación persistente (Kurachi, 2019).

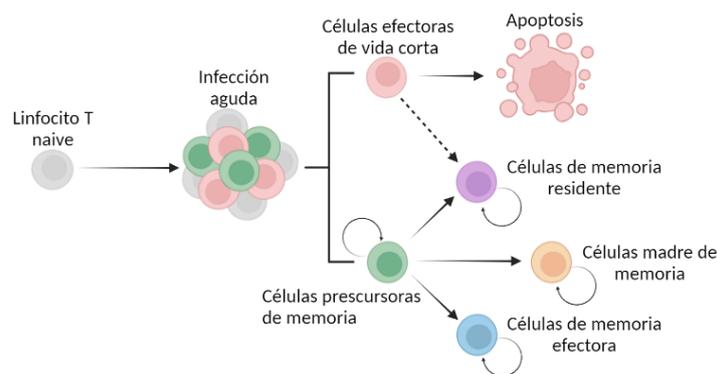


Figura 2. Fenotipos de las células T. Proceso de diferenciación de las células T tras la activación en una infección aguda. Elaboración propia. Creado con BioRender.com.

1.4 AGOTAMIENTO DE LAS CÉLULAS T

En las infecciones crónicas o el cáncer, ambas enfermedades caracterizadas por una persistencia manifiesta del antígeno y/o la inflamación, se produce un drástico cambio en el programa de diferenciación de las células T de memoria (Dolina et al., 2021). Normalmente, estas células experimentan una transición hacia un estado de inactividad después de la fase efectora, aunque aún retienen su capacidad potencial para ejercer funciones efectoras. No obstante, durante la infección crónica o el cáncer, las células T específicas del antígeno muestran una progresiva disminución de sus funciones efectoras, así como alteraciones en su metabolismo y un programa transcripcional y epigenético distintivo que se caracteriza por la ausencia de una firma de quiescencia (Kurachi, 2019).

Un rasgo característico del agotamiento celular es la co-expresión de múltiples receptores inhibidores en niveles elevados, incluyendo PD-1 (CD279), CTLA-4 (CD152), LAG3, TIM-3, CD244/2B4, CD160, TIGIT y otros (Kurachi, 2019). Además, se observan cambios en la falta de homeostasis independiente de antígeno, alteraciones en el programa transcripcional que implican el uso diferenciado de factores clave de transcripción, así como modificaciones en el alojamiento, migración, señalización y expresión de receptores de citoquinas, quimioquinas y en el metabolismo de las células T (Wherry & Kurachi, 2015).

El desarrollo del agotamiento de las células T está estrechamente relacionado con la prolongada exposición al antígeno y la inflamación. Estas alteraciones en la función, diferenciación y mantenimiento de las células T dificultan el logro de un control óptimo en casos de infecciones crónicas y cáncer (Paley et al., 2012).

1.4.1 Características celulares y funcionales del agotamiento de células T

Las células T_{exh} se distinguen de las células T de memoria y las células efectoras debido a sus características únicas en cuanto a su vía de diferenciación, fenotipos, funcionalidad y dinámica de subconjuntos. Las células T_{exh} han sido definidas operativamente por una serie de características que se mencionan a continuación (Figura 3).

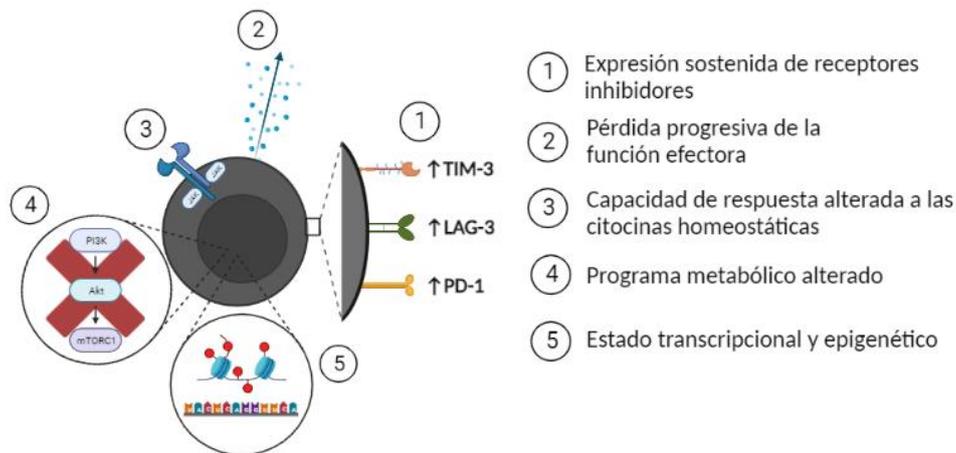


Figura 3. Características de los linfocitos T exhaustos. Representación de las alteraciones celulares y funcionales que sufren los linfocitos T como consecuencia del agotamiento. TIM-3: Proteína 3 de dominio de inmunoglobulina y mucina de células T; LAG-3: Gen 3 de activación de linfocitos; PD-1: Proteína de muerte celular programada 1; PI3K: Fosfoinositida 3-quinasa; Akt: Proteína quinasa B; mTORC1: Blanco de rapamicina en mamíferos. Elaboración propia. Creado con BioRender.com.

1.4.1.1 Pérdida progresiva de la función efectora

Las células T CD8 gravemente agotadas se caracterizan por su incapacidad para producir eficientemente IFN- γ , así como la pérdida progresiva de otras funciones efectoras durante la infección crónica. Inicialmente, se observa una disminución en la producción de IL-2, seguida de defectos en la producción de TNF y compromiso de la citotoxicidad. En etapas más avanzadas del agotamiento, se presenta una reducción significativa en la producción de IFN- γ , correlacionada con la presencia de células T agotadas terminalmente (Wherry et al., 2003). Sin embargo, las células T_{exh} en algunos casos pueden retener la capacidad de producir ciertas quimiocinas como IL-10 (Wherry et al., 2007). Además, a pesar del agotamiento, muchas células T_{exh} conservan la capacidad de desgranular e incluso, el subconjunto más terminal puede mantener una capacidad citotóxica ligeramente superior en comparación con otros subconjuntos de células T_{exh} (Wherry et al., 2003). En algunos entornos, se puede producir la eliminación física de las células T_{exh}, especialmente cuando la estimulación antigénica es alta (McLane et al., 2019).

La gravedad del agotamiento de las células T CD8 puede diferir según la carga de patógenos, la ayuda de las células T CD4 y la duración de la infección, lo que lleva a diversos grados de disfunción. Por tanto, en diferentes enfermedades, se observa una variación en el patrón de funcionalidad de las células T_{exh}, posiblemente relacionado con la carga patógena, el lugar y el modo de replicación del patógeno, la expresión del antígeno y el entorno inflamatorio (Appay et al., 2002).

1.4.1.2 Capacidad de respuesta alterada a las citoquinas homeostáticas

Las células T de memoria tienen la capacidad de mantenerse independientemente del antígeno gracias a las citoquinas IL-7 e IL-15. Después de una infección aguda, las células T de memoria adquieren

la capacidad de autorrenovación lenta y constante, que es esencial para su mantenimiento a largo plazo (Cui & Kaech, 2010). Sin embargo, durante una infección crónica, las células T efectoras *exh* no pueden experimentar la misma proliferación homeostática debido a defectos en las vías de señalización de IL-7 e IL-15. Es por esto por lo que las células T *exh* dependen de señales persistentes de antígeno para su proliferación continua y mantienen una jerarquía proliferativa necesaria para su supervivencia. Las células T *exh* progenitoras pueden seguir dividiéndose, mientras que las células T *exh* terminales recién generadas pierden la capacidad de responder a señales proliferativas adicionales y no son responsivas a futuros estímulos (Shin et al., 2007).

1.4.1.3 Expresión sostenida de receptores inhibidores

Las células T *exh*, en comparación con las células T de memoria en reposo, muestran una expresión elevada y diversa de inhibidores de la respuesta inmune, como PD-1. Estos inhibidores, que normalmente se expresan de manera transitoria en células T efectoras, ayudan a limitar la activación y función inmunitaria al final de la fase aguda de una infección. Sin embargo, durante infecciones crónicas y cáncer, las células T *exh* mantienen una alta expresión de inhibidores incluso después de la activación inicial (Day et al., 2006). La co-expresión de múltiples inhibidores es común en las células T *exh* durante estas enfermedades y la gravedad del agotamiento se correlaciona con el grado y patrones específicos de co-expresión de inhibidores (Blackburn et al., 2009).

Entre los receptores inhibidores más relevantes para las células T *exh* se encuentra PD-1. Estudios recientes han revelado un papel dual inesperado de las señales de PD-1 durante la infección viral crónica. Mientras que PD-1 tiene una clara función negativa en la regulación de las respuestas de las células T CD8+ durante esta fase prolongada de la infección, nuevos hallazgos indican que esta vía también desempeña un papel fundamental en la protección de las células T CD8+ T *exh*. Estas señales de PD-1 ayudan a evitar una estimulación excesiva, el agotamiento terminal y la disminución de la población de células T CD8+ T *exh* a lo largo del tiempo (Odorizzi et al., 2015).

1.4.1.4 Programa metabólico alterado

El análisis del perfil de expresión génica en células T *exh* revela cambios significativos en los genes involucrados en el metabolismo, incluyendo el ciclo del ácido cítrico, lo cual sugiere que el agotamiento de las células T se acompaña de una desregulación metabólica (Wherry et al., 2007). En experimentos *in vitro*, se ha observado que el entrecruzamiento de PD-1 disminuye la señalización de PI3K, Akt y mTOR, lo cual tiene impactos directos en las vías metabólicas (Patsoukis et al., 2015). En una sección posterior, se profundizará en la relación entre el agotamiento de las células T CD8+ y la desregulación metabólica.

1.4.1.5 Estado transcripcional y epigenético

Los recientes avances en el perfil genómico han revelado el paisaje transcripcional y epigenético de las células T *exh*. Estas células exhiben un programa transcripcional único en comparación con las células T efectoras y de memoria, con alteraciones significativas en la expresión de genes relacionados con receptores de inmunidad, factores de transcripción, vías de señalización del TCR, señalización coestimuladora, señalización de citoquinas y metabolismo celular (Alfei & Zehn, 2017).

Un descubrimiento importante sobre las células T *exh* es que utilizan factores de transcripción que normalmente se encuentran en otros tipos de células T, como las células T efectoras y de memoria. Sin embargo, las células T *exh* los usan de manera diferente, mostrando una red transcripcional única. Esta forma alterada de utilizar los factores de transcripción, que son necesarios para otras etapas en el desarrollo de las células T, es una característica especial de las células T *exh* (Doering et al., 2012).

Por otro lado, los estudios epigenéticos han revelado que las células T *exh* son un linaje único, puesto que estas exhiben alrededor de 6.000 regiones de cromatina accesibles de manera diferencial en comparación con las células T efectoras y de memoria. Estos hallazgos ofrecen una posible explicación para las características distintivas de las células T *exh*, sugiriendo que presentan un control epigenético de la expresión génica significativamente diferente (Sen et al., 2016).

Estos estudios también han revelado la existencia de paisajes epigenéticos similares en células T ex de infecciones virales crónicas y cáncer. Además, se establece un vínculo temporal entre la firma epigenética de las células T ex y su agotamiento (Chan et al., 2021). Se demostró que la epigenética de las células T ex es estable incluso después de su revitalización mediante el bloqueo de PD-1 (Pauken et al., 2016). Por último, se destacó el potencial del paisaje epigenético único de las células T ex para explicar la conectividad alterada de la red de factores de transcripción y la regulación de genes específicos (Philip et al., 2017).

1.4.2 Señales que intervienen en el desarrollo del agotamiento de las células T

El agotamiento de las células T está asociado con vías reguladoras negativas que se pueden clasificar en tres categorías principales (Figura 4).

En primer lugar, tenemos la señal desencadenada por la presencia del antígeno, siendo la gravedad del agotamiento progresiva y estando relacionada tanto con la carga antigénica como con la duración de la exposición al antígeno (Wherry & Kurachi, 2015).

La segunda señal proviene de los receptores inhibidores y coestimuladores. Los receptores inhibitorios se expresan en niveles altos y sostenidos, durante la infección crónica y el cáncer donde persiste el antígeno, originando una disminución de la capacidad de las células T específicas de antígeno para mantener respuestas sólidas. Entre ellos se encuentran PD-1, TIGIT, LAG-3 o TIM-3 (Wherry et al., 2007). Por su parte, los receptores coestimuladores como CD28 o los miembros de la familia TNFR funcionan para activar las células T impulsando la expansión, proliferación y diferenciación de las células T inactivas o en reposo. Sin embargo, durante el agotamiento, la señalización coestimuladora puede amortiguarse o incrementarse de manera inadecuada, lo que puede provocar el agotamiento de las células T (Croft, 2009; Hui et al., 2017).

La última señal viene dada por la inflamación y los mediadores solubles. En cuanto a los mediadores solubles que contribuyen al agotamiento de las células T encontramos las citoquinas proinflamatorias como IL-10 y TGF- β , las cuales pueden atenuar o restringir la activación de las células inmunitarias mediante la activación de los factores de transcripción SMAD aguas abajo (Derynck & Zhang, 2003). No obstante, por sí solas no son suficientes para generar agotamiento, sin embargo, existe una conexión entre las señales inflamatorias y las señales de TCR u otras (Stelekati et al., 2014). Por otro lado, encontramos también citoquinas que antagonizan el agotamiento como IL-2 o IL-21. En el caso de IL-2 se ha observado que las células T ex mueren rápidamente cuando carecen del receptor de IL-2, lo que sugiere que la capacidad de respuesta de la IL-2 es importante para mantener las células T ex en entornos de estimulación antigénica crónica (Bachmann et al., 2007).

Otros mediadores solubles son los IFN- α/β . Estas son citoquinas proinflamatorias cruciales que suprimen la replicación viral y activan las células inmunitarias innatas. Además, son esenciales para el cebado de células T y la generación de células T efectoras y de memoria. Sin embargo, altos niveles de IFN- α/β pueden provocar el agotamiento de células T a través de la muerte celular y la interferencia con el factor de transcripción Tcf-1 en las células progenitoras T ex (T. Wu et al., 2016).

Además de las citoquinas, otro mediador que se ha implicado en el agotamiento de las células T es la prostaglandina E2 (PGE2), lípido sintetizado a partir del ácido araquidónico que tiene un doble papel como molécula proinflamatoria e inmunosupresora y puede limitar las respuestas inmunitarias (Kalinski, 2012).

Por último, destaca el papel de las células T reguladoras CD4+, las cuales contribuyen al desarrollo del agotamiento de las células T. Estas poseen propiedades inmunosupresoras que inhiben la activación de las células T mediante la producción de citoquinas supresoras como IL-10 y TGF- β (Veiga-Parga et al., 2013).

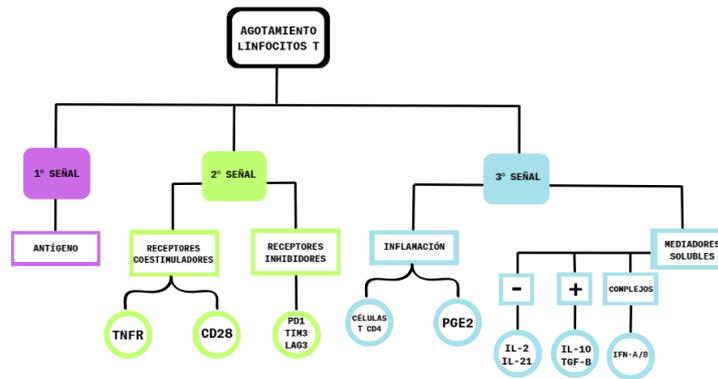


Figura 4. Esquema de las vías reguladoras que intervienen en el desarrollo del agotamiento. TNFR: Receptor del Factor de Necrosis Tumoral; CD28: Grupo de Diferenciación 28; PD-1: Proteína de Muerte Celular Programada 1; TIM-3: Proteína Reguladora de Inmunidad T Celular 3; LAG-3: Gen de Activación de Linfocitos 3; PGE2: Prostaglandina E2; IL-2: Interleucina-2; IL-21: Interleucina-21; IL-10: Interleucina-10; TGF-B: Factor de Crecimiento Transformador Beta; IFN-A/B: Interferón Alfa/Beta. Elaboración propia. Creado con canva.com.

1.5 SUBCONJUNTOS DE LAS CÉLULAS T AGOTADAS

Un avance importante en la comprensión del agotamiento de las células T ha sido el descubrimiento de que estas células no presentan un compartimento homogéneo, poco proliferativo, sin capacidad de memoria inmunológica y con una pérdida progresiva de la función efectora en respuesta al antígeno persistente. Esto se observó mediante el análisis de una sola célula el cual reveló que las células agotadas pueden dividirse en distintos subconjuntos fenotípicos y funcionales interconectados de manera similar a las células de memoria y efectoras. Por tanto, dentro de este linaje de células CD8+ T agotadas, existe una heterogeneidad que incluye células similares a células madre denominadas precursoras/progenitoras y células diferenciadas terminalmente (Figura 5) (Verdon et al., 2020).

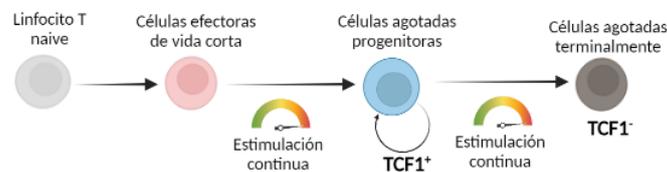


Figura 5. Poblaciones de linfocitos T agotados. Generación de los diferentes subconjuntos de linfocitos T agotados en condiciones de estimulación continua. TCF1: Factor de Transcripción T de Células T Específicas. Elaboración propia. Creado con BioRender.com.

Las células T agotadas precursoras exhiben características tanto de células T agotadas como de células de memoria. Se ha observado que expresan el marcador PD1 y presentan una producción de citoquinas alterada, propias de las células T agotadas, pero también expresan el factor regulador transcripcional TCF1, característico de las células T de memoria. Lo más sorprendente es que estas células PD1⁺TCF1⁺CD8⁺ tienen la capacidad de autorrenovarse y desencadenar una explosión masiva de células T en respuesta al bloqueo de puntos de control inmunológico (Chan et al., 2021).

Los linfocitos T CD8⁺ progenitores tienen la capacidad de diferenciarse en linfocitos T CD8⁺ agotados terminalmente. Esta diferenciación se caracteriza por cambios fenotípicos y funcionales que reflejan un estado de agotamiento más avanzado, con diferencias a nivel transcripcional y epigenético. Este descubrimiento resalta la plasticidad de las respuestas de las células T CD8⁺ y su capacidad de adaptarse y evolucionar durante procesos inmunológicos prolongados (Miller et al., 2019).

1.6 METABOLISMO ENERGÉTICO DE LAS CÉLULAS T

Las células T *naive* y de memoria dependen principalmente de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) y la oxidación de ácidos grasos (FAO) como fuentes de energía para mantener las funciones de supervivencia (Pallett et al., 2019). Tras el reconocimiento del antígeno específico por el receptor de células T (TCR), las células T inmaduras activan rápidamente la vía de señalización de la fosfoinositida 3-

quinasa (PI3K)/proteína quinasa B (Akt)/complejo de rapamicina 1 (mTORC1) (Chi, 2012). Esta activación promueve la actividad de factores transcripcionales como MYC, HIF1 α , SREBP e IRF4, lo cual desencadena la reprogramación metabólica de las células T (Figura 6) (Man et al., 2013; Kidani et al., 2013; Reina-Campos et al., 2021). La participación de receptores coestimuladores como CD28 es crucial en la activación mediada por TCR de la vía PI3K/Akt/mTORC1, ya que mejora el reclutamiento de la subunidad catalítica p110 δ de PI3K (Frauwirth et al., 2002). La reprogramación metabólica no solo genera energía eficiente, sino que también suministra intermediarios bioquímicos para la síntesis de nucleótidos, aminoácidos, ácidos grasos y la función mitocondrial, siendo esenciales para el funcionamiento y desempeño adecuado de las células T en términos de utilización, diferenciación y función (Dimeloe et al., 2017).

1.6.1 Reprogramación metabólica de células T efectoras en la estimulación aguda

La activación por medio de la señalización basada en el TCR/CD28 a través de la vía PI3K/Akt/mTORC1 promueve la actividad de factores transcripcionales como MYC y HIF1 α , los cuales aumentan la expresión de transportadores de glucosa (GLUT) y enzimas glicolíticas cruciales para facilitar y mantener la glucólisis en las células T. Este evento de reprogramación metabólica se conoce como mejora de la glucólisis aeróbica o "Efecto Warburg". Este proceso permite que las células T obtengan energía convirtiendo el piruvato derivado de la glucosa en lactato, en lugar de seguir la ruta convencional del ciclo del ácido cítrico en las mitocondrias, incluso en condiciones normóxicas (Dimeloe et al., 2017). Aunque la glucólisis es un proceso menos eficiente en la producción de ATP que la OXPHOS, su velocidad de producción de ATP es casi 100 veces más rápida, satisfaciendo así la alta demanda energética requerida durante la activación de las células T (Reina-Campos et al., 2021). Además de la generación de ATP, la regulación positiva de la glucólisis también mejora significativamente la producción de varios intermediarios metabólicos, como glucosa-6-fosfato, gliceraldehído-3-fosfato y 3-fosfoglicerato, los cuales son precursores esenciales para la síntesis de biomoléculas, incluyendo ácidos nucleicos, lípidos y aminoácidos (Dimeloe et al., 2017).

