

Modulación del metabolismo de linfocitos CAR T: mejoramiento de su capacidad
citotóxica *in vitro*

Brian Mauricio Alfonso Díaz

Trabajo de Grado para Optar el Título de magíster en Ciencias Básicas Biomédicas

Director

Bladimiro Rincón Orozco

Doctor en Ciencias Biológicas

Codirector

Mario Felipe Negrette Guzmán

Doctor en Ciencias Bioquímicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Medicina

Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas

Bucaramanga

2026

Dedicatoria

A mi esposa, Maira, por ser mi soporte inquebrantable. Gracias por levantarme cada vez que caí y por tener fe en mí cuando yo mismo la perdí en los momentos más oscuros. Este logro es tanto tuyo como mío, porque tu confianza sostuvo mis pasos.

A mi madre, mi refugio eterno. Gracias por recibirme siempre tras cada batalla perdida, por sanar mis heridas y por inyectarme el ánimo necesario para volver a levantarme y seguir luchando. Sin tu aliento, no habría llegado hasta aquí.

A mi hermana, aunque me he equivocado una y otra vez, espero que mi camino, con sus aciertos y tropiezos, pueda servirte de guía para el futuro. Caminar delante de ti como hermano mayor me da la fuerza para enfrentar cualquier desafío.

A mi tío Alfredo, gracias por motivarme desde pequeño a esforzarme cada vez más. Tus consejos y tus historias despertaron en mí la curiosidad por comprender el mundo y sembraron las primeras semillas de este camino en la ciencia. Tu apoyo fue clave para que nunca dejara de avanzar.

Y a mi héroe, mi nono Álvaro, el hombre más importante de mi vida. Gracias por enseñarme, con tu ejemplo, que todo sacrificio tiene su recompensa y que la verdadera victoria pertenece a quienes están dispuestos a seguir luchando. Tu legado de fortaleza vive en cada página de este trabajo.

Agradecimientos

Al profesor Bladimiro Rincón, mi más sincero agradecimiento por haberme recibido en su equipo y acompañarme durante estos tres años de arduo trabajo. Gracias a su guía constante, exigencia académica y confianza, logré consolidar una madurez científica y personal que valoro profundamente.

Un reconocimiento especial a los profesores Mario Negrette y Leidy Rueda, maestros que encontré en el camino y cuyas enseñanzas marcaron una diferencia sustancial en mi formación, permitiéndome dar pasos agigantados tanto en el ámbito profesional como en el humano.

Al doctor Carlos Nieto, gracias por su guía paciente y generosa, especialmente en aquellos temas en los que aún me encuentro en proceso de consolidación; su acompañamiento fue clave para fortalecer mis bases y avanzar con mayor seguridad.

Al Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e Innovación en Salud (IDCBIS), mi gratitud por el entrenamiento brindado y por el envío del constructo lentiviral que hizo posible la realización de este trabajo de grado. Su respaldo técnico y científico fue un pilar fundamental para alcanzar los objetivos propuestos.

A mis amigos Raphael Martinou, CEO de MPC Therapeutics, y Mathias Wenes, profesor de la Universidad de Ginebra, mi gratitud por el apoyo constante, las valiosas colaboraciones y el enriquecedor intercambio de ideas que ampliaron mi perspectiva científica.

Y a mi segunda casa, el Laboratorio GEMEICA, gracias a cada uno de sus integrantes por ser esa mano amiga permanente. Aprecio infinitamente el conocimiento compartido y, sobre todo, el respaldo humano que me brindaron en los momentos más desafiantes. Sin duda, este trabajo también les pertenece.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	14
1. Objetivos	21
1.1 Objetivo General	21
1.2 Objetivos Específicos	21
2. Marco Teórico	22
2.1 Metformina	23
2.1.1 UK-5099	23
2.2 Terapia celular adoptiva (TCA)	25
2.2.1 PBMC	25
2.2.1.1 Células CAR T	26
2.2.1.1.1 Avances en el diseño de la terapia CAR T	27
2.2.2.1.1 CAR-T de cuarta generación y modulación del microambiente	30
2.2.2.2.1 Terapia CAR T en neoplasias hematológicas	32
3. Métodos	33
3.1 Tipo de Estudio	34
3.1.1 Tamaño Muestral	34
3.2 Desarrollo metodológico del primer objetivo específico	34
3.2.1 Líneas celulares	34
3.2.1.1 Aislamiento de PBMC y subpoblación de células T	35
3.2.1.1.1 Aislamiento de linfocitos T CD3 ⁺ mediante selección negativa	36
3.2.2.1.1 Evaluación de viabilidad y recuento celular	37