La FAO desempeña un papel importante en la obtención de energía para las células T en estado *naive* y/o de memoria. Sin embargo, durante la activación de las células T, se produce un cambio en el metabolismo de los lípidos, pasando de un estado catabólico a uno anabólico, para satisfacer las demandas biosintéticas necesarias para la expansión y diferenciación clonal, así como para las diversas funciones de las células T (Bantug et al., 2018). La activación del receptor de células T (TCR) a través de la señalización de Akt/PI3K/mTORC1 estimula significativamente la síntesis de colesterol y ácidos grasos al aumentar la transcripción de múltiples enzimas lipogénicas, de manera dependiente de la proteína de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP) (Kidani et al., 2013).

1.6.2 Reprogramación metabólica de células T efectoras en la estimulación crónica

Durante la infección viral crónica, la estimulación continua del receptor de células T (TCR) aumenta la expresión de receptores inhibidores y co-inhibidores, incluidos PD-1, CTLA-4, TIM-3 y LAG-3. Estos receptores bloquean la señalización del eje PI3K/Akt/mTORC1 y disminuyen la transcripción de múltiples transportadores y enzimas asociados al metabolismo, lo que resulta en la alteración metabólica de la glucosa, los aminoácidos y los ácidos grasos (Sears et al., 2021). Originando esto una disfunción metabólica que es un impulsor temprano, más que una consecuencia del agotamiento de las células T (Patsoukis et al., 2015).

El aumento de la vía PD-1/PD-L1 puede bloquear la señalización de PI3K mediada por TCR/CD28, inhibir drásticamente la glucólisis y la utilización de glutamina en las células T efectoras y revertir su dependencia de FAO y OXPHOS para la generación de energía, desencadenando esto en el agotamiento de las células T (Patsoukis et al., 2015). Este cambio de la glucólisis a la FAO para la generación de energía puede provocar la despolarización mitocondrial, el deterioro de la biosíntesis mitocondrial y la producción de niveles intolerables de ROS, que están estrechamente asociados con la disfunción en las células T agotadas. Por tanto, en las células T agotadas se observa un aumento de la lipólisis y la oxidación de ácidos grasos, pero se compromete la función mitocondrial (Saeidi et al., 2018).

En el contexto del cáncer, los linfocitos T exh también experimentan cambios metabólicos significativos que contribuyen a su disfunción. En los tumores, las células cancerosas y las células del microambiente tumoral consumen grandes cantidades de glucosa, lo que crea un entorno de privación de glucosa para los linfocitos T infiltrados. Esta escasez de glucosa limita la capacidad de los linfocitos T para generar energía a través de la glucólisis, afectando al crecimiento y función efectora de los linfocitos T (Bevilacqua et al., 2022; Chang et al., 2015). Como respuesta a la privación de glucosa, los linfocitos T agotados aumentan la utilización de ácidos grasos como fuente alternativa de energía (Baenke et al., 2013). Sin embargo, a diferencia de la glucólisis, la FAO es menos eficiente en términos de producción de energía y puede comprometer aún más la función de los linfocitos T (Chang et al., 2015).

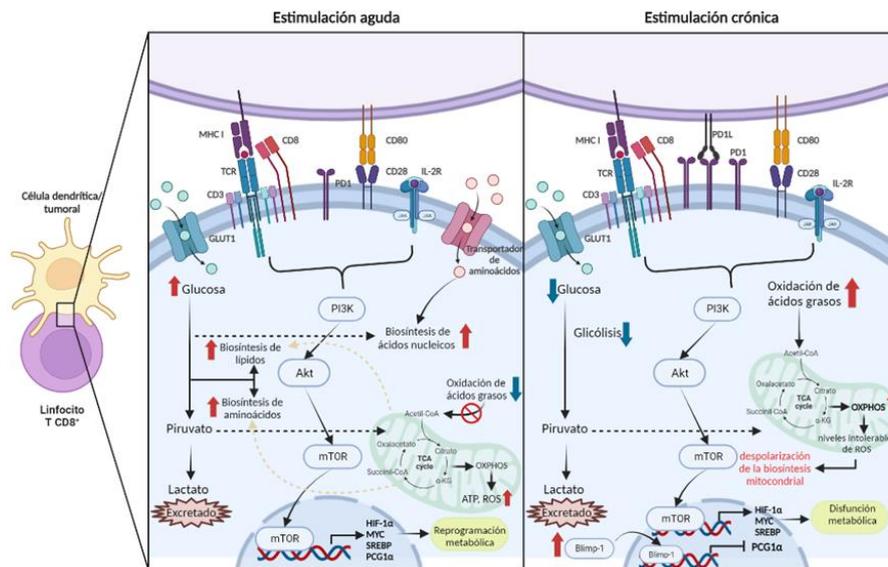


Figura 6. Reprogramación metabólica de las células T. Representación de las alteraciones metabólicas inducidas por la vía PI3K-Akt-mTOR que tienen lugar en condiciones de estimulación aguda y bajo condiciones de infección viral crónica. GLUT1: Transportador de glucosa 1; CD3: Cluster de diferenciación 3; TCR: Receptor de células T; MHC I: Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I; MHC II: Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II; CD8: Cluster de diferenciación 8; CD4: Cluster de diferenciación 4; PD1: Proteína de muerte celular programada 1; CD80: Cluster de diferenciación 80; CD28: Cluster de diferenciación 28; IL-2R: Receptor de interleucina 2; PI3K: Fosfoinositida 3-quinasa; Akt: Proteína quinasa B; mTOR: Blanco de rapamicina en mamíferos; ATP: Adenosín trifosfato; ROS: Especies reactivas de oxígeno; OXPHOS: Fosforilación oxidativa; HIF-1α: Factor inducible por hipoxia 1 alfa; MYC: Protooncogen c-Myc; SREBP: Proteína reguladora de la expresión de genes de unión a elementos reguladores de esteroides; PGC1α: Coactivador 1 de receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas; BLIMP1: Factor de transcripción inhibidor de linaje de células B y plasmacitos. Elaboración propia. Creado con BioRender.com.

A pesar de todo lo mencionado anteriormente, los linfocitos T estimulados crónicamente *in vitro* presentan una mayor captación de glucosa y tasa de acidificación extracelular, debido al aumento de la fracción de glucosa excretada como lactato. Sin embargo, a pesar de las altas tasas de glucólisis, las células T estimuladas crónicamente presentan una capacidad progresivamente reducida para proliferar. Esta pérdida de capacidad proliferativa es un sello distintivo del subconjunto de células T exh terminalmente. Además, se ha observado que la firma génica glicolítica aumenta en los subconjuntos de células T exh terminalmente en comparación con las células T exh progenitoras. Estableciéndose una correlación inversa entre la expresión de genes glicolíticos y la expresión de *TCF1*, que es esencial para la autorrenovación de las células T intratumorales (Vardhana et al., 2020).

Por otro lado, en la estimulación crónica *in vitro* se produce un incremento de ROS impulsado por el antígeno persistente, originándose un estrés oxidativo que provocará una disfunción mitocondrial, limitando así la capacidad de las células T para llevar a cabo la beta-oxidación y en la fosforilación oxidativa. Este estrés oxidativo es también un impulsor del desarrollo del agotamiento de los linfocitos

T (Vardhana et al., 2020). Este comportamiento dispar observado *in vitro* puede ser debido a las condiciones ambientales diferenciales relativas a la disponibilidad de sustratos y la ausencia de un microambiente inmunosupresor.

1.6.3 Metabolismo lipídico

En los linfocitos exh, se observan alteraciones en el metabolismo lipídico que pueden influir en su función y respuesta inmunitaria. Estudios han revelado que estos linfocitos en el TME muestran un aumento en la oxidación de ácidos grasos. Esto se relaciona con cambios en la expresión de genes clave tanto en la oxidación de ácidos grasos como en la síntesis de lípidos. En la oxidación de ácidos grasos, destacan enzimas clave como la carnitina palmitoiltransferasa-1 (CPT1), el transportador CD36 y la proteína de transporte de ácidos grasos (FATP) que están involucradas en el transporte de ácidos grasos a la mitocondria (Lou et al., 2022). Por otro lado, en la síntesis de lípidos, se encuentran genes como el ácido graso sintetasa (FASN), la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la ATP-citrato liasa (ACLY), que participan en la generación de ácidos grasos *de novo* a partir de moléculas precursoras como la glucosa y el acetil-CoA (Snaebjornsson et al., 2020). Estos genes son regulados por factores de transcripción como los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR) y las proteínas de unión a elementos sensibles a los esteroides (SREBP). Estos factores de transcripción controlan la expresión de los genes involucrados en la homeostasis de los lípidos y la regulación de las vías metabólicas (Figura 7) (Yu et al., 2021).

La acumulación de lípidos en las células, especialmente en los linfocitos exh, puede tener efectos tanto negativos como beneficiosos. Por un lado, la acumulación excesiva de lípidos puede interferir con la función normal de los linfocitos, comprometiendo su capacidad para responder adecuadamente a los estímulos y combatir las células tumorales. Por otro lado, se ha observado que la acumulación de lípidos en ciertas circunstancias puede tener efectos beneficiosos. Los lípidos pueden actuar como reservas de energía que las células pueden utilizar durante períodos de alta demanda metabólica. Además, los lípidos oxidados pueden tener propiedades inmunomoduladoras (D. Wu & Chen, 2022).

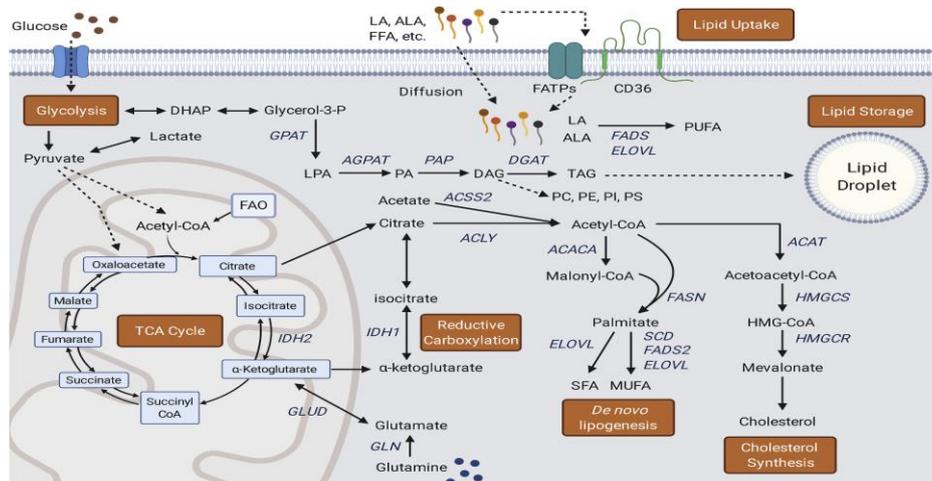


Figura 7. Metabolismo lipídico de los linfocitos T. Resumen de las principales vías del metabolismo lipídico implicadas en la oxidación de ácidos grasos y síntesis de lípidos. ACACA: acetil-CoA carboxilasa alfa; ACAT: acetil-CoA acetiltransferasa; ACLY: ATP-citrato liasa; ACSS2: acetil-CoA sintetasa 2; AGPAT: acilglicerofosfato aciltransferasa; ALA: ácido α -linoléico; DAG: diacilglicerol; DGAT: diglicérido aciltransferasa; DHAP: fosfato de dihidroxiacetona; ELOVL: alargamiento de proteínas lipídicas muy largas; FADS: ácido graso desaturasa; FAO: oxidación de ácidos grasos; FASN: sintasa de ácidos grasos; FATPs: proteínas de transporte de ácidos grasos; FFA: ácidos grasos libres; GLUD: glutamina deshidrogenasa; GLN: glutaminasa; GPAT: glicerol-3-fosfato aciltransferasa; HMGCR: HMG-CoA reductasa; HMGCS: HMG-CoA sintetasa; LA: ácido linoleico; LPA: ácido lisofosfatídico; MUFAs: ácidos grasos monoinsaturados; PA: ácido fosfatídico; PAP: fosfatasa de ácido fosfatídico; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; PI: fosfatidilinositol; PS: fosfatidilserina; PUFA: ácido graso poliinsaturado; SCD: esteroil-CoA desaturasa; SFA: ácido graso saturado; TAG: triacil glicerol; Ciclo de TCA: ciclo de ácido tricarbóxico (Broadfield et al., 2021).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los linfocitos T desempeñan un papel fundamental en la respuesta inmunitaria, reconociendo y destruyendo células infectadas o malignas. Sin embargo, la disfunción o agotamiento de los linfocitos T puede comprometer la respuesta inmunitaria, lo que lleva a una menor eficacia en la eliminación de células anormales o patógenos, dando lugar a enfermedades autoinmunes y una menor respuesta a la inmunoterapia en pacientes con cáncer. A pesar de que se ha avanzado mucho en la caracterización de los linfocitos exh, aún existen incógnitas sobre los mecanismos precisos que conducen al agotamiento y los mecanismos metabólicos específicos que contribuyen a su disfunción inmunitaria. Por tanto, comprender en detalle estos aspectos es crucial para desarrollar estrategias terapéuticas efectivas dirigidas a restaurar la función de los linfocitos T exh en el contexto de enfermedades crónicas y la inmunoterapia contra el cáncer.

En este proyecto se plantea como **hipótesis principal** que los linfocitos exhaustos agotados por un proceso de estimulación continua experimentan una sobreexpresión de receptores inhibitorios y una reprogramación metabólica caracterizada por una glucólisis mejorada y una disfunción mitocondrial. De forma que los objetivos específicos de este proyecto son:

1. Obtener linfocitos exhaustos *in vitro* simulando un proceso de infección crónica mediante la estimulación continua de los correceptores del TCR.
2. Estudiar la expresión diferencial de los receptores inhibitorios entre linfocitos exhaustos y linfocitos estimulados de forma aguda.
3. Analizar los genes involucrados de forma central en el proceso de agotamiento y metabolismo energético de los linfocitos exhaustos.
4. Evaluar la disfunción mitocondrial consecuencia del agotamiento, que da lugar a una reprogramación metabólica hacia una mayor dependencia de la glucólisis.
5. Estudiar la reprogramación lipídica mediante espectrometría de masas para determinar la existencia de una firma lipídica subyacente al agotamiento de los linfocitos T.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. AISLAMIENTO, ACTIVACIÓN Y CULTIVO DE LINFOCITOS T CD8+ HUMANOS

3.1.1 Aislamiento

Para la ejecución del presente proyecto experimental, se utilizaron linfocitos T CD8⁺ extraídos a partir de muestras de sangre procedentes del centro de transfusiones del Hospital General (Valencia). La toma de muestras precisa del consentimiento informado del donante, requisito establecido en el Real Decreto 1088/2005 del 16 de septiembre. La población de estudio de la presente investigación está constituida por 5 donantes (D110, D126, D128, D129 y D131).

Una vez se dispone del hemocomponente, se toma una alícuota de 17 mL de sangre y se diluye a una relación 1:1 con PBS + 2 % FBS. Seguidamente se deposita la disolución en un tubo *SepMate™-50* (85450; StemCell) previamente relleno con *Lymphoprep™* (07851; StemCell) y se centrifuga 20 minutos a 1.200G y temperatura ambiente. Posteriormente se transfiere el plasma junto al halo de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, por sus siglas en inglés) a un tubo falcon de 50 mL y se centrifuga 5 minutos a 500G. Tras la centrifugación se decanta el sobrenadante en un falcon de 50 mL y el pellet se resuspende con PBS + 2 % FBS hasta compensar los volúmenes y ambos tubos se centrifugan 5 min a 500 G. A continuación, se decantan los sobrenadantes y el pellet se resuspende en 10 mL de tampón de lisis RBC (00-4333-57; Invitrogen) (1 mL RBC 10x + 9 mL H₂O agua braun estéril) para lisar los posibles eritrocitos que pueden quedar junto a las PBMCs. Se traspara esta solución al segundo tubo y se incuba 5 minutos en hielo. Tras la lisis, se enrasa hasta 40 mL el falcon con PBS + 2 % FBS, se centrifuga 5 min a 500G y se resuspende en 50 mL de PBS. Tras el lavado se procede al conteo de PBMCs mediante el empleo de azul de tripano 0,4 % (T10282; Invitrogen) y un contador automático (AMQAX100; Invitrogen) (Figura 8).

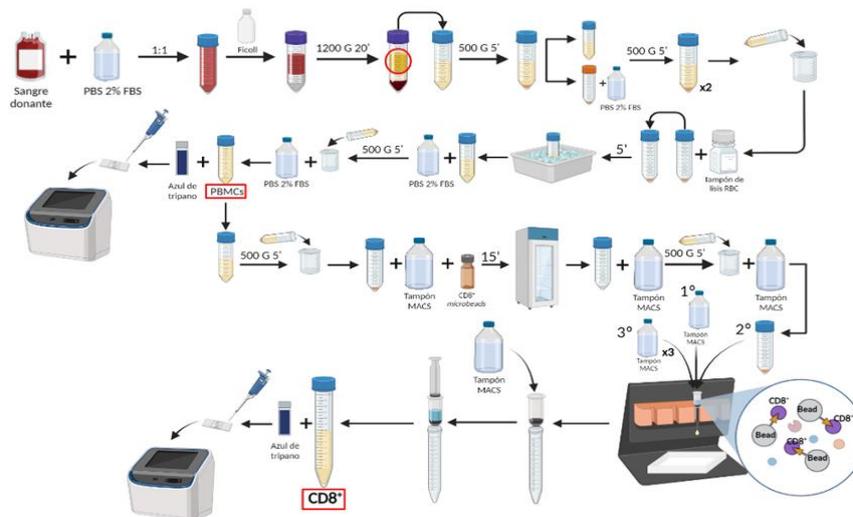


Figura 8. Extracción de linfocitos T CD8⁺. Esquema representativo del flujo de trabajo para la obtención de linfocitos T CD8⁺ a partir de muestras sanguíneas. PBS: Tampón Fosfato Salino; FBS: Suero Fetal Bovino; RBC: Glóbulos Rojos; PBMCs: Célula Mononuclear de Sangre Periférica. Elaboración propia. Creado con BioRender.com.

Una vez aisladas las PBMCs, se toma una alícuota del volumen indicado para disponer de 3×10^8 células, ya que es el número máximo de células que la columna puede soportar. El volumen seleccionado se centrifuga 5 minutos a 500G, se resuspende en 600 µL tampón MACS (PBS 1x 500mL + 25mL BSA 10 % + 2mL EDTA 0,5M) y 150 µL de CD8⁺ human microbeads (130-045-201; Miltenyi) y se incuba 15 minutos a 4°C. Finalizada la incubación se añaden 15 mL de MACS, se centrifuga 5 minutos a 500G y se resuspende el pellet en 500 µL de MACS. Las células resuspendidas se depositan sobre una columna LS (130-122-729; Miltenyi) previamente activada con 3mL de MACS y situada en un imán sujetado por un soporte magnético. En la columna quedarán retenidas las células T CD8⁺ y se eluirán el

resto de las células. Tras la primera elución, se realizarán 3 lavados de la columna con 3mL de MACS para eliminar todas las células que no sean CD8+. Para recuperar las células CD8+, la columna se quita del soporte del imán y se eluyen con la adición de 5 mL de MACS y la presión ejercida por un émbolo en un falcon de 15 mL. Finalmente se lleva a cabo el conteo de linfocitos T CD8⁺ el cual se corresponde con el 8-10 % de las PBMCs extraídas.

3.1.2 Activación y cultivo de linfocitos T CD8⁺ humanos

Tras el aislamiento y de forma previa a la activación y cultivo de los linfocitos, se procede al marcaje con la molécula éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE, por sus siglas en inglés) (C34570; CellTrace). Esta molécula fluorescente permite determinar varias generaciones a partir de las divisiones celulares de una única célula, pudiéndose analizar mediante citometría de flujo la dilución del fluoróforo. Para ello, el volumen seleccionado de células se centrifugará 5 minutos a 500G y se resuspende en PBS para obtener una concentración de 1×10^6 células/mL. Posteriormente se adiciona el CFSE (CFSE stock + DMSO) e incuba en oscuridad 20 minutos en un baño termostático a 37°C. Posteriormente se enrasa con el medio Medio de *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 completo (RPMI 1640 + 10 % de suero bovino fetal (SBF) + 1 % de antibiótico-antimicótico) hasta 50 mL y tras 5 minutos a temperatura ambiente se toma el volumen pertinente para cada una de las dos condiciones, se centrifuga y resuspende en el volumen pertinente para disponer de las células a la concentración deseada. La alícuota de menor volumen no se activará puesto que se adicionará IL-7 humana (1 µg/mL) (130-095-367; Miltenyi) para mantener el fenotipo *naive* de los linfocitos T CD8⁺, sirviendo así de control. Por otro lado, en la alícuota con mayor cantidad de células T se activarán dichas células a través de la estimulación de los correceptores del TCR (CD3 y CD28) mediante la adición de *TransAct*TM (1:100) (130-128-758; Miltenyi) e IL-2 humana (100 UI/mL) (130-097-743; Miltenyi).