3.2.2.2.1 Transducción de linfocitos T con vector lentiviral anti-CD19	37
3.2.2.2.2 Establecimiento de los grupos experimentales y modulación metabólica	38
3.3.1.1.1 Inmunofenotipo de CAR-T	41
3.4 Desarrollo metodológico del segundo objetivo específico	42
3.4.1 Extracción de ARN	42
3.4.1.1 Retrotranscripción	43
3.4.1.1.1 Confirmación integridad del ARN	44
3.4.2 PCR digital en gotas (ddPCR)	45
3.4.2.1 Procesamiento de datos y normalización	47
3.5 Desarrollo metodológico del tercer objetivo específico	48
3.5.1.1 Inmunofenotipo de CAR-T luego de re-estimulación	48
3.5.1.1 Adquisición y análisis de datos	49
3.5.1.1.1 ddPCR de puntos de control inhibitorio	50
4. Resultados	50
4.1 Fase I: Producción y Caracterización Fenotípica de Células CAR-T	51
4.1.1 Obtención de Material Biológico Primario	51
4.2. Ingeniería Genética y Manufactura Celular	54
4.3. Caracterización Inmunofenotípica de linfocitos T purificados y linfocitos CAR T anti-CD19	55
4.4 Fase II: Análisis Molecular del Perfil Metabólico	63
4.4.1 Validación de la Calidad del Material Genético	63
4.4.1.1 Cuantificación Absoluta de la Expresión Génica	64
4.5 Fase III: Evaluación Funcional y Potencial Citotóxico	66

4.5.1 Capacidad Citotóxica Postestímulo	66
4.5.1.1 Modulación del perfil de agotamiento inmunológico y expresión de receptores inhibitorios.....	73
5. Discusión.....	76
6. Conclusiones	86
7. Recomendaciones	87
Referencias Bibliográficas	89

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. <i>Terapias CAR-T aprobadas por la FDA para neoplasias hematológicas.</i>	33
Tabla 2. <i>Programa de retrotranscripción.</i>	43
Tabla 3. <i>Componentes de la PCR punto final.</i>	44
Tabla 4. <i>Programa de amplificación de PCR punto final.</i>	45
Tabla 5. <i>Genes escogidos para medir expresión de diferentes vías metabólicas.</i>	46
Tabla 6. <i>Componentes de la ddPCR de Linfocitos CAR T.</i>	47
Tabla 7. <i>Programa de amplificación de la ddPCR de genes seleccionados.</i>	47

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. <i>Tecnologías de linfocitos CAR T de nueva generación. Tomado de: (Alsaieedi & Zaher, 2025).</i>	31
Figura 2. <i>Establecimiento de la modulación metabólica en linfocitos T purificados.</i>	39
Figura 3. <i>Establecimiento de la modulación metabólica en linfocitos CAR T.</i>	40
Figura 4. <i>Morfología de linfocitos T purificados del participante 4.</i>	52
Figura 5. <i>Eficiencia del aislamiento de linfocitos T purificados y porcentaje de células que expresaron el CAR CD19 41BB del participante 4.</i>	53
Figura 6. <i>Activación in vitro de linfocitos T mediante microesferas magnéticas anti-CD3/CD28.</i>	54
Figura 7. <i>Inmunofenotipo de linfocitos T purificados del Participante 1 visualizado mediante UMAP.</i>	56
Figura 8. <i>Inmunofenotipo de linfocitos T purificados del participante 2 visualizado mediante UMAP.</i>	57
Figura 9. <i>Inmunofenotipo de linfocitos CAR T anti-CD19 del participante 3 visualizado mediante UMAP.</i>	58
Figura 10. <i>Inmunofenotipo de linfocitos CAR T anti-CD19 del participante 4 visualizado mediante UMAP.</i>	59
Figura 11. <i>Resumen esquemático del inmunofenotipo de linfocitos T y CAR T anti-CD19 CD4⁺ y CD8⁺ tras la modulación metabólica.</i>	61

Figura 12. Validación de la especificidad de los cebadores y control de contaminación de ADN genómico mediante PCR de punto final.....	63
Figura 13. Perfil de expresión génica metabólica en linfocitos T purificados y linfocitos CAR T anti-CD19.	65
Figura 14. Perfil de secreción de citoquinas en linfocitos T CD4+ de los participantes uno y dos, sometidos a modulación metabólica in vitro.	67
Figura 15. Perfil de secreción de citoquinas en linfocitos T CD8+ de los participantes uno y dos, sometidos a modulación metabólica in vitro.	68
Figura 16. Perfil de secreción de citoquinas en linfocitos CAR T anti-CD19 CD4+ de los participantes tres y cuatro, sometidos a modulación metabólica in vitro.	69
Figura 17. Perfil de secreción de citoquinas en linfocitos CAR T anti-CD19 CD8+ de los participantes tres y cuatro, sometidos a modulación metabólica in vitro.	70
Figura 18. Dinámica de secreción de citoquinas en subpoblaciones T CD4+ tras la reprogramación metabólica.....	71
Figura 19. Dinámica de secreción de citoquinas en subpoblaciones T CD8+ tras la reprogramación metabólica.....	72
Figura 20. Modulación de la expresión de receptores inhibitorios asociados al agotamiento inmunológico en linfocitos T purificados y linfocitos CAR T anti-CD19 luego de modulación metabólica, participante uno.	74
Figura 21. Esquema del impacto de la modulación inmunometabólica durante la manufactura de linfocitos CAR T anti-CD19.....	75

Lista de Apéndices

Apéndice A: Carta Aval Comité de Ética.

Apéndice B: Consentimiento Informado.

Apéndice C: Control de calidad: Evaluación de viabilidad y recuento celular automatizado.

“Los apéndices están adjuntos y puede visualizarlos en la base de datos de la biblioteca UIS”

Glosario

Agotamiento celular: Estado de disfunción progresiva de los linfocitos T inducido por la estimulación antigénica crónica, común en el microambiente tumoral. Se caracteriza por la pérdida de capacidades efectoras (como la citotoxicidad y producción de citoquinas), alteraciones metabólicas y la sobreexpresión sostenida de receptores inhibidores como PD-1, TIM-3 y LAG-3.

Antígeno CD19: Glicoproteína transmembrana de 95 kDa expresada en la superficie de las células de linaje B, desde etapas tempranas de desarrollo hasta la diferenciación terminal. Es el blanco terapéutico principal de las células CAR T en el tratamiento de leucemias de células B y linfomas.

Células CAR T: Linfocitos T modificados genéticamente ex vivo para expresar un receptor sintético que redirige su especificidad hacia un antígeno tumoral. Combinan la capacidad de reconocimiento de un anticuerpo con la potencia lítica de una célula T.

Citometría de flujo espectral: Tecnología avanzada de análisis celular que captura el espectro completo de emisión de los fluorocromos mediante múltiples detectores y prismas de dispersión, permitiendo la separación de fluorocromos con espectros solapados y la sustracción de la autofluorescencia celular con alta resolución.

ddPCR (del inglés Droplet Digital PCR): Técnica de PCR digital de tercera generación que fracciona la muestra en miles de microgotas de agua en aceite. Permite la cuantificación absoluta de ácidos nucleicos sin necesidad de curvas estándar, utilizada aquí para medir copias de transgenes y expresión génica con alta precisión.

Efecto Warburg: Fenómeno metabólico característico de células tumorales y linfocitos T efectores activados, consistente en la preferencia por la glucólisis aerobia (fermentación de glucosa a lactato) incluso en presencia de oxígeno suficiente, para soportar la biosíntesis rápida de macromoléculas.

Expansión ex vivo: Proceso de cultivo celular en laboratorio destinado a aumentar numéricamente la población de linfocitos T antes de su infusión, generalmente estimulados con anticuerpos anti-CD3/CD28 y citoquinas como IL-2.

Fosforilación Oxidativa: Vía metabólica mitocondrial altamente eficiente para la producción de ATP mediante la cadena de transporte de electrones. En células T, un perfil metabólico sesgado hacia OXPHOS y la oxidación de ácidos grasos se asocia con fenotipos de memoria y mayor persistencia *in vivo*.

Inmunofenotipificación: Técnica que utiliza anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos para identificar y cuantificar poblaciones celulares específicas basándose en la expresión de proteínas de superficie (marcadores CD).

Lentivirus: Género de retrovirus utilizado como vector para la transducción génica. Tienen la capacidad de integrar su material genético de manera estable en el genoma de células en división y no división, asegurando la expresión del CAR a largo plazo.