Los linfocitos T se incubarán en placas de 6 pocillos o en T25/75 *flasks* en función del volumen, a 37°C y 5 % de CO₂ en aire. En el día 4/5 las células activadas se dividirán en dos. Es a partir de este momento cuando a la mitad de los linfocitos CD8+ les eliminaremos el *TransAct*TM para que tengan solo una estimulación aguda (linfocitos estimulados) y a la otra mitad, se les ira sobreestimulando cada 2-3 días para conseguir una población de linfocitos CD8+ exh. Para ello, las células activadas se dividirán de forma equitativa en dos alícuotas que serán centrifugadas 5 minutos a 500G y se resuspenderán ambas en RPMI e IL-2, adicionándose solo el *TransAct*TM a la población de linfocitos exh con el fin de estimularlos crónicamente. Cada 2/3 días se contará el número de células, se tomarán alícuotas para los diferentes experimentos y adicionara medio RPMI completo, IL-2 y *TransAct*TM en el caso de los exhaustos (Figura 9). De forma alternativa en el paciente D131 a día 0 se generan dos poblaciones de células activadas, una con IL-2 y *TransAct*TM y otra exclusivamente con *TransAct*TM, dividiéndose cada una de estas a día 4 en linfocitos estimulados y exhaustos, de esta manera se trata de averiguar si la estimulación inicial tiene algún efecto en el posterior desarrollo de los cultivos.

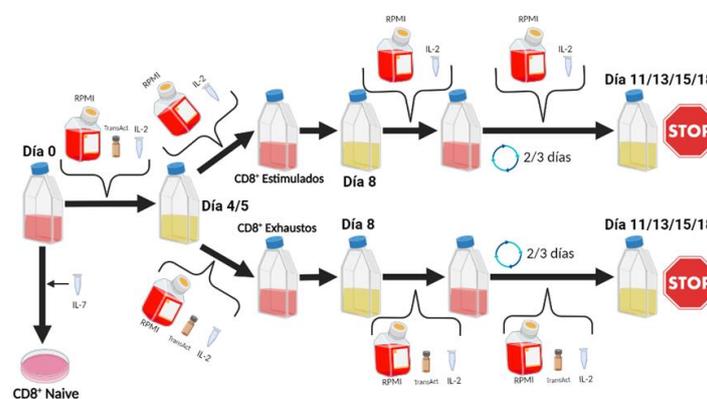


Figura 9. Cultivo y estimulación de linfocitos T CD8⁺. Representación cronológica del tratamiento de los cultivos de linfocitos T naive, estimulados y exhaustos. RPMI: Medio de Roswell Park Memorial Institute; IL-2: Interleucina 2. Elaboración propia. Creado con BioRender.com.

3.2 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE ACTIVACIÓN

Con el fin de establecer las propiedades idóneas de cultivo de los linfocitos T, se cultivaron en una placa de 12 pocillos linfocitos *naive* en dos medios con diferente concentración de glucosa (2 g/L o 0,2 g/L) y de *TransAct*TM (100x y 1000x) (Figura 10). Los medios se obtienen a partir de medios base de RPMI a los que se añade glicina, serina, glutamina y diferente cantidad de glucosa en cada uno. Cabe destacar que a dos pocillos se le incorporo IL-7 para que actuaran como controles. La placa de 12 pocillos se incubo a 37°C y 5 % de CO₂ en aire. En el día 4 se llevó al cabo el conteo celular para determinar el crecimiento, y se tomaron 150.000 células de cada pocillo; tras su marcaje con anticuerpos se estudió por citometría su estado de activación.

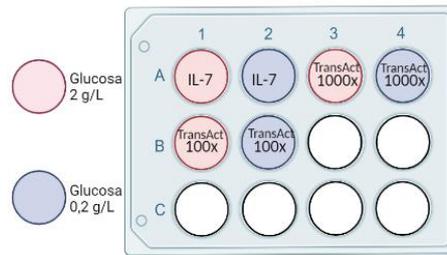


Figura 10. Experimento condiciones óptimas de estimulación. Condiciones diferenciales de cultivo de linfocitos T a día 0. Elaboración propia. IL-7: Interleucina 7. Creado con BioRender.com.

3.3 ANÁLISIS DEL ESTADO DE ACTIVACIÓN Y AGOTAMIENTO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

La ejecución de este experimento requiere una toma de muestras a diferentes tiempos a lo largo del cultivo, tomándose como punto de partida el día 0. En los diferentes días se ha de tomar dos alícuotas de 150.000 células que serán marcadas con los paneles de activación y agotamiento, junto con 150.000 células sin marcar procedentes de alícuotas equitativas de las diferentes poblaciones, que servirá como control de autofluorescencia. Concretamente los volúmenes extraídos de los diferentes cultivos se centrifugan 5 minutos a 500G, se resuspenden en 150 µL de MACS y en condiciones de oscuridad se marcarán con 1,5 µL de los anticuerpos humanos del panel correspondiente. El panel de activación se encuentra conformado por CFSE, CD8-PE-Vio770 (130-110-680; Miltenyi), CD4-APC-Vio770 (130-113-223; Miltenyi), CD25-APC (130-113-284; Miltenyi) y CD69-VioBlue (130-112-610; Miltenyi). El panel de agotamiento consta de CFSE, CD8-PE-Vio770, Anti-TIM-3-APC (130-120-770; Miltenyi), CD279 (PD1)-PE (130-118-677; Miltenyi) y CD223 (LAG3)-VioBlue (130-118-677; Miltenyi). Una vez marcadas las células se introducen en la nevera a 4°C durante 10 minutos, tras esto se centrifugan 5 minutos a 500G y se resuspende el pellet en 500 µL de PBS. Una vez preparadas las muestras, se introducen en el citómetro de flujo *Cytoflex S* (BE08024; Beckman Coulter) en el cual se han diseñado previamente las plantillas para los paneles de activación y agotamiento. Por último, se estudian los datos obtenidos en forma de ficheros fcs por medio del *software* de análisis kaluza 2.2.0.20164 (Figura 11).

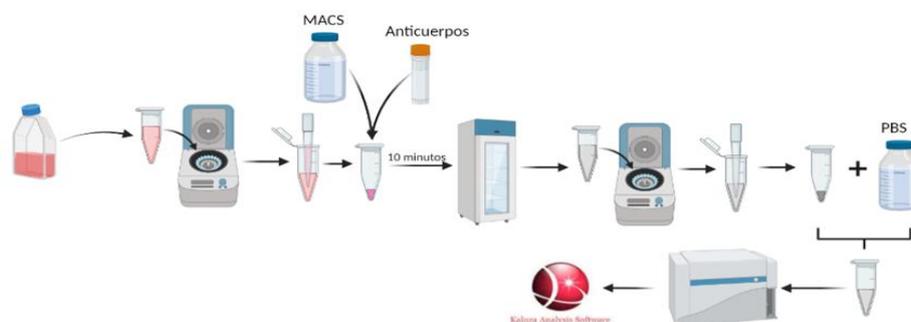


Figura 11. Análisis por citometría de flujo. Esquema del proceso experimental para el estudio de los linfocitos por citometría. Proceso que incluye la preparación de las muestras, así como su inyección en el equipo y análisis informático. PBS: Tampón Fosfato Salino. Elaboración propia. Creado con BioRender.com.

3.4 EXTRACCIÓN DE ARN, RT-PCR Y ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

3.4.1 Aislamiento de ARN y síntesis de ADN complementario (ADNc)

La extracción de ARN se llevó a cabo empleando el *E.Z.N.A Total ARN Kit I* (R6834-02; Omega Bio-tek) según las instrucciones del fabricante. En primer lugar, se obtuvo un pellet de 3×10^6 a diferentes tiempos para linfocitos T activados y exhaustos, al que se añadieron 350 μL de *TRK Lysis Buffer* el cual contiene 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de β -mercaptoetanol. Posteriormente se adicionan 350 μL de etanol al 70 % y se transfiere el volumen a la minicolumna de ARN *Hibind*. A continuación, se centrifuga 1 minuto a 10.000G, se descarta el filtrado y se llevan a cabo una serie de lavados con 500 μL de los tampones de lavado de ARN I y II. Tras los lavados, se centrifuga la columna vacía a máxima velocidad, para eliminar las trazas de etanol que pueden interferir con las aplicaciones posteriores. Finalmente, el ARN se eluyó de la columna añadiendo 50 μL de agua libre de RNAsas. La cantidad de ARN obtenido se cuantifico haciendo uso del *NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer* (ND2000; Thermo Fisher Scientific).

La reacción de retrotranscripción (RT) de ARN a ADNc se produjo haciendo uso del *PrimeScript™ RT Reagent Kit* (RR037A; Takara Bio). En un tubo eppendorf de 1,5 ml se introducen 500 ng de ARN total de cada muestra y H_2O libre de RNAsas hasta alcanzar los 6,5 μL . Se prepara un master mix compuesto por *5x PrimeScript Buffer*, *Oligo dT primer* (50 μM), *random 6 mers* (100 μM) y *PrimeScript Enzyme mix I* y se reparte 3,5 μL a cada muestra para alcanzar un volumen final de 10 μL . Tras esto, se llevó a cabo la reacción de PCR en el equipo *Thermomixer comfort* (535536447; Eppendorf) ajustando las condiciones a 37°C durante 15 minutos, hielo y 85°C durante 5 segundos (Figura 12).

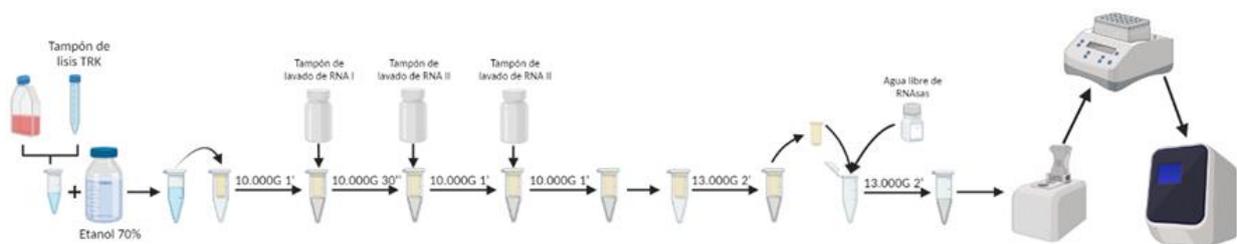


Figura 12. Estudio de la expresión génica. Representación del flujo de trabajo del ensayo de expresión, el cual requiere de un procesamiento de las muestras, cuantificación del ARN, reacción de retrotranscripción y realización de una PCR a tiempo real. RNAsas: Ribonucleasas; Tampón de lisis TRK: Tampón de lisis de células y tejidos. Elaboración propia. Creado con BioRender.com.

3.4.2 Ensayo de expresión por qPCR

Se adquirió el kit *TB Green™ Premix Ex Taq™* (RR42WR; Takara Bio) para realizar el análisis de expresión génica mediante qPCR. Este kit contiene la *DNA Master mix* (2X) que incluye dNTPs, RNAsaH y *SYBR Green*, además de la enzima Taq polimerasa. Los cebadores utilizados fueron adquiridos de *Metabion International AG* y fueron diseñados utilizando la herramienta *Primer Blast*, donde los oligonucleóticos o *primers forward* y *reverse*, se diseñan en diferentes exones para evitar la amplificación del ADN genómico por posible contaminación. Los genes analizados se detallan en el Anexo (Tabla S2). La reacción de PCR se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos, utilizando 2 μL de ADNc al cual se añadieron 8 μL del mix que contenía *ROX dye* (50X), *primer-forward* (0.3 μM), *primer-reverse* (0.3 μM) y la mezcla maestra de *SYBR Green Premix Ex Taq* (2X), lo que resultó en un volumen final de reacción de 10 μL .

La placa se colocó en un termociclador *ViiA™ 7 Real-Time PCR System* (278880303; Applied Biosystems), donde se llevó a cabo la reacción de qPCR bajo las siguientes condiciones: calentamiento durante 2 minutos a 50°C, desnaturalización durante 1 minuto a 95°C y amplificación durante 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 35 segundos a 60°C. El análisis se realizó en tres réplicas biológicas diferentes para confirmar los resultados.

3.5 ANÁLISIS METABÓLICO A TIEMPO REAL MEDIANTE SEAHORSE

3.5.1 Cultivos celulares ensayados

El experimento se llevó a cabo empleando como población muestral a los donantes D131 y D110. En el caso del D131, se tomaron muestras a día 18 tanto de estimulados como de exhaustos. Por otro lado, las alícuotas de cultivo del D110 fueron extraídas a día 15, y cada una de estas fue cultivada de nuevo en condiciones diferenciales de glucosa (10mM o 0,1mM) y presencia/ausencia de etomoxir (4 μ M), inhibidor de la carnitina palmitoiltransferasa-1 (CPT-1) en la cara interna de la membrana mitocondrial externa, inhibiendo la oxidación de ácidos grasos.

3.5.2 Proceso de preparación y ejecución del ensayo de aptitud física

El estudio del metabolismo energético se efectuó haciendo uso del *Seahorse XF Pro Analyzer* (S7850A; Agilent) y del *Seahorse XFe96 Extracellular Flux Assay Kit* (103792-100; Agilent) según las instrucciones del fabricante.

El día anterior al ensayo, se ha de separar el cartucho sensor de la placa de utilidad y rellenar cada pocillo de esta con 200 μ L de la solución calibrante. El *XF Hydrobooster* se sitúa en la parte superior de la placa de utilidad, haciendo de tope y evitando la formación de burbujas. El cartucho sensor se sitúa en la placa de utilidad, sumergiéndose los sensores en la solución calibrante y se incuba a 37°C sin CO₂ durante toda la noche junto a la placa de cultivo *Seahorse XFe96 PDL*. La plantilla del ensayo se deberá cargar en el *XFe96 Analyzer* antes de poner en marcha el equipo.

Una vez finalizada la incubación se ha de retirar el *XF Hydrobooster* antes del inicio del ensayo para completar la hidratación del sensor de carga.

El medio de ensayo se prepara suplementando 97 mL de *Seahorse XF RPMI Medium* (pH 7.4) con 1 mL de cada una de las soluciones *Agilent Seahorse XF* de glucosa (1 M), piruvato (100 mM) y glutamina (200 mM). El medio se ha de calentar hasta los 37°C.

Tras la preparación del medio, se transfiere el volumen apropiado de la suspensión celular proveniente del cultivo a un tubo cónico. Se lleva a cabo una centrifugación a 200G durante 10 minutos y se resuspende el pellet en el medio de ensayo para llevarlas a una concentración de 200.000 células/50 μ L. La realización de un conteo celular permitirá ajustar el volumen con el fin de alcanzar la concentración deseada. De forma paralela a la centrifugación, se retira la *XFe96 PDL microplate* del incubador y se pipetea 50 μ L del medio de ensayo en los pocillos de las cuatro esquinas. Posteriormente se transferirán 50 μ L de la suspensión celular a cada pocillo y se centrifugarán durante 1 minuto a 200G para permitir que las células se anclen al fondo de los pocillos. A continuación, se adicionan 150 μ L/pocillo de medio de ensayo en ensayos sin inyección aguda (D131) y 125 μ L/pocillo para aquellos que sí presenten una inyección aguda (D110). La placa se incuba a 37°C sin CO₂ en los 45-60 minutos previos al ensayo.

Los reactivos del kit, oligomicina, BAM15 y rotenona/antimicina A se preparan resuspendiendo en 4 mL de medio el contenido de los tres viales del *Seahorse XF T Cell Metabolic Profiling Kit box* (103772-100; Agilent). Se cargan 25 μ L de cada uno de los compuestos, a sus respectivos puertos (Puerto A-Oligomicina A, Puerto B-BAM15, Puerto C-Rotenona/Antimicina A y Puerto D-Medio) (Figura 13). En el caso del D110 se cargan adicionalmente 25 μ L de etomoxir.

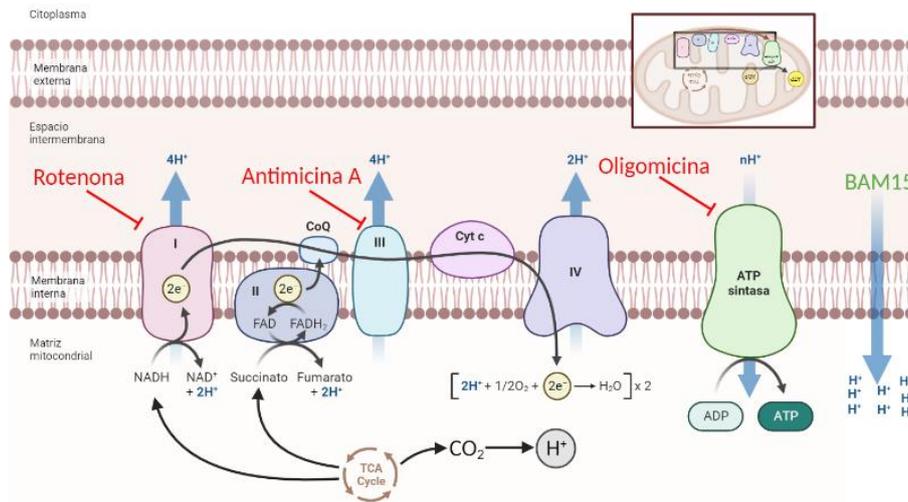


Figura 13. Alteración de la fosforilación oxidativa en puntos específicos. Ilustración que resume el principio de funcionamiento del ensayo de flujo extracelular, consistente en la inyección de rotenona, antimicina A, oligomicina y 2,4-DNP para interferir con la cadena de transporte de electrones. ATP: Adenosín Trifosfato, ADP: Adenosín Difosfato; CO₂: Dióxido de Carbono; FAD: Dinucleótido de Flavina-Adenina; FADH₂: Forma reducida del FAD; TCA: Ciclo de Krebs o Ciclo del Ácido Cítrico; Cyt c: Citocromo c; CoQ: Coenzima Q; BAM15: Desacoplador mitocondrial 2,4-dinitrofenilhidrazona; NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido reducido; NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido. Elaboración propia. Creado con BioRender.com.

La oligomicina inhibe el retorno de protones a través del complejo FO/F1, hiperpolarizando rápidamente la membrana mitocondrial y reduciendo la frecuencia respiratoria. El agente desacoplante BAM15 invierte esta hiperpolarización, aumentando el OCR a través de un intento de recuperación del potencial de membrana. La adición de inhibidores de la ETC (antimicina A y rotenona) detiene por completo la respiración mitocondrial, y el OCR disminuye a su nivel más bajo. La diferencia en el OCR generada por estos inhibidores se denomina respiración mitocondrial máxima, que es la suma de la respiración basal y la capacidad respiratoria residual (Figura 14).

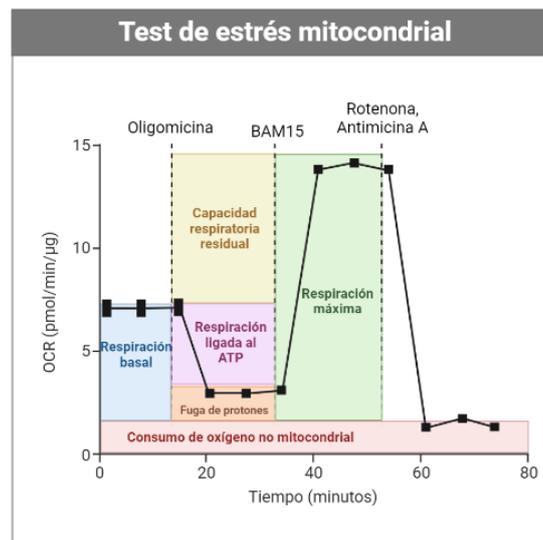


Figura 14. Test de estrés mitocondrial. Esquema del gráfico de la tasa de consumo de oxígeno (OCR). ATP: Adenosín Trifosfato; BAM15: Desacoplador mitocondrial 2,4-dinitrofenilhidrazona. Elaboración propia. Creado con BioRender.com.

Finalmente, se introduce la placa de utilidad con el sensor de carga para calibrar el equipo. Una vez concluido el tiempo de calibración (15-30 minutos) se carga la placa celular y se ejecuta el ensayo (Figura 15).

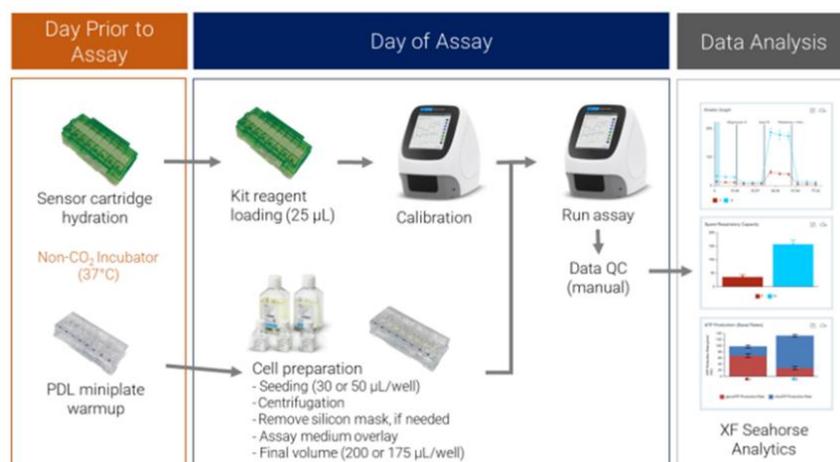


Figura 15. Análisis metabólico mediante Seahorse. Flujo de trabajo del ensayo de aptitud de células T Agilent Seahorse XF con el Agilent Seahorse XF Pro Analyzer. CO₂: Dióxido de Carbono; PDL: Poli-D-lisina; QC: Control de Calidad. Imagen extraída de la guía de usuario del Agilent Seahorse XFp T Cell Metabolic Profiling Kit.

3.6 ANÁLISIS LIPIDÓMICO

3.6.1 Procesado de las células para el análisis lipidómico

Para llevar a cabo el análisis lipidómico, se tomaron 1×10^6 células de los diferentes cultivos a distintos tiempos. Las alícuotas se centrifugaron 5 min a 500G, se resuspendieron en PBS frío y se volvieron a centrifugar 30 segundos a 6.000G para ser resuspendidas en 100 µl de agua destilada fría y almacenadas a -80°C hasta su procesado.

Las muestras generadas se descongelaron y se les adiciono 400 µL de isopropanol (IPA), se vortearon y mantuvieron durante 20 minutos a -20°C. Seguidamente, las muestras fueron centrifugadas a 15.000G a 4°C durante 15 minutos y se trasvararon 400 µL del sobrenadante obtenido a un nuevo Eppendorf de 1,5 mL. Posteriormente, las muestras se concentraron a sequedad haciendo uso del concentrador *Savant Speed Vac* (SPD121P; Thermo Fisher Scientific). Finalmente, el pellet o residuo se resuspendió en 100 µl de IPA:acetonitrilo (ACN):H₂O (2:1:1) conteniendo el patrón interno [PI (5 µg/ml)] y se transfirió a un vial para su análisis por UPLC-EM. El IS utilizado constaba de LysoPC (17:0), PC (17:0/17:0), PG (17:0/17:0), Cer (17:0/17:0), TG (17:0/17:0/17:0), CE (17:0), FA (17:0), PS (17:0/17:0) y SM (d18:1/17:0). De la resuspensión, 100 µl fueron trasvasados a viales para el análisis, utilizando además 10 µl de cada una de las muestras para preparar un control de calidad (QC) en otro vial. El proceso de análisis de las muestras se llevó a cabo de manera aleatoria. Además, se incluyeron tres muestras en blanco al principio y se intercalaron muestras de control de calidad (QC) cada 6 muestras de estudio a lo largo de la secuencia de análisis. Esto se hizo con el propósito de facilitar la identificación posterior de lípidos y garantizar la reproducibilidad y solidez del análisis.

3.6.2 Análisis por UPLC-MS/MS

Las muestras se analizaron por UPLC-MS haciendo uso del equipo *Q Exactive UHMR Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer* (0726090; Thermo Fisher Scientific). La separación cromatográfica de lípidos se realizó en una columna *Acquity UPLC CSH C18* (100 x 2.1 mm; 1.7 µm).

La detección se llevó a cabo mediante un análisis en dos modos de ionización: positivo (ESI+) y negativo (ESI-). En el caso del ESI-, se utilizó una fase móvil A compuesta por una solución de acetato de amonio 10 mM en una proporción de 60 % de ACN y 40 % de agua, mientras que la fase móvil B consistió en una solución de acetato de amonio 10 mM en una proporción de 90 % de IPA y 10 % de ACN.

Para el ESI+, se empleó una fase móvil A compuesta por una solución de formiato de amonio 10 mM en una proporción de 60 % de ACN y 40 % de agua, y una fase móvil B compuesta por una solución de formiato de amonio 10 mM en una proporción de 90 % de IPA y 10 % de ACN.

Se utilizó un flujo de inyección de 0,4 ml/min y un volumen de inyección de 5 μ L. Se estableció un gradiente de elución de modo que la composición inicial constaba de un 20 % de la fase B. A los 4 minutos, se alcanzó un 43 % de la fase B, a los 4,1 minutos un 50 %, a los 14 minutos un 54 %, a los 14,1 minutos un 70 %, y entre los 20 y 24 minutos se utilizó un 99 % de la fase B. Finalmente, entre los 24,5 y 28 minutos se regresó a una composición inicial de un 20 % de la fase B.

3.6.3 Procesado de los datos y análisis estadístico

En cuanto a la adquisición de datos, se empleó el método *Full Scan* para las muestras, mientras que se utilizaron los métodos *Full Scan*, DIA (adquisición independiente de datos) y DDA (adquisición dependiente de datos) para los controles de calidad (QC). Para el tratamiento de los datos lipidómicos e identificación de lípidos se utilizó un *script* de R desarrollado en la unidad de biomarcadores y medicina de precisión (UBMP). Una vez obtenida la tabla con los lípidos identificados, se normalizaron los datos con el método *Loess*. Por último, Todos los análisis de datos y los gráficos se realizaron con el *software* comercial *Excel* y con la herramienta web *MetaboAnalyst 5.0*.

3.7 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO POR METABOLÓMICA

Con el fin de analizar los metabolitos consumidos y producidos por los linfocitos, se extrajeron alícuotas de medio a diferentes tiempos del donante D110. El procesado de las muestras implica pipetear 20 μ L de medio y diluirlo en 180 μ L de metanol así como preparar un *pool* con 5 μ L de cada muestra (incluido los controles) que servirá como control de calidad. Como controles se emplea RPMI completo y RPMI sin suero, y se realizan diluciones para obtener cuatro concentraciones de medio diferentes (2.5 %, 5 %, 10 % y 20 %). Se analizaron las muestras por UPLC-MS utilizando el *Q Exactive UHMR Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer* que estaba acoplado a una cromatografía de interacción hidrofílica inducida por *electrospray*.

La separación LC se realizó en una columna *XBridge BEH Amide* (150 mm \times 2,1 mm, tamaño de partícula de 2,5 μ m) utilizando un gradiente de disolvente A (95 %:5 % H₂O:acetonitrilo con acetato de amonio 20 mM, hidróxido de amonio 20 mM, pH 9.4), y disolvente B (100 % acetonitrilo). El gradiente fue 0 min, 85 % B; 2 min, 85 % B; 3 min, 80 % B; 5 min, 80 % B; 6 min, 75 % B; 7 min, 75 % B; 8 min, 70 % B; 9 min, 70 % B; 10 min, 50 % B; 12 min, 50 % B; 13 min, 25 % B; 16 min, 25 % B; 18 min, 0 % B; 23 min, 0 % B; 24 min, 85 % B; 30 min, 85 % B. El caudal fue de 150 μ L min⁻¹, el volumen de inyección de 5 μ L y la temperatura de la columna de 25 °C. Los barridos MS fueron en modo de iones negativos con una resolución de 140.000 a m/z 200. El objetivo de control automático de ganancia (AGC) fue de 5 \times 10⁵ y el intervalo de barrido de 75-1000 (Zhang et al., 2017).

Con los datos obtenidos se llevó a cabo una cuantificación relativa para determinar la variación de la cantidad de metabolito por millón de células y día (ec.1). Posteriormente en el caso de la glucosa se realizará una cuantificación absoluta por medio de una recta de calibrado a partir de los valores obtenidos de RPMI sin suero para obtener los valores de concentración y poder calcular posteriormente el consumo de glucosa por millón de células y día (ec.2).

$$\frac{\Delta \text{Cantidad}}{\text{millón de células y día}} = \frac{I_{D18} \times V_{D18} - (I_{D15} \times V_{D15} + I_{D0} \times (V_{D18} - V_{D15}))}{\frac{V_{D18} \times (Cel_{D18} + Cel_{D15})}{2}} \quad (\text{ec. 1})$$

$$\frac{\text{Consumo glucosa}}{\text{millón de células y día}} = \frac{(V_{D15} \times Glc_{D15} + (V_{D18} - V_{D15}) \times Glc_{D0}) - (V_{D18} \times Glc_{D18})}{\frac{V_{D18} \times (Cel_{D18} + Cel_{D15})}{2}} \quad (\text{ec. 2})$$

I = Intensidad, V = volumen, Cel = número de células, Glc = concentración de glucosa

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CONDICIONES ÓPTIMAS DE ESTIMULACIÓN

El primer paso antes de proceder con el agotamiento de linfocitos T, consiste en determinar las condiciones óptimas de activación. Para ello los linfocitos activados se cultivaron en medios con diferentes concentraciones de glucosa (0,2 y 2g/L) y TransAct™ (100x y 1000x), el cual presenta una estructura de nanomatriz polimérica que garantiza una activación suave y eficiente de las células T. Posteriormente por citometría y por medio de un panel de anticuerpos de activación se aprecia que el porcentaje de células activadas es mayor con TransAct™ a 100x, reduciéndose este porcentaje en los linfocitos activados con diez veces menos la cantidad de TransAct™ (1000X) (Figura 16 A). Esto es debido a que activa a las células T a través de CD3 y CD28, y por tanto a menor cantidad de TransAct™ menor interacción entre los agonistas conjugados de CD3 y CD28 de la nanomatriz y las células T. Los resultados de proliferación obtenidos con el marcaje con CFSE siguen la misma tendencia que los de activación como se puede comprobar en la figura 16 B, ya que con TransAct™ 100X hay menor porcentaje de células que no se han dividido respecto a las que se han activado con TranAct™ 1000X.

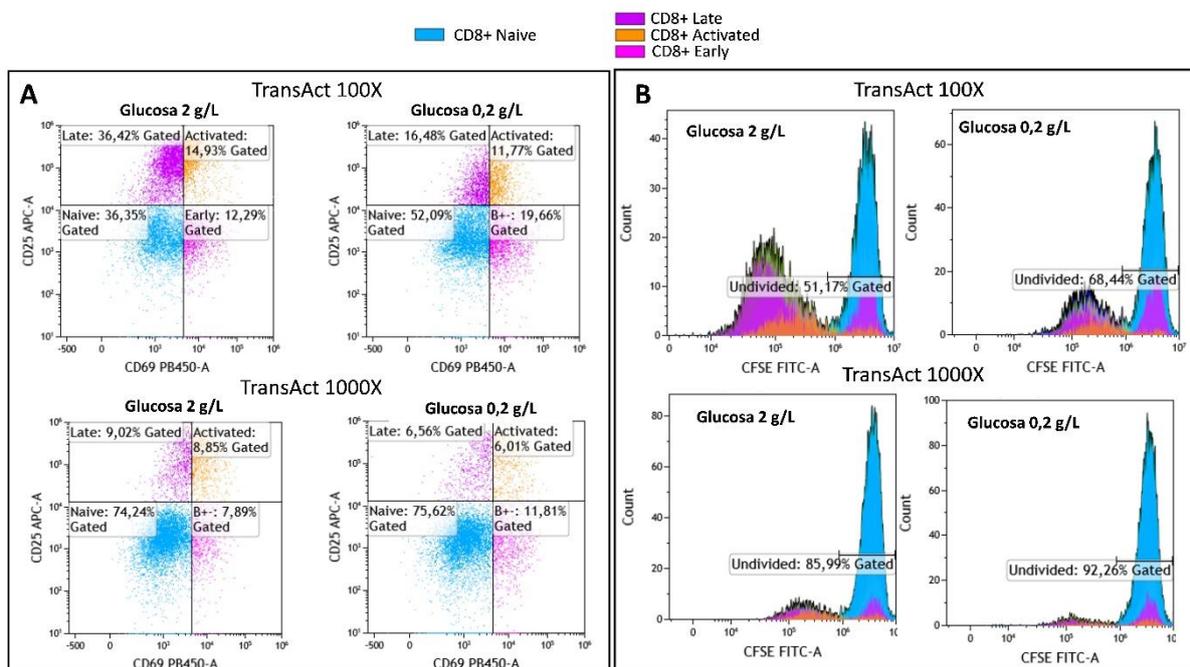


Figura 16. Estudio de las condiciones de cultivo de los linfocitos T CD8⁺. Resultados del estudio por citometría del estado de activación de los linfocitos T del donante D126. En la figura se encuentran representados los linfocitos cultivados a una dilución 1/100 de TransAct™ con 2 g/L y 0,2 g/L de glucosa (panel A superior) y los cultivados a una concentración de 2 g/L y 0.2 g/L de glucosa y 1000x de TransAct™ (panel A inferior). Siendo el eje X (CD 69) y el eje Y (CD25), pudiendo presentar un fenotipo naive (CD69⁻ CD25⁻), activado (CD69⁺ CD25⁺) y activado temprano (CD69⁺ CD25⁻) o tardío (CD69⁻ CD25⁺). Por otro lado, los resultados del estudio de proliferación mediante marcaje con CFSE se corresponden con las gráficas B (100X, panel superior y 1000X, panel inferior).

Por otro lado, también se midió el efecto de la disponibilidad de glucosa en la proliferación de las células T. Pudiéndose apreciar en la figura 16 un descenso en la proliferación de los linfocitos T cuando son cultivados con limitación de glucosa. Estos resultados evidencian la importancia conocida de la glucosa para la supervivencia celular, el tamaño, la activación y la producción de citoquinas. Concretamente la glucosa puede servir como sustrato principal para la generación de ATP; puede proporcionar una fuente de carbono para la síntesis de otros macronutrientes, como ácidos nucleicos y fosfolípidos; y puede metabolizarse por la vía de las pentosas fosfato para generar NADPH (MacIver et al., 2008).

4.2 AGOTAMIENTO DE LOS LINFOCITOS POR ESTIMULACIÓN CRÓNICA

Una vez determinadas las condiciones óptimas de cultivo se desarrolla un modelo *in vitro* en el que las células T van a ser activadas una única vez ('aguda') o repetidas varias veces en el tiempo ('crónica') con los coestimuladores CD3 y CD28 con el fin de recrear un proceso de infección crónica y obtener linfocitos agotados o exhaustos, similares a los linfocitos CD8 infiltrantes de tumor (TIL, por sus siglas en inglés) agotados o exhaustos. Los TIL presentan características fenotípicas y transcripcionales que reflejan las observadas en una infección viral crónica, posibilitando de esta forma su caracterización (Vardhana et al., 2020).

4.2.1 Caracterización de los linfocitos exhaustos

Los linfocitos que se encuentran constantemente expuestos a estimulación antigénica experimentan cambios en su perfil de expresión génica y alteraciones en la señalización intracelular, lo que lleva a una disminución en la producción de citoquinas y cambios en la expresión de moléculas de activación además de reducir la capacidad de proliferación (Wherry et al., 2007).

El agotamiento de los linfocitos T CD8+ por estimulación crónica se caracteriza por la expresión elevada de marcadores de agotamiento, como PD-1, TIM-3, y LAG-3, entre otros. Estos marcadores están asociados con la disfunción de los linfocitos T CD8 y pueden inhibir la respuesta inmunitaria (Chan et al., 2021). Es por esto por lo que se diseña un panel de anticuerpos marcados fluorescentemente que reconocerán los marcadores de linfocitos exh (panel de exhaustos) para estudiar a los linfocitos por citometría y poder caracterizarlos.

Atendiendo a los resultados obtenidos, se aprecia en todos los donantes un incremento significativo en la expresión de PD-1 a nivel de los linfocitos exh. Este incremento se produce en torno al día 13/15/18 y permite diferenciar a los linfocitos exhaustos de los estimulados. El pico de expresión de PD-1 de los linfocitos exh indica que el proceso de agotamiento mediante la estimulación persistente ha sido exitoso. Además de PD-1, en el panel de agotamiento se midió también TIM-3 y LAG-3. Por su parte LAG-3 presentaba una gran variabilidad a nivel de expresión entre los diferentes donantes, por lo que no arroja resultados concluyentes. En cambio, TIM-3 se encuentra altamente expresado tanto en linfocitos estimulados como en exhaustos. Sin embargo, en los exhaustos la expresión de TIM-3 se encuentra asociada a PD-1, es decir, los exhaustos se caracterizan por co-expresar TIM-3 y PD-1 y también por presentar una expresión de TIM-3 más sostenida en estadios tardíos del proceso de estimulación como se puede observar en la figura 17. Esta co-expresión en los linfocitos T se asocia con una disfunción inmunológica y una mayor supresión de la respuesta inmunitaria. Estos marcadores a menudo se utilizan como indicadores de la gravedad del agotamiento de los linfocitos T y se han asociado con la falta de respuesta a la terapia inmunológica en ciertos contextos, como el cáncer.

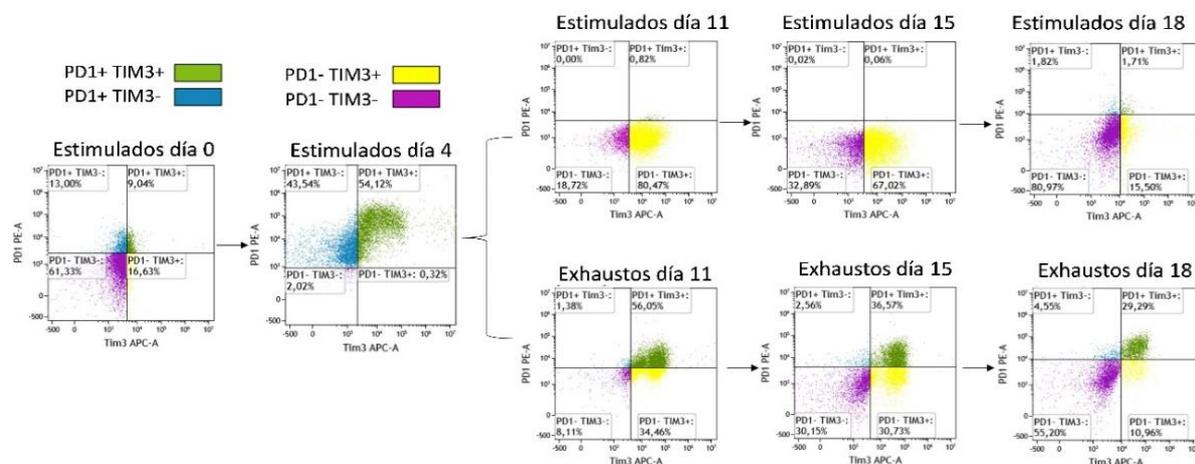


Figura 17. Caracterización de los linfocitos exhaustos. Resultados de la determinación de los marcadores inhibitorios por citometría de flujo en los linfocitos estimulados y exhaustos del donante D126. Siendo el eje X (TIM-3) y el eje Y (PD-1).

El análisis de la co-expresión de PD-1 y TIM-3 en linfocitos T exh puede proporcionar información relevante para el desarrollo de estrategias terapéuticas destinadas a revertir el agotamiento de los linfocitos T y restaurar su función efectora en enfermedades como el cáncer o las infecciones crónicas (Ma et al., 2019).

4.2.2 Estado de activación

De forma paralela al estudio de los linfocitos T con el panel de exhaustos, se analizó el estado de activación de las células T mediante un panel de activación constituido por CD69 y CD25.

Como se puede observar en la figura 18 no se aprecian diferencias entre el estado de activación de los linfocitos estimulados y exhaustos. Los niveles de CD69 a estadios tardíos del proceso de estimulación son nulos, esto es debido a que CD69 es una molécula de activación temprana que se expresa rápidamente en la superficie de los linfocitos T después de la activación.

En lo que respecta a CD25, sus niveles son elevados en ambas poblaciones de linfocitos y su disminución en los últimos días de cultivo es un indicador de regreso a un estado similar al que tenían antes de la estimulación antigénica, es decir, vuelven a un estado *naive*.

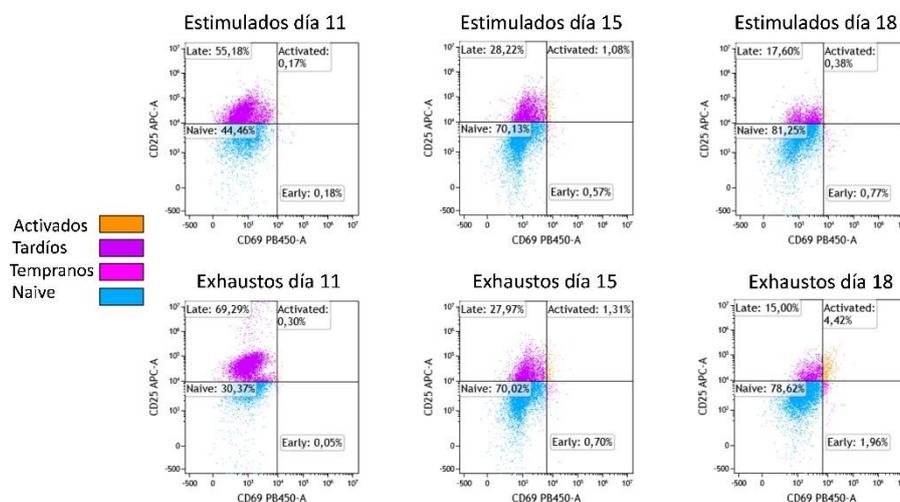


Figura 18. Estudio del estado de activación. Resultados del estudio por citometría del estado de activación de los linfocitos T del donante D126. Siendo el eje X (CD 69) y el eje Y (CD25), pudiendo presentar un fenotipo *naive* ($CD69^- CD25^-$), *activado* ($CD69^+ CD25^+$) y *activado temprano* ($CD69^+ CD25^-$) o *tardío* ($CD69^- CD25^+$).

En los tumores, los linfocitos T exh experimentan una disminución en la expresión de CD69 y CD25, lo cual indica su deterioro funcional y contribuye a la pérdida de la capacidad de proliferación y producción de citoquinas, así como a una disfunción inmunológica (Dowlatsahi et al., 2013). Sin embargo, esto no se corresponde con los resultados obtenidos, y a pesar de su estado de agotamiento, estos linfocitos aún presentan niveles elevados de CD25. Esto podría ser atribuido a la continua interacción del receptor de células T (TCR) con el antígeno y administración de IL-2, lo que provoca la persistencia en la expresión de CD25 en los linfocitos exhaustos.

4.3 EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL

En este estudio, se emplea la técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qPCR, por sus siglas en inglés) para investigar la expresión diferencial de genes entre linfocitos estimulados y exhaustos en diferentes donantes (D126, D128, D131 y D110), lo que puede proporcionar una mejor comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en el agotamiento de los linfocitos. Los datos de expresión obtenidos se normalizaron empleando la proteína ribosómica del tallo lateral P0 (RPLP0).

4.3.1 Marcadores inhibitorios y factores de transcripción

En primer lugar, para contrastar los resultados obtenidos por citometría referentes a la expresión de los marcadores inhibitorios, se analizó los niveles de ARNm de PD-1, TIM-3, LAG-3 y CTLA-4.

En la figura 19 se representan los valores de expresión de los diferentes marcadores inhibitorios, referenciando los valores a los linfocitos estimulados de forma aguda (valor 1). Se puede apreciar que todos los genes presentan un incremento de la expresión en torno a los días 13, 15 y 18 (dependiendo del donante), aunque la dispersión es grande debido a la propia heterogeneidad de los donantes (Figura 19A). Por tanto, los resultados obtenidos para PD-1 y TIM-3 siguen la misma tendencia que en el análisis por citometría de flujo. Sin embargo, por qPCR se observa un incremento significativo de LAG-3 en los linfocitos T exh, que no es apreciable por citometría. Es posible que la expresión de LAG-3 en los linfocitos T exh sea lo suficientemente baja como para ser detectada por qPCR, pero que se encuentre por debajo del límite de detección de la citometría de flujo, que suele ser menos sensible en la detección de proteínas de baja abundancia.

También se puede observar que en los marcadores en los que se observa una mayor diferencia en la expresión entre linfocitos exhaustos y estimulados son PD-1 y CTLA-4 sin embargo se desconoce si esta diferencia es debida a que desempeñan un papel más relevante en el agotamiento.

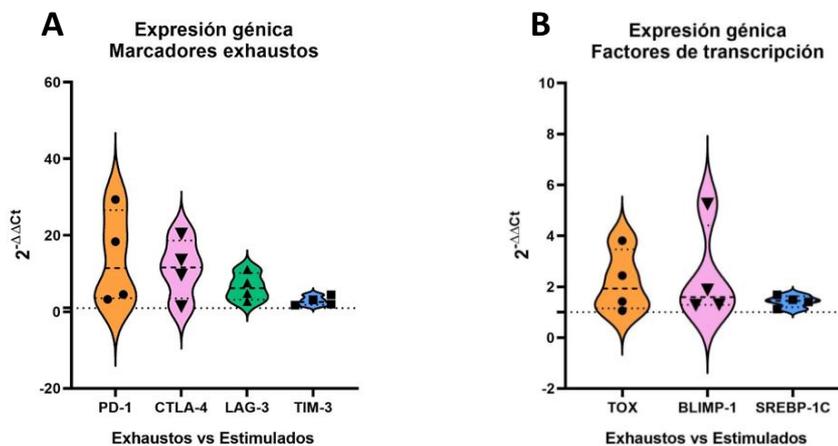


Figura 19. Estudio de la expresión génica de los marcadores exhaustos en linfocitos estimulados de forma aguda y en linfocitos exhaustos a día 15. Resultados del estudio por RT-PCR cuantitativa a tiempo real de los linfocitos estimulados y exhaustos de los donantes D110, D126, D128 y D131. Los datos están expresados como el fold change ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de los linfocitos exhaustos respecto a los linfocitos estimulados de cada donante utilizando como gen normalizador RPLPO. A) Marcadores de exhaustos. B) Factores de transcripción. CTLA-4: Antígeno de Linfocitos T Citotóxicos Asociado a Proteína 4; TIM-3: Proteína Reguladora de Inmunidad T Celular 3; PD-1: Receptor Programado de Muerte 1; LAG-3: Proteína Asociada a Linfocitos T 3; TOX: Factor Transcripcional TOX; SREBP1C: Proteína de Unión a Elementos Reguladores de Esteroles 1C; BLIMP-1: Proteína 1 Represora de la Diferenciación de Plasmocitos. Gráfica creada con Graphad Prism 9.2.0.

Por otro lado, se confirma también que estos marcadores inhibitorios se expresan de forma sinérgica, es decir, la presencia de uno de estos marcadores inhibidores puede estar asociada con la expresión o regulación de otros marcadores inhibidores en los linfocitos (Anderson et al., 2016). Estos marcadores inhibidores pueden actuar en conjunto para regular negativamente la función y la extinción de los linfocitos, lo que lleva al agotamiento de las respuestas inmunes. La co-expresión de estos marcadores inhibidores puede tener implicaciones clínicas significativas, como el desarrollo de terapias combinadas que bloquean múltiples vías de inhibición.

De forma adicional, también se estudió la expresión de diversos factores de transcripción involucrados en la regulación del agotamiento como es el caso de TOX, proteína 1 represora de la diferenciación de plasmocitos (BLIMP-1, por sus siglas en inglés) o proteína de unión a elementos reguladores de esteroides 1C (SREBP-1C, por sus siglas en inglés).

En lo que respecta al factor nuclear TOX se puede observar una mayor expresión en las poblaciones de linfocitos exh (Figura 19B). Estos resultados confirman el papel esencial de TOX para la activación del programa de expresión génica asociado al agotamiento. La expresión de TOX en células T específicas de tumor disfuncionales y en células T agotadas durante la infección viral crónica es impulsada por la estimulación crónica del receptor de células T y la activación de factores nucleares de células T activadas (NFAT, por sus siglas en inglés). Además, la alta expresión de TOX se correlacionó con la alta expresión de varios receptores inhibitorios (Scott et al., 2019).

La translocación nuclear de NFAT requiere actividad de la fosfatasa de calcineurina dependiente del calcio, lo que sugiere que la elevación sostenida del calcio intracelular podría promover la activación de NFAT. Se ha demostrado también que la expresión inicial de TOX y el agotamiento fenotípico requieren NFAT, pero la expresión sostenida de TOX posteriormente se vuelve independiente de la calcineurina (Vardhana et al., 2020).

Por otro lado, se ha visto que las células T que carecían de TOX, eran más propensas a la diferenciación terminal y la muerte dentro de los tumores. Por tanto, los programas reguladores negativos impulsados por TOX pueden proteger a las células T de la catástrofe bioenergética durante la exposición crónica a antígenos, permitiendo la supervivencia a expensas de la capacidad efectora (Scott et al., 2019).

En cuanto al factor de transcripción BLIMP-1, se observó que las células T CD8 exh tenían una expresión sustancialmente mayor de BLIMP-1 en comparación con las células T CD8⁺ estimuladas generadas después de una infección aguda (Figura 19B). Estos resultados confirman el papel importante del represor transcripcional BLIMP-1 en la regulación de varias características definitorias del agotamiento de las células T CD8 durante la infección viral crónica.

En varios estudios, se observó que la mayor expresión de BLIMP-1 se correlacionaba con la expresión de los receptores inhibitorios regulados al alza y con la represión de las propiedades de las células T de memoria. Por el contrario, la delección condicional de *Blimp-1* resultó en una reducción de la expresión inhibitoria del receptor por las células T CD8⁺ exh y demostró la participación central de *Blimp-1* en la prevención de la diferenciación normal de células T de memoria (es decir, aumento la expresión de CD127 y CD62L y la producción de IL-2) durante la infección viral crónica (Shin et al., 2009). Si bien la alta expresión de *Blimp-1* fomentó aspectos del agotamiento de las células T CD8, la haploinsuficiencia indicó que la expresión moderada de *Blimp-1* fue esencial para la función sostenida de las células T, incluida la citólisis, que a su vez era necesaria para el eventual control de la infección viral crónica. Por lo tanto, *Blimp-1* parece actuar como un reóstato transcripcional que controla la funcionalidad de las células T en bajas cantidades y el agotamiento de las células T cuando se expresa altamente (Rutishauser et al., 2009).

Por último, se analizó SREBP-1C, el cual desempeña un papel importante en el metabolismo lipídico al regular la expresión de genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos (FASN) y almacenamiento de lípidos (FABP-4 y FABP-5). Se ha sugerido que la activación de SREBP-1C en los linfocitos T exh puede contribuir a la acumulación de lípidos intracelulares y la disfunción metabólica. Esta acumulación de lípidos puede afectar negativamente la función inmunológica de los linfocitos T, incluyendo una reducción en la respuesta efectora y la producción de citoquinas (Lou et al., 2022). Sin embargo, los resultados obtenidos por qPCR no permiten reafirmar los hallazgos reportados en la bibliografía existente.

4.3.2 Genes relacionados con el metabolismo

Asimismo, se incluyeron también genes relacionados con el metabolismo lipídico (tabla S2), de los cuales solo obtuvimos diferencias en la expresión entre los linfocitos estimulados de forma aguda y crónica en CD36, FATP2 y CPT1A, (Figura 20). De nuevo, el gen normalizador (RPLP0) utilizado fue el mismo que para el análisis de expresión de los marcadores inhibitorios.

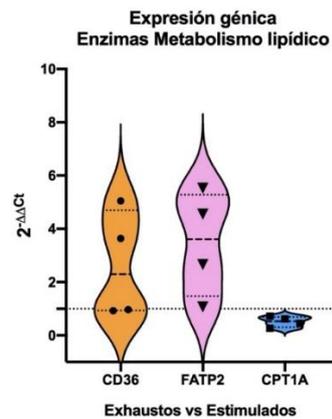


Figura 20. Estudio de la expresión génica de enzimas implicadas en el metabolismo lipídico en linfocitos estimulados de forma aguda y en linfocitos exhaustos a día 15. Resultados del estudio por RT-PCR cuantitativa a tiempo real de los linfocitos estimulados y exhaustos de los donantes D110, D126, D128 y D131. Los datos están expresados como el fold change ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de los linfocitos exhaustos respecto a los linfocitos estimulados de cada donante utilizando como gen normalizador RPLP0. CD36: Antígeno de Diferenciación 36; FATP2: Transportador de Ácidos Grasos 2; CPT1A: Carnitina Palmitoiltransferasa 1ª. Gráfica creada con Graphad Prism 9.2.0.

En lo referente a CD36, una glicoproteína que tiene capacidad de unirse a los ácidos grasos facilitando su transporte a las células, se observa un aumento en su expresión en los linfocitos exh. Estos resultados sugieren un incremento en la captación de ácidos grasos extracelulares causando esto una peroxidación lipídica y ferroptosis, lo que afecta la producción de citoquinas efectoras, incluido el factor necrótico tumoral (TNF) y el interferón-gamma (IFN- γ), conduciendo finalmente al agotamiento de las células T (D. Wu & Chen, 2022).

En los TIL CD8+ el aumento de la expresión de CD36 se entiende como una adaptación al TME enriquecido con lípidos (Xu et al., 2021). Concretamente, a medida que progresa el tumor se produce una acumulación constante de ácidos grasos en el TME generando una señal ambiental para la regulación positiva de la oxidación de ácidos grasos mediada por PPAR α (Yu et al., 2021).

Por su parte FATP2, al igual que CD36 es un transportador que media la captación de ácidos grasos exógenos. Sigue la misma tendencia que CD36, siendo su expresión mayor en los linfocitos exh respecto a los estimulados. Los niveles de mensajero de FATP2 son elevados, incluso superiores a los de CD36. El papel de FATP2 en el agotamiento de los lípidos no está completamente definido, sin embargo, se ha comprobado que el bloqueo farmacéutico de FATP2 es capaz de mejorar la inmunoterapia tumoral anti-PD-L1.

Otro transportador implicado en el metabolismo lipídico es CPT1A, este gen codifica una enzima que juega un papel clave en el transporte de ácidos grasos de cadena larga hacia la mitocondria para su oxidación. Los resultados obtenidos reflejan una alta expresión de esta enzima tanto a nivel de linfocitos estimulados como de exhaustos, siendo su expresión inferior en los exhaustos. Esta puede ser debida a que los linfocitos exh presentan una actividad glicolítica mejorada y han sido cultivado en condiciones de disponibilidad de glucosa, por tanto, la energía obtenida de la FAO es menor. Sin embargo, los TIL al encontrarse en un TME privado de glucosa, en lugar de depender de la glucosa regulan al alza la expresión de CPT1A mediada por PPAR α para aumentar la FAO y compensar el déficit de energía (D. Wu & Chen, 2022). Siendo esta activación al igual que en el caso del CD36, en respuesta a los ácidos grasos ambientales.

Se ha demostrado que cuando la glucólisis se encuentra restringida en los tumores, la ligadura de PD-1 en las células T podría promover la expresión de CPT1A, aumentando así la FAO en las mitocondrias en la etapa temprana del agotamiento (Zheng et al., 2022). Además, PD-1 tiene un papel importante en la reprogramación metabólica ya que es capaz de promover la lipólisis al mejorar la lipasa ATGL y regular al alza CPT1A y FAO (Patsoukis et al., 2015).

Estos resultados son indicativos de que se está produciendo una reprogramación a nivel del metabolismo lipídico como consecuencia del proceso de estimulación crónica.

Por tanto, a pesar de que los mecanismos transcripcionales del agotamiento de las células T durante las infecciones crónicas no están claros, se puede concluir que se produce una reprogramación a nivel de transcriptoma.

4.4 ANÁLISIS DEL ESTADO DE LAS VÍAS PRODUCTORAS DE ENERGÍA

Existe una relación directa entre el estado de activación de las células inmunitarias y la actividad de diversas vías metabólicas. Las células inmunitarias pueden pasar de un estado de reposo a uno efector, activando o desactivando las vías de producción de energía, es decir, pueden utilizar diferentes estrategias metabólicas para satisfacer sus mayores necesidades energéticas durante la activación.

Los linfocitos utilizan una red integrada de glucólisis, ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y fosforilación oxidativa para satisfacer la mayoría de sus demandas energéticas y proporcionar los intermediarios necesarios para el crecimiento y la proliferación celular.

4.4.1 Estudio de la glucólisis y la respiración mitocondrial en linfocitos

Una estrategia común para abordar los estados de las vías de producción de energía consiste en llevar a cabo mediciones simultáneas en tiempo real de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y la tasa de acidificación extracelular (ECAR). Estas mediciones actúan como indicadores de la fosforilación oxidativa y la glucólisis (Smolina et al., 2017). Para ello, se emplea un analizador de flujo extracelular, como el *Seahorse XF 96* y se utilizó el *Seahorse XF T Cell Metabolic Profiling kit* usando como plantilla de análisis *XF T Cell fitness assay*. Los linfocitos analizados provienen del donante D131, los cuales fueron estimulados con TransAct™ e IL-2 o exclusivamente con TransAct™. En el cuarto día la población se dividió, manteniendo unos linfocitos únicamente con IL-2 (estimulados) y a otros con TransAct™ e IL-2 (exhaustos) hasta la realización del *Seahorse fitness assay* a día 18.

Atendiendo a las tasas de consumo de oxígeno, se aprecian diferencias entre linfocitos exh y estimulados, así como entre las dos poblaciones de linfocitos estimulados. Los linfocitos estimulados parten de una OCR basal superior y presentan una respiración mitocondrial máxima que dobla a la de los linfocitos exh (Figura 21). Esta tendencia se mantiene a nivel de la capacidad respiratoria residual y producción de ATP por fosforilación oxidativa. Sin embargo, el mapa energético muestra que los linfocitos exh presentan un fenotipo glicolítico respecto al energético de los estimulados (Figura 22). Además, en la figura 23 se observa en los exhaustos que el porcentaje de ATP proveniente de la glucólisis es del 45,46 %, el doble que en los estimulados, lo que confirma la mayor actividad glicolítica de los linfocitos exhaustos.

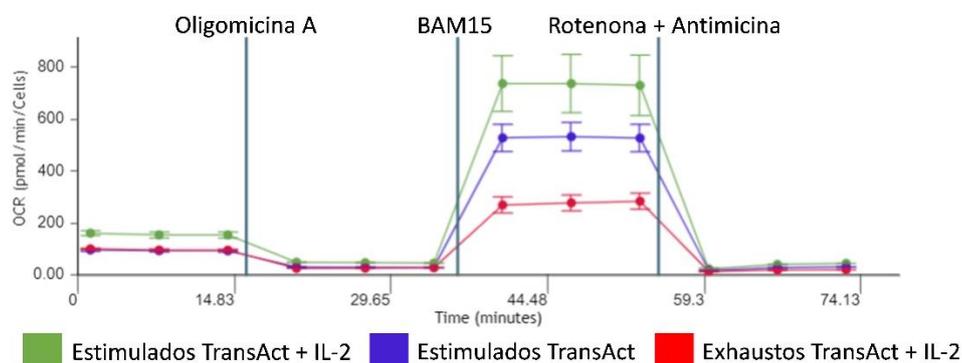


Figura 21. Gráfico cinético condiciones estándar. Esquemática del gráfico de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) (pMoles/min/célula) en ausencia o presencia de agentes mitocondriales (Oligomicina A, BAM15, Rotenota/Antimicina A), resultado de la ejecución de un *Seahorse fitness assay* en células estimuladas y exhaustas procedentes del donante D131. Cada uno de los puntos de la figura indica los valores medios para 5 réplicas en cada condición ensayada. Las barras de error representan la desviación estándar.

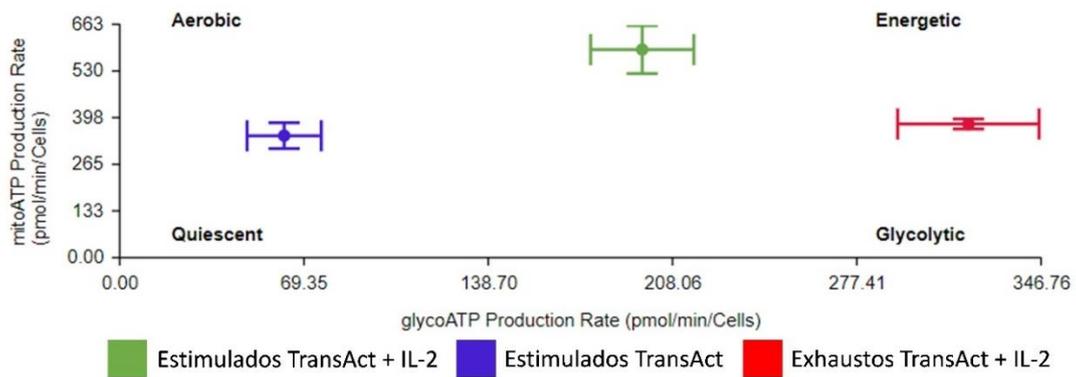


Figura 22. Mapa energético en condiciones estándar. Este diagrama de dispersión, X (ratio de producción de glycoATP) e Y (ratio de producción mitoATP) muestra la distribución de las tasas metabólicas de las células estimuladas y exhaustas. El fenotipo quiescente indica que la célula no es muy energética a través de ninguna de las vías metabólicas; en el energético, la célula utiliza ambas vías metabólicas; en el aeróbico, la célula utiliza predominantemente la respiración mitocondrial y en el glicolítico, la célula utiliza predominantemente la glucólisis. Las barras de error representan la desviación estándar

Por tanto, los linfocitos T exh presentan una menor capacidad de respuesta a la demanda energética necesaria para el crecimiento y la proliferación. Además, la mayor dependencia de la glucólisis respecto a los linfocitos estimulados evidencia la disfunción mitocondrial presente en los linfocitos exh que da lugar a una fosforilación oxidativa deteriorada (Vardhana et al., 2020).

Por otro lado, se puede observar también un nivel basal de OCR (Figura 21), producción de ATP y respiración máxima mitocondrial (Figura 23) superior en los linfocitos estimulados inicialmente con *TransAct*TM e IL-2 (estimulados T + IL-2) respecto a los estimulados únicamente con *TransAct*TM (estimulados T). En el mapa energético (Figura 22) los estimulados T + IL-2 presentan un fenotipo energético ya que utilizan ambas vías metabólicas (glucólisis y fosforilación oxidativa). En cambio, los linfocitos estimulados T presentan un fenotipo entre aeróbico y quiescente debido a su menor producción de ATP mitocondrial y glicolítica. Esto es debido a que la combinación de *TransAct*TM e IL-2 en la estimulación de linfocitos T proporciona una señal completa de coestimulación y supervivencia, lo que resulta en una activación más fuerte y una mayor proliferación de células T en comparación con la estimulación exclusivamente con *TransAct*TM.

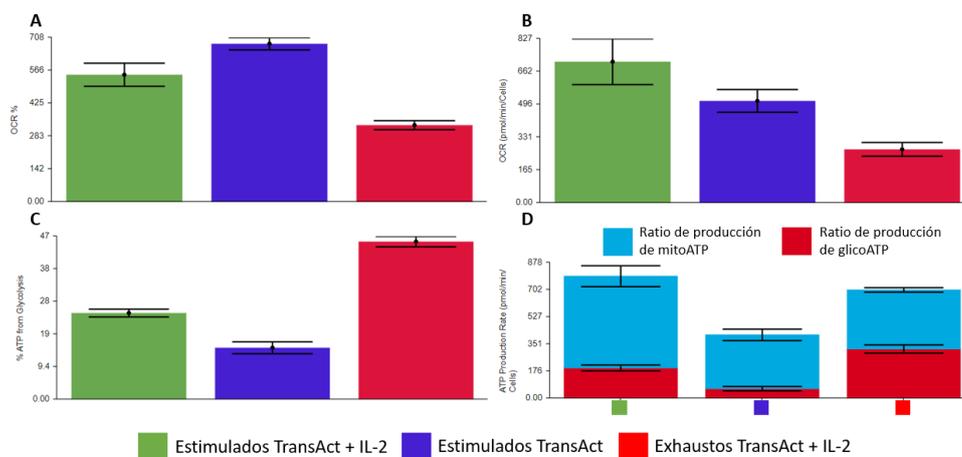


Figura 23. Parámetros evaluados en el fitness assay bajo condiciones estándar. La prueba de estrés mitocondrial ejecutada por el analizador Seahorse XFe96 permite evaluar los siguientes parámetros: (A) respiración máxima, (B) capacidad respiratoria residual, (C) porcentaje de ATP proveniente de la glucólisis y (D) producción de ATP. Cada una de las columnas de la figura indica los valores medios para 5 réplicas en cada condición ensayada. Las barras de error representan la desviación estándar.

4.4.2 Metabolismo energético en el microambiente tumoral

Con el fin de medir la habilidad de las células T de cumplir con las demandas energéticas en el microambiente metabólico restrictivo del tumor se llevó a cabo un segundo *XF T Cell fitness assay*. Estos microambientes se pueden simular usando inhibidores de vías metabólicas o alterando las condiciones del medio de ensayo como los niveles de nutrientes. De forma que los linfocitos estimulados y exhaustos del donante D110 fueron cultivados con diferente disponibilidad de glucosa (10mM versus 0.1 mM) y de forma previa a la inserción de oligomicina se inyectó a determinadas muestras etomoxir. El etomoxir inhibe específicamente una enzima llamada carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT-1), que es responsable del transporte de ácidos grasos a través de la membrana mitocondrial para su oxidación (Schlaepfer et al., 2014; O'Connor et al., 2018). La expresión de CPT-1 se encuentra reducida en los linfocitos exh por lo que estos presentan de por sí un menor flujo de ácidos grasos a la mitocondria como consecuencia del proceso de agotamiento. Al inhibir esta enzima, el etomoxir impide que los ácidos grasos entren en la mitocondria y sean utilizados como fuente de energía. Obteniendo de esta forma información sobre la contribución relativa de los ácidos grasos en el metabolismo energético de los linfocitos.

El *Seahorse fitness assay* (Figura 24) confirma las diferencias entre estimulados y exhaustos ensayados bajo las mismas condiciones. Los estimulados con niveles de glucosa normales y sin etomoxir, presentan una mayor OCR basal, así como una respiración máxima mitocondrial superior a todas las poblaciones de exhaustos, así como a la del resto de linfocitos ensayados. Por lo tanto, los linfocitos estimulados son capaces de correr más rápido la maquinaria de respiración mitocondrial bajo las diferentes condiciones del ensayo. Esta capacidad les permitiría presentar un mejor *fitness* en el microambiente tumoral, es decir, tendrían un mayor potencial para cumplir con la demanda energética para cumplir con las funciones necesarias de las células T, como la activación y la expansión.

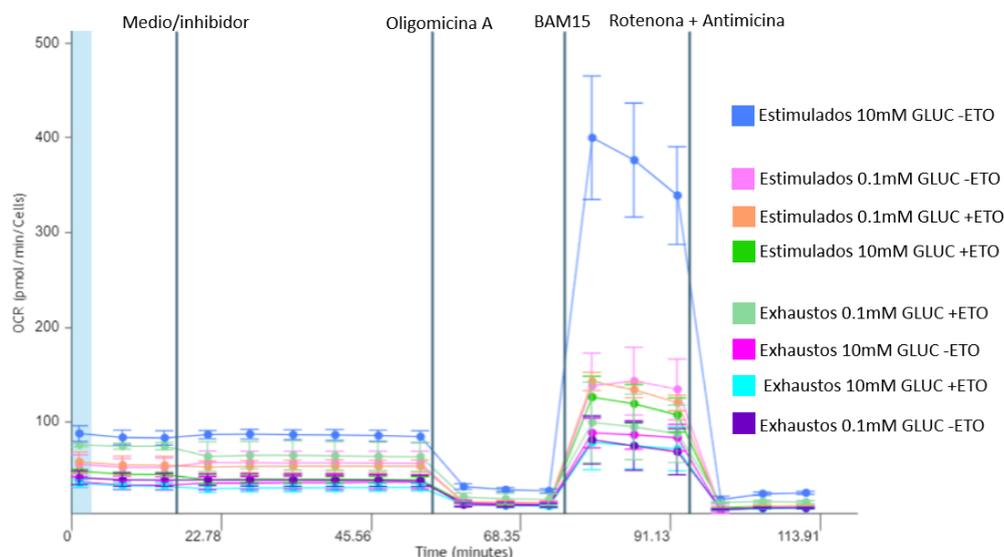


Figura 24. Gráfico cinético condiciones limitantes. Esquemática del gráfico de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) ($\mu\text{Moles}/\text{min}$) en ausencia o presencia de agentes mitocondriales (Oligomicina A, BAM15, Rotenona/Antimicina A), resultado de la ejecución de un *Seahorse fitness assay* en células estimuladas y exhaustas procedentes del donante D110 y sometidas a condiciones diferenciales de glucosa y etomoxir. Cada uno de los puntos de la figura indica los valores medios para 5 réplicas en cada condición ensayada. Las barras de error representan la desviación estándar.

Por otro lado, los linfocitos exh presentan una baja respiración máxima (Figura 25A) no observándose diferencias significativas en cuanto a la presencia/ausencia de etomoxir en condiciones de disponibilidad de glucosa, lo que evidencia la dependencia de la glucólisis en los linfocitos exhaustos. En cambio, en ausencia de sustrato para la glucólisis sí que se aprecia una tendencia descendente, aunque no significativa de la respiración máxima la cual indica una mayor importancia de los ácidos grasos como fuente de energía en ausencia de glucosa.

En lo que respecta a las condiciones del ensayo, la limitación de glucosa origina una bajada del ratio de producción de ATP de la glucólisis (Figura 25C), ocasionando una mayor dependencia de la mitocondria para la producción de energía. Sin embargo, la adición de etomoxir incrementa ligeramente la cantidad de ATP producida por glucólisis para compensar la inhibición de la entrada de ácidos grasos a la mitocondria.

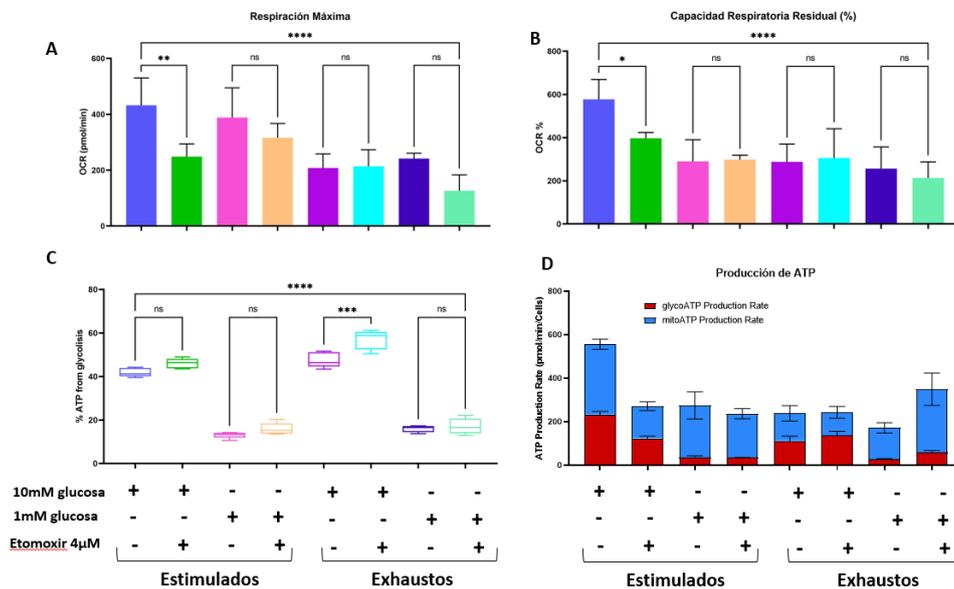


Figura 25. Parámetros evaluados en el fitness assay bajo condiciones limitantes. La prueba de estrés mitocondrial ejecutada por el analizador Seahorse XFe96 permite evaluar los siguientes parámetros: (A) respiración máxima, (B) capacidad respiratoria residual, (C) porcentaje de ATP proveniente de la glucólisis y (D) producción de ATP. Cada una de las columnas de la figura indica los valores medios para 5 réplicas en cada condición ensayada. Las barras de error representan la desviación estándar. El test estadístico utilizado en esta figura es un One-way ANOVA con multiple comparisons. ns = no significativo; ** = p-value < 0,01; *** = p-value < 0,001; **** = p-value < 0,0001. Gráfica creada con Graphad Prism 9.2.0.

Todo lo anteriormente mencionado se puede apreciar en el mapa energético (Figura 26). En este se observan que las muestras se diferencian en tres grupos: linfocitos con limitación de glucosa que presentan un fenotipo aeróbico; linfocitos con glucosa 10 mM que manifiestan un fenotipo más glicolítico y linfocitos estimulados con glucosa 10 mM y ausencia de etomoxir, los cuales utilizan ambas vías dando lugar a un fenotipo energético.

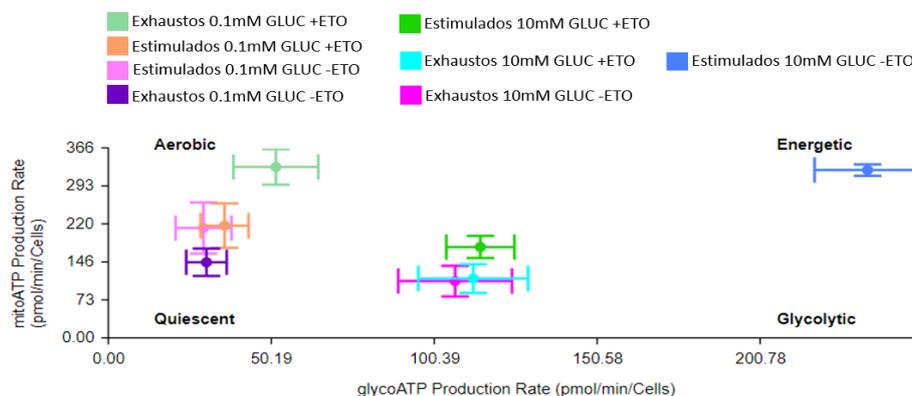


Figura 26. Mapa energético en condiciones limitantes. Este diagrama de dispersión X (ratio de producción de glycoATP) e Y (ratio de producción mitoATP) muestra la distribución de las tasas metabólicas de las células estimuladas y exhaustas en condiciones diferenciales de glucosa y etomoxir. El fenotipo quiescente indica que la célula no es muy energética a través de ninguna de las vías metabólicas; en el energético, la célula utiliza ambas vías metabólicas; en el aeróbico, la célula utiliza predominantemente la respiración mitocondrial y en el glicolítico, la célula utiliza predominantemente la glucólisis. Las barras de error representan la desviación estándar.

Con todo esto, se puede concluir que el tratamiento con etomoxir resulta en un descenso en la respiración máxima y en una menor producción de ATP por parte de la mitocondria en los linfocitos estimulados, ya que estos presentan una mayor dependencia de la fosforilación oxidativa al no carecer de la disfunción mitocondrial que presentan los exhaustos. Por su parte los linfocitos exh presentan un fenotipo glicolítico en condiciones de disponibilidad de glucosa, lo que confirma los resultados obtenidos en el primer ensayo *Seahorse*. También se observa que los linfocitos estimulados en ausencia de glucosa y los linfocitos exh presentan una baja capacidad respiratoria residual (Figura 25B) por lo que en condiciones de alta demanda energética no son capaces de cumplir con esta. Por tanto se ha conseguido verificar que las células T pueden ser menos aptas metabólicamente en entornos limitantes, como lo es el microambiente tumoral (Guo et al., 2021).

4.4.3 Composición de los medios de cultivo

Con el fin de validar los resultados obtenidos en el *fitness assay* relacionados con la actividad glicolítica de los linfocitos, se tomaron muestras del medio de cultivo de los linfocitos estimulados y exhaustos del donante D110 en diferentes momentos. Estas muestras se sometieron a análisis mediante UPLC-MS para determinar los niveles de glucosa y de lactato del medio.

En primer lugar, se analizan los resultados obtenidos mediante una cuantificación relativa, la cual aporta información acerca de la variación de la cantidad de metabolito por millón de células y día. La cuantificación se realizó con los datos recogidos en el intervalo de tiempo entre los días 15 y 18, puesto que en torno a estos días es cuando los linfocitos adquieren el fenotipo de exhaustos y se produce la reprogramación metabólica.

En cuanto a los resultados, se observa que los valores de la variación de la cantidad de glucosa son negativos tanto para estimulados como para exhaustos, lo que indica que se ha producido una disminución del contenido de glucosa del medio entre los días 15 y 18 debido a su consumo por parte de las células T. Además, también se aprecia que la variación de la cantidad de glucosa por millón de células y día (Tabla 2) es mayor en exhaustos (-0,47) que en estimulados (-0,23). Sin embargo, para poder comparar estas dos poblaciones directamente, se lleva a cabo una cuantificación absoluta que permita clarificar los resultados. Por tanto, mediante una recta de calibrado se obtuvo la concentración de glucosa en el medio a día 18 (Tabla 2), siendo de 752,23 mg/L en estimulados y de 52,22 mg/L en exhaustos. A partir de estos datos se determinó que el consumo de glucosa (Tabla 2) era de 7,50 mg/L por millón de células y día en los linfocitos estimulados, y de 15,16 mg/L por millón de células y día en el caso de los exhaustos.

		Glucosa		Lactato	
		Estimulados	Exhaustos	Estimulados	Exhaustos
Δ cantidad/millón células y día		-0,23 UA	-0,47 UA	-1,7 UA	1,22 UA
Concentración	Día 15	1321,45 mg/L	246,15 mg/L	No determinable	
	Día 18	752,23 mg/L	52,22 mg/L		
Consumo /millón células y día		7,50 mg/L	15,16 mg/L		

Tabla 2. Resultados del análisis metabólico de los medios de cultivo. Estudio de los niveles de glucosa y lactato de los medios de cultivo de los linfocitos estimulados y exhaustos por medio de una cuantificación relativa y absoluta a partir de los valores obtenidos por UPLC-MS. UA = Unidades Arbitrarias.

En lo referente al lactato, este no se encuentra formando parte del medio de cultivo comercial (RPMI 1640) sino que viene dado por el suero, imposibilitando por tanto su cuantificación absoluta al no poder

interpolan los valores de intensidad en una recta de calibrado. Es por esto por lo que su estudio se limita a una cuantificación relativa, obteniéndose que la variación de la cantidad de lactato por millón de células y día entre los días 15 y 18 (Tabla 2) es de -1,70 en el caso de los estimulados y de 1,22 en los exhaustos. Estos valores muestran un consumo de lactato por parte de los estimulados y una generación en el caso de los exhaustos.

Estos resultados confirman lo observado en *seahorse fitness assay*, concluyéndose que los linfocitos T estimulados crónicamente *in vitro* presentan una reprogramación metabólica que da lugar a una glucólisis mejorada, presentando por tanto una mayor captación de glucosa y tasa de acidificación extracelular, debido al aumento de la fracción de glucosa excretada como lactato (Vardhana et al., 2020).

4.5 ESTUDIO LIPIDÓMICO

Por último, se examinaron los perfiles lipidómicos de linfocitos exh y estimulados del donante D110 a diferentes tiempos mediante un análisis por UPLC-MS. Una vez obtenidos los datos lipidómicos, se llevó a cabo un análisis no supervisado de componentes principales (PCA) para comprobar la existencia de valores atípicos y posibles agrupaciones de las muestras analizadas.

En la figura 27, se puede observar a lo largo de la componente 1 cómo las muestras se agrupan en dos conjuntos distintos: uno conformado por los linfocitos agotados y otro que engloba el resto de las muestras. La componente 1 del análisis revela la mayor parte de la varianza explicada, capturando las diferencias más significativas entre las muestras. Por lo que análisis del PCA revela una clara separación de los linfocitos exh a día 18 respecto al resto de muestras, lo que apunta la existencia de una firma lipidómica subyacente al agotamiento de los linfocitos.

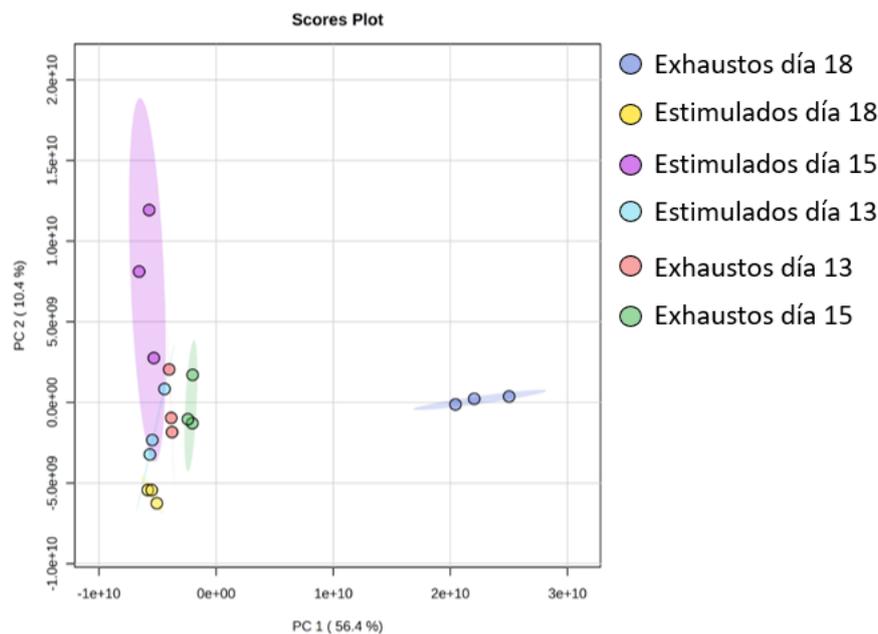


Figura 27. PCA Score-plot del estudio del perfil lipídico. Análisis no supervisado de componentes principales de los linfocitos estimulados y exhaustos del donante D110 a día 13,15 y 18. PC1: componente principal 1; PC2: componente principal 2.

Posteriormente, se obtuvo un mapa de calor (Figura 28) el cual agrupa a las muestras de la misma forma que el PCA (exhaustos día 18 versus resto de muestras). En la parte superior del mapa de calor es donde se observan las diferencias más significativas entre los dos grupos, puesto que se observa una elevada intensidad de señal para determinados lípidos en los linfocitos exh a día 18. Esto es un indicativo de que se ha producido una reprogramación metabólica consecuencia del agotamiento que afecta a las vías del metabolismo lipídico dando lugar a variaciones en la concentración de determinados lípidos.

Por otro lado, en el mapa de calor (Figura 28) se puede apreciar concentraciones inferiores de los lípidos estudiados en los linfocitos estimulados a día 18 con respecto al resto de muestras. Esto es debido a que se trata de un estadio tardío del proceso de estimulación en el cual los linfocitos pasan de un estado activado a un estado de reposo, adquiriendo un fenotipo *naive* y presentando por tanto un metabolismo basal de bajo consumo energético.

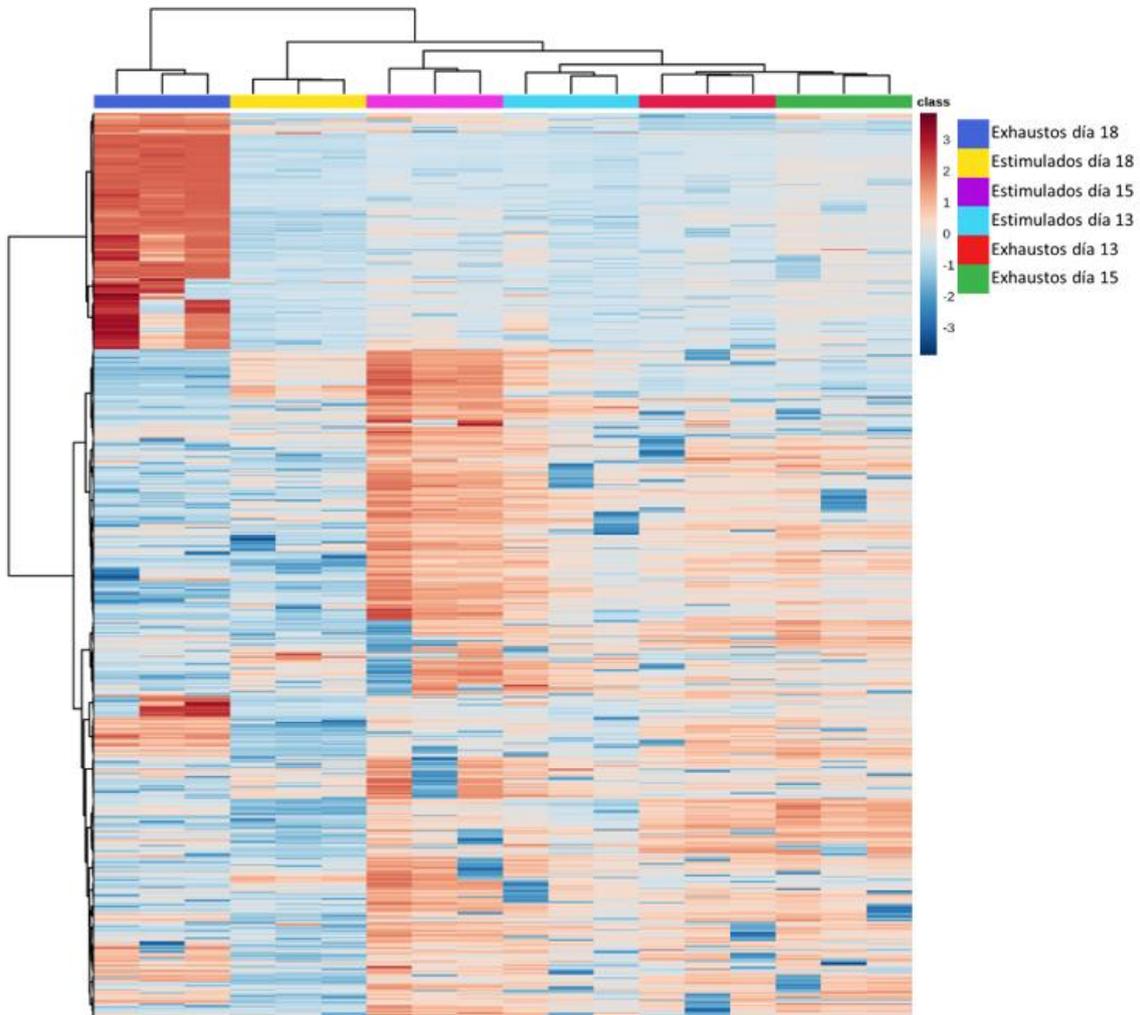


Figura 28. Heat map del análisis del perfil lipídico. Los datos representados son la concentración de las diferentes especies lipídicas presentes en los linfocitos exhaustos y estimulados del donante D110 a los días 13, 15 y 18 normalizado con el número de células. Los colores representan la intensidad de la concentración. El color rojo representa intensidad alta en el contexto específico del estudio. En contraste, el azul representa intensidad baja.

Para profundizar aún más en los cambios lipidómicos asociados al proceso de agotamiento, se investigaron las especies lipídicas cuya abundancia varía de forma más significativa en los linfocitos exh a día 18 en comparación con el resto de las muestras.

En la figura 29, se puede observar que los linfocitos exh a día 18 presentan niveles significativamente elevados de triglicéridos. Un triglicérido es un tipo de lípido compuesto por la unión de tres moléculas de ácidos grasos a una molécula de glicerol. Estos lípidos se almacenan en forma de gotas en el citoplasma de los linfocitos T y se descomponen en ácidos grasos que son utilizados para obtener energía mediante la beta-oxidación y la posterior fosforilación oxidativa (Yu et al., 2021).

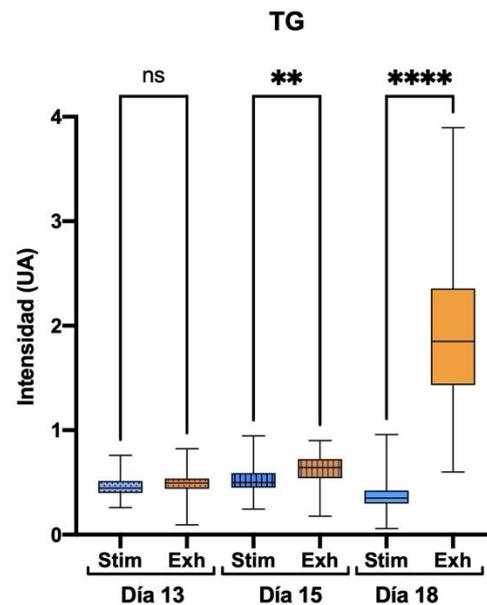


Figura 29. Diagrama de cajas del análisis del perfil de triglicéridos. Los datos representados hacen referencia a la media de la intensidad de las 3 réplicas de todos los triglicéridos analizados con el espectrómetro de masas y normalizados por el número de linfocitos exhaustos y estimulados del donante D110 a los días 13, 15 y 18. UA: Unidades Arbitrarias. El test estadístico utilizado en esta figura es un One-way ANOVA con multiple comparisons. ns = no significativo; ** = p-value < 0,01; **** = p-value < 0,0001. Las barras de error representan la desviación estándar. Gráfica creada con Graphad Prism 9.2.0.

Los genes DGAT1/2 participan en la síntesis de triglicéridos (Snaebjornsson et al., 2020). Sin embargo, los resultados obtenidos mediante qPCR no indicaron un aumento en la expresión de estos genes en los linfocitos exh (datos no mostrados). Por lo tanto, se deduce que los niveles elevados de triglicéridos se deben a una mayor acumulación en el citoplasma de ácidos grasos, presentando por tanto DGAT1/2 una mayor disponibilidad de sustrato para la formación de triglicéridos. En otras palabras, los linfocitos exh presentan una menor capacidad para llevar a cabo la beta-oxidación de los ácidos grasos debido a la disfunción mitocondrial que exhiben, lo que resulta en una mayor acumulación de ácidos grasos en forma de triglicéridos.

Además, mediante qPCR se demostró una disminución en la expresión de CPT1A, un transportador encargado de introducir los ácidos grasos en la mitocondria, lo cual respalda los resultados del análisis lipidómico. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de ácidos grasos, a pesar de que la expresión de CD36 y FATP2 estaba aumentada en los linfocitos exh. Por lo que se puede concluir que no se observan diferencias a nivel de ácidos grasos debido a que estos se almacenan en forma de triglicéridos.

Sumado a lo anteriormente mencionado, en los linfocitos exh a día 18, se observa también un aumento significativo en los niveles de ceramidas (Figura 30). Las ceramidas son un lípido constituido por una esfingosina unida a un ácido graso mediante un enlace amida. Estas son necesarias para el correcto funcionamiento de la mitocondria, pero se ha demostrado que el exceso de contenido de ceramida induce disfunción mitocondrial y deteriora la capacidad respiratoria mediante la generación de especies reactivas de oxígeno y el aumento del estrés oxidativo, provocando una disminución de la tasa de oxidación de ácidos grasos así como la interrupción de la cadena de transporte de electrones (Gaggini et al., 2022).

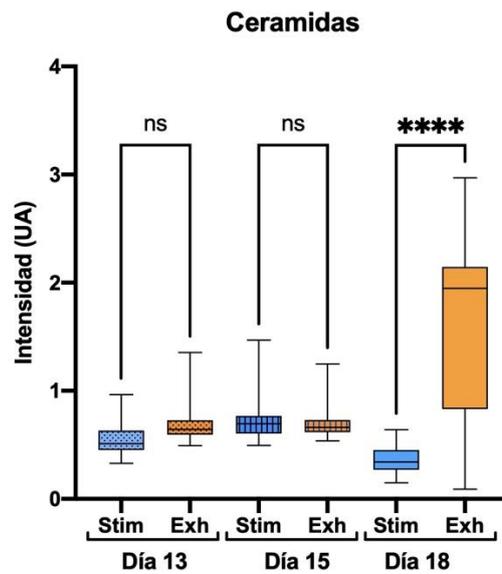


Figura 30. Diagrama de cajas del análisis del perfil de ceramidas. Los datos representados hacen referencia a la media de la intensidad de las 3 réplicas de todas las ceramidas analizadas con el espectrómetro de masas y normalizadas por el número de linfocitos exhaustos y estimulados del donante D110 a los días 13, 15 y 18. UA: Unidades Arbitrarias. El test estadístico utilizado en esta figura es un One-way ANOVA con multiple comparisons. ns = no significativo; **** = p -value < 0,0001. Las barras de error representan la desviación estándar. Gráfica creada con Graphad Prism 9.2.0.

Existe una relación entre los niveles elevados de triglicéridos y ceramidas, ya que la acumulación de ceramidas promueve la redistribución de translocasas de ácidos grasos como CD36, facilitando así la captación de ácidos grasos. Además, las ceramidas inducen la expresión de genes como SREBP, que promueven la incorporación de ácidos grasos libres en los triglicéridos para facilitar su almacenamiento en gotas lipídicas. También tienen la capacidad de inhibir la lipólisis al bloquear la activación de la enzima lipasa sensible a hormonas (HSL), cuya función principal es catalizar la hidrólisis de los triglicéridos en ácidos grasos y glicerol (Chaurasia & Summers, 2021).

Con todo esto se puede concluir que, como consecuencia del agotamiento de los linfocitos se produce una reprogramación metabólica que da lugar a una firma lipidómica caracterizada por un incremento en la concentración de triglicéridos y ceramidas.

5. CONCLUSIONES

En base a este trabajo, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La estimulación crónica *in vitro* de los correceptores del TCR resultó en la generación de linfocitos exhaustos. Esta estrategia de estimulación ha logrado replicar de manera significativa algunos de los mecanismos y características observadas en linfocitos exhaustos durante infecciones crónicas y cáncer, brindando un modelo *in vitro* que simula con mayor precisión las condiciones clínicas.
2. Se ha confirmado el aumento en la expresión de los receptores inhibidores PD-1, TIM-3, LAG-3 y CTLA-4 como resultado del agotamiento de los linfocitos T.
3. Se ha demostrado la existencia de una reprogramación metabólica en los linfocitos exhaustos, evidenciada por la expresión diferencial de genes relacionados con el metabolismo energético. Además, se ha detectado una disfunción mitocondrial que resultó en una disminución de la oxidación de ácidos grasos y la fosforilación oxidativa, lo cual fue compensado por un aumento en la actividad de la glucólisis. La evaluación de los niveles de glucosa y lactato del medio confirman esta alteración metabólica.
4. El análisis lipidómico ha revelado la identificación de una firma lipídica relacionada con el agotamiento, evidenciada por el incremento en los niveles de triglicéridos y ceramidas, lo cual evidencia la existencia de una alteración en la función mitocondrial.

En cuanto a perspectivas futuras acerca del proyecto, los resultados obtenidos en los diferentes experimentos deberían ser validados ampliando la población muestral. Concretamente sería de gran interés repetir el *Seahorse fitness assay* y el análisis lipidómico para obtener conclusiones más fiables y contrastadas. Por otro lado, puesto que la expresión génica y proteica no se encuentran siempre correlacionadas debido a la regulación post-transcripcional y post-traducciona, se podrían emplear técnicas de cuantificación proteica como *Western blot* que complementen los resultados obtenidos por las qPCR.

De igual modo, sería interesante seguir estudiando el comportamiento de los linfocitos sometidos a condiciones ambientales distintas, por ejemplo, aplicando hipoxia, alterando los sustratos energéticos disponibles como la glucosa o empleando medios que simulen con mayor fidelidad las condiciones del microambiente tumoral.

Por último, se podría estudiar la capacidad de las células T citotóxicas para matar a las células tumorales a través de un *T Cell Killing Assay* midiendo diferentes parámetros, como la liberación de citocinas o la muerte de células objetivo. Todo lo planteado anteriormente resultaría particularmente revelador en términos de su potencial para una futura aplicabilidad clínica.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ALFEI, F.; & ZEHN, D. (2017). T Cell Exhaustion: An Epigenetically Imprinted Phenotypic and Functional Makeover. *Trends in Molecular Medicine*, 23(9), 769-771. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.07.006>
- AMITRANO, A. M.; & KIM, M. (2023). Metabolic Challenges in Anticancer CD8 T Cell Functions. *Immune Network*, 23(1). <https://doi.org/10.4110/in.2023.23.e9>
- ANDERSON, A. C.; JOLLER, N.; & KUCHROO, V. K. (2016). Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity*, 44(5), 989-1004. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.05.001>
- ANDREWS, L. P.; YANO, H.; & VIGNALI, D. A. A. (2019). Inhibitory receptors and ligands beyond PD-1, PD-L1 and CTLA-4: Breakthroughs or backups. *Nature Immunology*, 20(11), 1425-1434. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0512-0>
- APPAY, V.; PAPAGNO, L.; SPINA, C. A.; HANSASUTA, P.; KING, A.; JONES, L.; OGG, G. S.; LITTLE, S.; MCMICHAEL, A. J.; RICHMAN, D. D.; & ROWLAND-JONES, S. L. (2002). Dynamics of T Cell Responses in HIV Infection1. *The Journal of Immunology*, 168(7), 3660-3666. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.7.3660>
- BACHMANN, M. F.; WOLINT, P.; WALTON, S.; SCHWARZ, K.; & OXENIUS, A. (2007). Differential role of IL-2R signaling for CD8+ T cell responses in acute and chronic viral infections. *European Journal of Immunology*, 37(6), 1502-1512. <https://doi.org/10.1002/eji.200637023>
- BAENKE, F.; PECK, B.; MIESS, H.; & SCHULZE, A. (2013). Hooked on fat: The role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Disease Models & Mechanisms*, 6(6), 1353-1363. <https://doi.org/10.1242/dmm.011338>
- BANTUG, G. R.; GALLUZZI, L.; KROEMER, G.; & HESS, C. (2018). The spectrum of T cell metabolism in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 18(1), 19-34. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.99>
- BELTRA, J.-C.; MANNE, S.; ABDEL-HAKEEM, M. S.; KURACHI, M.; GILES, J. R.; CHEN, Z.; CASELLA, V.; NGIOW, S. F.; KHAN, O.; HUANG, Y. J.; YAN, P.; NZINGHA, K.; XU, W.; AMARAVADI, R. K.; XU, X.; KARAKOUSIS, G. C.; MITCHELL, T. C.; SCHUCHTER, L. M.; HUANG, A. C.; & WHERRY, E. J. (2020). Developmental Relationships of Four Exhausted CD8+ T Cell Subsets Reveals Underlying Transcriptional and Epigenetic Landscape Control Mechanisms. *Immunity*, 52(5), 825-841.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.014>
- BEVILACQUA, A.; LI, Z.; & HO, P. (2022). Metabolic dynamics instruct CD8+ T-cell differentiation and functions. *European Journal of Immunology*, 52(4), 541-549. <https://doi.org/10.1002/eji.202149486>
- BLACKBURN, S. D.; SHIN, H.; HAINING, W. N.; ZOU, T.; WORKMAN, C. J.; POLLEY, A.; BETTS, M. R.; FREEMAN, G. J.; VIGNALI, D. A. A.; & WHERRY, E. J. (2009). Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nature Immunology*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ni.1679>
- BROADFIELD, L. A.; PANE, A. A.; TALEBI, A.; SWINNEN, J. V.; & FENDT, S.-M. (2021). Lipid metabolism in cancer: New perspectives and emerging mechanisms. *Developmental Cell*, 56(10), 1363-1393. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.04.013>
- BUCK, M. D.; O'SULLIVAN, D.; & PEARCE, E. L. (2015). T cell metabolism drives immunity. *The Journal of Experimental Medicine*, 212(9), 1345-1360. <https://doi.org/10.1084/jem.20151159>
- CHAN, J. D.; LAI, J.; SLANEY, C. Y.; KALLIES, A.; BEAVIS, P. A.; & DARCY, P. K. (2021). Cellular networks controlling T cell persistence in adoptive cell therapy. *Nature Reviews Immunology*, 21(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00539-6>
- CHANG, C.-H.; QIU, J.; O'SULLIVAN, D.; BUCK, M. D.; NOGUCHI, T.; CURTIS, J. D.; CHEN, Q.; GINDIN, M.; GUBIN, M. M.; VAN DER WINDT, G. J. W.; TONC, E.; SCHREIBER, R. D.; PEARCE, E. J.; & PEARCE, E. L. (2015). Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell*, 162(6), 1229-1241. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.016>
- CHAURASIA, B.; & SUMMERS, S. A. (2021). Ceramides in Metabolism: Key Lipotoxic Players. *Annual review of physiology*, 83, 303-330. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-031620-093815>
- CHERKASSKY, L.; MORELLO, A.; VILLENA-VARGAS, J.; FENG, Y.; DIMITROV, D. S.; JONES, D. R.; SADELAIN, M.; & ADUSUMILLI, P. S. (2016). Human CAR T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(8), 3130-3144. <https://doi.org/10.1172/JCI83092>
- CHI, H. (2012). Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions. *Nature Reviews Immunology*, 12(5), 325-338. <https://doi.org/10.1038/nri3198>
- CROFT, M. (2009). The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nature Reviews Immunology*, 9(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/nri2526>
- CUI, W.; & KAECH, S. M. (2010). Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells. *Immunological Reviews*, 236(1), 151-166. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00926.x>
- DAY, C. L.; KAUFMANN, D. E.; KIEPIELA, P.; BROWN, J. A.; MOODLEY, E. S.; REDDY, S.; MACKAY, E. W.; MILLER, J. D.; LESLIE, A. J.; DEPIERRES, C.; MNCUBE, Z.; DURAISWAMY, J.; ZHU, B.; EICHBAUM, Q.; ALTFELD, M.; WHERRY, E. J.; COOVADIA, H. M.; GOULDER, P. J. R.; KLENERMAN, P.; ... WALKER, B. D. (2006). PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*, 443(7109), 350-354. <https://doi.org/10.1038/nature05115>

- DERYNCK, R.; & ZHANG, Y. E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature*, 425(6958), 577-584. <https://doi.org/10.1038/nature02006>
- DIMELOE, S.; BURGNER, A.-V.; GRÄHLERT, J.; & HESS, C. (2017). T-cell metabolism governing activation, proliferation and differentiation; a modular view. *Immunology*, 150(1), 35-44. <https://doi.org/10.1111/imm.12655>
- DOERING, T. A.; CRAWFORD, A.; ANGELOSANTO, J. M.; PALEY, M. A.; ZIEGLER, C. G.; & WHERRY, E. J. (2012). Network Analysis Reveals Centrally Connected Genes and Pathways Involved in CD8+ T Cell Exhaustion versus Memory. *Immunity*, 37(6), 1130-1144. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.08.021>
- DOLINA, J. S.; VAN BRAECKEL-BUDIMIR, N.; THOMAS, G. D.; & SALEK-ARDAKANI, S. (2021). CD8+ T Cell Exhaustion in Cancer. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.715234>
- DOWLATSHAHI, M.; HUANG, V.; GEHAD, A. E.; JIANG, Y.; CALARESE, A.; TEAGUE, J. E.; DOROSARIO, A. A.; CHENG, J.; NGHIEM, P.; SCHANBACHER, C. F.; THAKURIA, M.; SCHMULTS, C. D.; WANG, L. C.; & CLARK, R. A. (2013). Tumor-specific T cells in human Merkel cell carcinomas: A possible role for Tregs and T-cell exhaustion in reducing T-cell responses. *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(7), 1879-1889. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.75>
- FARHOOD, B.; NAJAFI, M.; & MORTEZAEI, K. (2019). CD8+ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 8509-8521. <https://doi.org/10.1002/jcp.27782>
- FRAUWIRTH, K. A.; RILEY, J. L.; HARRIS, M. H.; PARRY, R. V.; RATHMELL, J. C.; PLAS, D. R.; ELSTROM, R. L.; JUNE, C. H.; & THOMPSON, C. B. (2002). The CD28 Signaling Pathway Regulates Glucose Metabolism. *Immunity*, 16(6), 769-777. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00323-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00323-0)
- GAGGINI, M.; NDREU, R.; MICHELUCCI, E.; ROCCHICCIOLI, S.; & VASSALLE, C. (2022). Ceramides as Mediators of Oxidative Stress and Inflammation in Cardiometabolic Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2719. <https://doi.org/10.3390/ijms23052719>
- GUO, Y.; XIE, Y.-Q.; GAO, M.; ZHAO, Y.; FRANCO, F.; WENES, M.; SIDDIQUI, I.; BEVILACQUA, A.; WANG, H.; YANG, H.; FENG, B.; XIE, X.; SABATEL, C. M.; TSCHUMI, B.; CHAIBOONCHOE, A.; WANG, Y.; LI, W.; XIAO, W.; HELD, W.; ... TANG, L. (2021). Metabolic Reprogramming of Terminally Exhausted CD8+ T cells by IL-10 Enhances Anti-Tumor Immunity. *Nature immunology*, 22(6), 746-756. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00940-2>
- HOSSAIN, M. A.; LIU, G.; DAI, B.; SI, Y.; YANG, Q.; WAZIR, J.; BIRNBAUMER, L.; & YANG, Y. (2021). Reinvigorating exhausted CD8+ cytotoxic T lymphocytes in the tumor microenvironment and current strategies in cancer immunotherapy. *Medicinal Research Reviews*, 41(1), 156-201. <https://doi.org/10.1002/med.21727>
- HUI, E.; CHEUNG, J.; ZHU, J.; SU, X.; TAYLOR, M. J.; WALLWEBER, H. A.; SASMAL, D. K.; HUANG, J.; KIM, J. M.; MELLMAN, I.; & VALE, R. D. (2017). T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science*, 355(6332), 1428-1433. <https://doi.org/10.1126/science.aaf1292>
- KAECH, S. M.; & CUI, W. (2012). Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nature Reviews Immunology*, 12(11), 749-761. <https://doi.org/10.1038/nri3307>
- KALINSKI, P. (2012). Regulation of Immune Responses by Prostaglandin E2. *The Journal of Immunology*, 188(1), 21-28. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101029>
- KIDANI, Y.; ELSAESSER, H.; HOCK, M. B.; VERGNES, L.; WILLIAMS, K. J.; ARGUS, J. P.; MARBOIS, B. N.; KOMISOPOULOU, E.; WILSON, E. B.; OSBORNE, T. F.; GRAEBER, T. G.; REUE, K.; BROOKS, D. G.; & BENSINGER, S. J. (2013). Sterol regulatory element-binding proteins are essential for the metabolic programming of effector T cells and adaptive immunity. *Nature Immunology*, 14(5), 489-499. <https://doi.org/10.1038/ni.2570>
- KURACHI, M. (2019). CD8+ T cell exhaustion. *Seminars in Immunopathology*, 41(3), 327-337. <https://doi.org/10.1007/s00281-019-00744-5>
- LARKIN, J.; CHIARION-SILENI, V.; GONZALEZ, R.; GROB, J. J.; COWEY, C. L.; LAO, C. D.; SCHADENDORF, D.; DUMMER, R.; SMYLYE, M.; RUTKOWSKI, P.; FERRUCCI, P. F.; HILL, A.; WAGSTAFF, J.; CARLINO, M. S.; HAANEN, J. B.; MAIO, M.; MARQUEZ-RODAS, I.; MCARTHUR, G. A.; ASCIERTO, P. A.; ... WOLCHOK, J. D. (2015). Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 373(1), 23-34. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1504030>
- LOU, W.; GONG, C.; YE, Z.; HU, Y.; ZHU, M.; FANG, Z.; & XU, H. (2022). Lipid metabolic features of T cells in the Tumor Microenvironment. *Lipids in Health and Disease*, 21(1), 94. <https://doi.org/10.1186/s12944-022-01705-y>
- 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/s40425-019-0814-7>
- MACIVER, N. J.; JACOBS, S. R.; WIEMAN, H. L.; WOFFORD, J. A.; COLOFF, J. L.; & RATHMELL, J. C. (2008). Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. *Journal of Leukocyte Biology*, 84(4), 949-957. <https://doi.org/10.1189/jlb.0108024>

- MAHONEY, K. M.; RENNERT, P. D.; & FREEMAN, G. J. (2015). Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 14(8), 561-584. <https://doi.org/10.1038/nrd4591>
- MAN, K.; MIASARI, M.; SHI, W.; XIN, A.; HENSTRIDGE, D. C.; PRESTON, S.; PELLEGRINI, M.; BELZ, G. T.; SMYTH, G. K.; FEBBRAIO, M. A.; NUTT, S. L.; & KALLIES, A. (2013). The transcription factor IRF4 is essential for TCR affinity-mediated metabolic programming and clonal expansion of T cells. *Nature Immunology*, 14(11), 1155-1165. <https://doi.org/10.1038/ni.2710>
- MCLANE, L. M.; ABDEL-HAKEEM, M. S.; & WHERRY, E. J. (2019). CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. *Annual Review of Immunology*, 37(1), 457-495. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-041015-055318>
- MILLER, B. C.; SEN, D. R.; AL ABOSY, R.; BI, K.; VIRKUD, Y. V.; LAFLEUR, M. W.; YATES, K. B.; LAKO, A.; FELT, K.; NAIK, G. S.; MANOS, M.; GJINI, E.; KUCHROO, J. R.; ISHIZUKA, J. J.; COLLIER, J. L.; GRIFFIN, G. K.; MALERI, S.; COMSTOCK, D. E.; WEISS, S. A.; ... HAINING, W. N. (2019). Subsets of exhausted CD8+ T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *Nature Immunology*, 20(3), 326-336. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0312-6>
- MITTRÜCKER, H.-W.; VISEKRUNA, A.; & HUBER, M. (2014). Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8+ T Cells. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 62(6), 449-458. <https://doi.org/10.1007/s00005-014-0293-y>
- O'CONNOR, R. S.; GUO, L.; GHASSEMI, S.; SNYDER, N. W.; WORTH, A. J.; WENG, L.; KAM, Y.; PHILIPSON, B.; TREFELY, S.; NUNEZ-CRUZ, S.; BLAIR, I. A.; JUNE, C. H.; & MILONE, M. C. (2018). The CPT1a inhibitor, etomoxir induces severe oxidative stress at commonly used concentrations. *Scientific Reports*, 8(1), 6289. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24676-6>
- ODORIZZI, P. M.; PAUKEN, K. E.; PALEY, M. A.; SHARPE, A.; & WHERRY, E. J. (2015). Genetic absence of PD-1 promotes accumulation of terminally differentiated exhausted CD8+ T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 212(7), 1125-1137. <https://doi.org/10.1084/jem.20142237>
- PALEY, M. A.; KROY, D. C.; ODORIZZI, P. M.; JOHNNIDIS, J. B.; DOLFI, D. V.; BARNETT, B. E.; BIKOFF, E. K.; ROBERTSON, E. J.; LAUER, G. M.; REINER, S. L.; & WHERRY, E. J. (2012). Progenitor and Terminal Subsets of CD8+ T Cells Cooperate to Contain Chronic Viral Infection. *Science*, 338(6111), 1220-1225. <https://doi.org/10.1126/science.1229620>
- PALLET, L. J.; SCHMIDT, N.; & SCHURICH, A. (2019). T cell metabolism in chronic viral infection. *Clinical and Experimental Immunology*, 197(2), 143-152. <https://doi.org/10.1111/cei.13308>
- PATSOUKIS, N.; BARDHAN, K.; CHATTERJEE, P.; SARI, D.; LIU, B.; BELL, L. N.; KAROLY, E. D.; FREEMAN, G. J.; PETKOVA, V.; SETH, P.; LI, L.; & BOUSSIOTIS, V. A. (2015). PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nature Communications*, 6(1), 6692. <https://doi.org/10.1038/ncomms7692>
- PAUKEN, K. E.; SAMMONS, M. A.; ODORIZZI, P. M.; MANNE, S.; GODEC, J.; KHAN, O.; DRAKE, A. M.; CHEN, Z.; SEN, D. R.; KURACHI, M.; BARNITZ, R. A.; BARTMAN, C.; BENGSCHE, B.; HUANG, A. C.; SCHENKEL, J. M.; VAHEDI, G.; HAINING, W. N.; BERGER, S. L.; & WHERRY, E. J. (2016). Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade. *Science*, 354(6316), 1160-1165. <https://doi.org/10.1126/science.aaf2807>
- PHILIP, M.; FAIRCHILD, L.; SUN, L.; HORSTE, E. L.; CAMARA, S.; SHAKIBA, M.; SCOTT, A. C.; VIALE, A.; LAUER, P.; MERGHOUB, T.; HELLMANN, M. D.; WOLCHOK, J. D.; LESLIE, C. S.; & SCHIETINGER, A. (2017). Chromatin states define tumour-specific T cell dysfunction and reprogramming. *Nature*, 545(7655), 452-456. <https://doi.org/10.1038/nature22367>
- REINA-CAMPOS, M.; SCHARPING, N. E.; & GOLDRATH, A. W. (2021). CD8+ T cell metabolism in infection and cancer. *Nature reviews. Immunology*, 21(11), 718-738. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00537-8>
- RUTISHAUSER, R. L.; MARTINS, G. A.; KALACHIKOV, S.; CHANDELE, A.; PARISH, I. A.; MEFFRE, E.; JACOB, J.; CALAME, K.; & KAECH, S. M. (2009). Blimp-1 promotes terminal differentiation of virus-specific CD8 T cells and represses the acquisition of central memory T cell properties. *Immunity*, 31(2), 296-308. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.05.014>
- SAEIDI, A.; ZANDI, K.; CHEOK, Y. Y.; SAEIDI, H.; WONG, W. F.; LEE, C. Y. Q.; CHEONG, H. C.; YONG, Y. K.; LARSSON, M.; & SHANKAR, E. M. (2018). T-Cell Exhaustion in Chronic Infections: Reversing the State of Exhaustion and Reinvigorating Optimal Protective Immune Responses. *Frontiers in Immunology*, 9, 2569. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02569>
- SCHLAEPFER, I. R.; RIDER, L.; RODRIGUES, L. U.; GIJÓN, M. A.; PAC, C. T.; ROMERO, L.; CIMIC, A.; SIRINTRAPUN, S. J.; GLODÉ, L. M.; ECKEL, R. H.; & CRAMER, S. D. (2014). Lipid catabolism via CPT1 as a therapeutic target for prostate cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(10), 2361-2371. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0183>
- SCOTT, A. C.; DÜNDAR, F.; ZUMBO, P.; CHANDRAN, S. S.; KLEBANOFF, C. A.; SHAKIBA, M.; TRIVEDI, P.; MENOCA, L.; APPLEBY, H.; CAMARA, S.; ZAMARIN, D.; WALTHER, T.; SNYDER, A.; FEMIA, M. R.; COMEN, E. A.; WEN, H. Y.; HELLMANN, M. D.; ANANDASABAPATHY, N.; LIU, Y.; ... SCHIETINGER, A. (2019). TOX is a critical regulator of tumour-specific T cell differentiation. *Nature*, 571(7764), 270-274. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1324-y>
- SEARS, J. D.; WALDRON, K. J.; WEI, J.; & CHANG, C.-H. (2021). Targeting metabolism to reverse T-cell exhaustion in chronic viral infections. *Immunology*, 162(2), 135-144. <https://doi.org/10.1111/imm.13238>
- SEN, D. R.; KAMINSKI, J.; BARNITZ, R. A.; KURACHI, M.; GERDEMANN, U.; YATES, K. B.; TSAO, H.-W.; GODEC, J.; LAFLEUR, M. W.; BROWN, F. D.; TONNERRE, P.; CHUNG, R. T.; TULLY, D. C.; ALLEN, T. M.; FRAHM, N.; LAUER, G. M.; WHERRY, E. J.; YOSEF, N.; & HAINING, W. N.

- (2016). The epigenetic landscape of T cell exhaustion. *Science (New York, N.Y.)*, 354(6316), 1165-1169. <https://doi.org/10.1126/science.aae0491>
- SHIN, H.; BLACKBURN, S. D.; BLATTMAN, J. N.; & WHERRY, E. J. (2007). Viral antigen and extensive division maintain virus-specific CD8 T cells during chronic infection. *Journal of Experimental Medicine*, 204(4), 941-949. <https://doi.org/10.1084/jem.20061937>
- SHIN, H.; BLACKBURN, S. D.; INTLEKOFER, A. M.; KAO, C.; ANGELOSANTO, J. M.; REINER, S. L.; & WHERRY, E. J. (2009). A role for the transcriptional repressor Blimp-1 in CD8 T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity*, 31(2), 309-320. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.06.019>
- SMOLINA, N.; BRUTON, J.; KOSTAREVA, A.; & SEJERSEN, T. (2017). Assaying Mitochondrial Respiration as an Indicator of Cellular Metabolism and Fitness. En D. F. Gilbert & O. Friedrich (Eds.), *Cell Viability Assays: Methods and Protocols* (pp. 79-87). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_7
- SNAEBJORNSSON, M. T.; JANAKI-RAMAN, S.; & SCHULZE, A. (2020). Greasing the Wheels of the Cancer Machine: The Role of Lipid Metabolism in Cancer. *Cell Metabolism*, 31(1), 62-76. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.11.010>
- STELEKATI, E.; SHIN, H.; DOERING, T. A.; DOLFI, D. V.; ZIEGLER, C. G.; BEITING, D. P.; DAWSON, L.; LIBOON, J.; WOLSKI, D.; ALI, M.-A. A.; KATSIKIS, P. D.; SHEN, H.; ROOS, D. S.; HAINING, W. N.; LAUER, G. M.; & WHERRY, E. J. (2014). Bystander Chronic Infection Negatively Impacts Development of CD8+ T Cell Memory. *Immunity*, 40(5), 801-813. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.010>
- 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. R. 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>
- VEIGA-PARGA, T.; SEHRAWAT, S.; & ROUSE, B. T. (2013). Role of regulatory T cells during virus infection. *Immunological Reviews*, 255(1), 182-196. <https://doi.org/10.1111/imr.12085>
- VERDON, D. J.; MULAZZANI, M.; & JENKINS, M. R. (2020). Cellular and Molecular Mechanisms of CD8+ T Cell Differentiation, Dysfunction and Exhaustion. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7357. <https://doi.org/10.3390/ijms21197357>
- VESELY, M. D.; ZHANG, T.; & CHEN, L. (2022). Resistance Mechanisms to Anti-PD Cancer Immunotherapy. *Annual Review of Immunology*, 40(1), 45-74. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-070621-030155>
- WHERRY, E. J.; BLATTMAN, J. N.; MURALI-KRISHNA, K.; VAN DER MOST, R.; & AHMED, R. (2003). Viral Persistence Alters CD8 T-Cell Immunodominance and Tissue Distribution and Results in Distinct Stages of Functional Impairment. *Journal of Virology*, 77(8), 4911-4927. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.8.4911-4927.2003>
- WHERRY, E. J.; HA, S.-J.; KAECH, S. M.; HAINING, W. N.; SARKAR, S.; KALIA, V.; SUBRAMANIAM, S.; BLATTMAN, J. N.; BARBER, D. L.; & AHMED, R. (2007). Molecular Signature of CD8+ T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection. *Immunity*, 27(4), 670-684. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.09.006>
- WHERRY, E. J.; & KURACHI, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature Reviews Immunology*, 15(8), 486-499. <https://doi.org/10.1038/nri3862>
- WIK, J. A.; & SKÅLHEGG, B. S. (2022). T Cell Metabolism in Infection. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.840610>
- WU, D.; & CHEN, Y. (2022). Lipids for CD8+ TILs: Beneficial or harmful? *Frontiers in Immunology*, 13, 1020422. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1020422>
- WU, T.; JI, Y.; MOSEMAN, E. A.; XU, H. C.; MANGLANI, M.; KIRBY, M.; ANDERSON, S. M.; HANDON, R.; KENYON, E.; ELKAHLOUN, A.; WU, W.; LANG, P. A.; GATTINONI, L.; MCGAVERN, D. B.; & SCHWARTZBERG, P. L. (2016). The TCF1-Bcl6 axis counteracts type I interferon to repress exhaustion and maintain T cell stemness. *Science Immunology*, 1(6), eaai8593. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aai8593>
- XU, S.; CHAUDHARY, O.; RODRÍGUEZ-MORALES, P.; SUN, X.; CHEN, D.; ZAPPASODI, R.; XU, Z.; PINTO, A. F. M.; WILLIAMS, A.; SCHULZE, I.; FARSAKOGLU, Y.; VARANASI, S. K.; LOW, J. S.; TANG, W.; WANG, H.; MCDONALD, B.; TRIPPLE, V.; DOWNES, M.; EVANS, R. M.; ... KAECH, S. M. (2021). Uptake of oxidized lipids by the scavenger receptor CD36 promotes lipid peroxidation and dysfunction in CD8+ T cells in tumors. *Immunity*, 54(7), 1561-1577.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.05.003>
- YU, W.; LEI, Q.; YANG, L.; QIN, G.; LIU, S.; WANG, D.; PING, Y.; & ZHANG, Y. (2021). Contradictory roles of lipid metabolism in immune response within the tumor microenvironment. *Journal of Hematology & Oncology*, 14(1), 187. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01200-4>
- ZHANG, Z.; CHEN, L.; LIU, L.; SU, X.; & RABINOWITZ, J. D. (2017). Chemical Basis for Deuterium Labeling of Fat and NADPH. *Journal of the American Chemical Society*, 139(41), 14368-14371. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b08012>
- ZHENG, K.; ZHENG, X.; & YANG, W. (2022). The Role of Metabolic Dysfunction in T-Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.843242>

7. ANEXO

Tabla S1. Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No Proced e
ODS 1. Fin de la pobreza.				X
ODS 2. Hambre cero.				X
ODS 3. Salud y bienestar.	X			
ODS 4. Educación de calidad.				X
ODS 5. Igualdad de género.				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.	X			
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				X
ODS 12. Producción y consumo responsables.				X
ODS 13. Acción por el clima.				X
ODS 14. Vida submarina.				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.				X
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.	X			

Descripción de la alineación del TFG con los ODS con un grado de relación más alto

El estudio de los linfocitos exhaustos se relaciona con varios Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030 de las Naciones Unidas, que buscan trazar un plan para lograr un futuro mejor y más sostenible para todos.

En primer lugar, el estudio de los linfocitos exhaustos está estrechamente vinculado al ODS 3: "Salud y bienestar". Este objetivo se centra en garantizar una vida saludable y promover el bienestar para todas las personas en todas las edades. Los linfocitos exhaustos son un área de investigación crucial para comprender las respuestas inmunitarias disfuncionales en diversas enfermedades, como el cáncer y las enfermedades autoinmunes. Al entender los mecanismos que llevan al agotamiento de los linfocitos y su impacto en la salud, se pueden desarrollar estrategias terapéuticas más efectivas y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Además, el estudio de los linfocitos exhaustos se relaciona con el ODS 9: "Industria, innovación e infraestructura". Este objetivo busca fomentar la innovación y desarrollar infraestructuras sostenibles. En el ámbito de la investigación de los linfocitos exhaustos, se están llevando a cabo avances tecnológicos y científicos para comprender mejor su función y encontrar nuevas formas de reactivar su

respuesta inmunitaria. Esto implica el desarrollo de técnicas de secuenciación de alta resolución, análisis de citometría de flujo y estudios de expresión génica, entre otros. Estas innovaciones contribuyen al avance del conocimiento y pueden conducir a terapias más efectivas en el futuro.

Además, el estudio de los linfocitos exhaustos puede relacionarse con el ODS 17: "Alianzas para lograr los objetivos". La investigación en este campo requiere la colaboración de científicos, médicos, instituciones académicas, organizaciones de salud y la industria farmacéutica. Al trabajar juntos y compartir conocimientos, recursos y tecnologías, se pueden realizar avances significativos en la comprensión y el tratamiento de los linfocitos exhaustos. Esta colaboración entre diferentes actores es esencial para abordar los desafíos complejos asociados con las enfermedades relacionadas con los linfocitos exhaustos y lograr avances científicos y médicos significativos.

Estos ODS abordan aspectos clave de la investigación y la atención médica relacionados con los linfocitos exhaustos, y su cumplimiento contribuirá a mejorar la salud y el bienestar de las personas, así como a promover la innovación y la colaboración en el campo de la inmunología.

Tabla S2. Genes analizados utilizados en el ensayo de expresión por qPCR.

Gen	Descripción
RPLP0	Proteína ribosomal P0
PD-1	Proteína de muerte celular programada 1
LAG-3	Gen 3 de activación de linfocitos
TIM-3	Proteína 3 de dominio de inmunoglobulina y mucina de células T
CTLA4-4	Antígeno de linfocitos T citotóxicos asociado a proteína 4
TOX	Factor de transcripción TOX
BLIMP-1	Factor de transcripción inhibidor de linaje de células B y plasmacitos
CD36	Cluster de diferenciación 36
FABP-4	Proteína de unión a ácidos grasos tipo 4
FABP-5	Proteína de unión a ácidos grasos tipo 5
FASN	Sintasa de ácidos grasos
SCD	Desaturasa de ácidos grasos
G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
DGAT1	Acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa 1
DGAT2	Acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa 2
FATP2	Transportador de ácidos grasos tipo 2
SREBP-1C	Proteína reguladora de la expresión de genes de unión a elementos reguladores de esteroides 1C
FASL	Ligando de FAS
ACACA	Acetil-CoA carboxilasa alfa
ACACB	Acetil-CoA carboxilasa beta
CDS1	Sintasa de diacilglicerol
CPT1A	Carnitina palmitoiltransferasa 1A
AOX1	Oxidasa alternativa 1

Tabla S3. Cálculos promedio de los parámetros del Seahorse fitness assay del donante D110.

Grupos	Tasa de producción de mitoATP inducida (pmol/min/Células)		Tasa de producción de glicolicoATP inducida (pmol/min/Células)		Tasa de producción de ATP inducida (pmol/min/células)		% de glicólisis inducida	
	Valor	Desv estándar	Valor	Desv estándar	Valor	Desv estándar	Valor	Desv estándar
D110 CD8 STIM 10mM GLUC-ETO	324.08	23.45	233.03	15.58	557.10	31.69	41.85	2.01
D110 CD8 STIM 10mM GLUC +ETO	147.10	19.87	124.83	10.15	271.93	28.40	46.04	2.28
D110 CD8 STIM 0,1 mM GLUC-ETO	240.23	62.82	35.84	8.56	276.07	70.09	13.11	1.42
D110 CD8 STIM 0,1 mM GLUC + ETO	210.77	27.30	40.39	12.06	251.16	36.67	15.92	2.71
D110 CD8 EXH 10mM GLUC -ETO	126.38	35.13	112.96	21.41	239.34	55.05	47.59	3.46
D110 CD8 EXH 10mM GLUC +ETO	106.20	27.15	137.77	18.54	243.97	42.94	56.94	4.37
D110 CD8 ESC 0,1 mM GLUC-ETO	145.74	23.56	27.58	4.34	173.32	27.01	15.96	1.51
D110 CD8 EXH 0,1 mM GLUC + ETO	291.88	74.68	58.24	10.13	350.12	79.59	17.13	3.58