Metformina: Fármaco biguanida utilizado convencionalmente para la diabetes tipo 2. En el contexto de esta tesis, se emplea como agente inmunomodulador capaz de activar la vía AMPK e inhibir mTOR, promoviendo un cambio metabólico hacia la oxidación de ácidos grasos y la formación de células de memoria.

Microambiente Tumoral: Entorno celular y molecular complejo que rodea al tumor, caracterizado por hipoxia, depleción de nutrientes y presencia de señales inmunosupresoras que limitan la eficacia de las terapias celulares.

PBMC (del inglés Peripheral Blood Mononuclear Cells): Fracción celular de la sangre compuesta por linfocitos (T, B, NK) y monocitos, aislada mediante gradiente de densidad, que sirve como materia prima para la manufactura de células CAR T.

Puntos de control inmunitario: Receptores de superficie (como PD-1 o CTLA-4) que actúan como "frenos" del sistema inmune para prevenir la autoinmunidad. En el cáncer, su activación excesiva conduce al agotamiento de las células T.

scFv (del inglés Single-Chain Variable Fragment): Fragmento variable de cadena única derivado de un anticuerpo monoclonal. Constituye el dominio extracelular del CAR responsable del reconocimiento y unión específica al antígeno tumoral.

Transducción: Proceso mediante el cual se introduce material genético exógeno (el gen del CAR) en una célula utilizando un vector viral.

UK5099: Inhibidor farmacológico específico del transportador mitocondrial de piruvato (MPC) (del inglés mitochondrial pyruvate carrier). Se utiliza experimentalmente para bloquear la entrada de piruvato a la mitocondria, forzando a la célula a utilizar rutas metabólicas alternativas como la oxidación de ácidos grasos.

UMAP (del inglés Uniform Manifold Approximation and Projection): Algoritmo de reducción de dimensionalidad no lineal utilizado en bioinformática para visualizar datos de alta complejidad (como paneles de citometría multiparamétrica) en un espacio bidimensional, preservando la estructura global y local de los datos.

Resumen

Título: Modulación del metabolismo de linfocitos CAR T: mejoramiento de su capacidad citotóxica *in vitro*

Autor: Brian Mauricio Alfonso Díaz

Palabras Clave: Inmunoterapia Adoptiva, Terapia CAR-T, Sistema Inmunológico.

Descripción: Las terapias con linfocitos CAR T anti-CD19 han transformado el tratamiento de diversas neoplasias hematológicas; sin embargo, su eficacia a largo plazo puede verse limitada por la diferenciación terminal y el agotamiento celular durante la expansión *ex vivo*. Por ello, la modulación inmunometabólica surge como una estrategia prometedora para mejorar la calidad funcional de estos productos celulares. La metformina, un fármaco de uso clínico, puede reprogramar la bioenergética mitocondrial y favorecer la adquisición de fenotipos asociados con memoria. El objetivo de este trabajo fue caracterizar el inmunofenotipo, el perfil metabólico y la capacidad citotóxica *in vitro* de linfocitos CAR T anti-CD19 tratados con metformina. Para ello, se realizó un estudio experimental *in vitro* utilizando linfocitos T purificados y CAR T anti-CD19 tratados con metformina o UK-5099 como control positivo. Asimismo, el inmunofenotipo se caracterizó mediante citometría de flujo espectral, mientras que la expresión absoluta de genes asociados con rutas metabólicas y checkpoints inmunitarios se cuantificó mediante ddPCR. Finalmente, la función efectora se evaluó mediante tinción intracelular de GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , IL-2 y granzima B. Como resultado, la metformina reconfiguró el inmunofenotipo hacia estados menos diferenciados, indujo una firma metabólica compatible con β -oxidación y redujo progresivamente la expresión de PD-1, TIM-3, LAG-3 y CTLA-4. Adicionalmente, se observó un incremento significativo de IL-2 y granzima B en células CD4⁺ y CD8⁺ ($p=0.0209$ y $p=0.0015-0.0039$, respectivamente), acompañado de un aumento controlado de GM-CSF ($p=0.0433-0.0455$) y una modulación de IFN- γ ($p=0.0304-0.0024$). Por su parte, UK-5099 mostró una reprogramación mitocondrial más marcada, evidenciada por incrementos de granzima B y GM-CSF. En conjunto, estos hallazgos indican que la modulación inmunometabólica mediante metformina integra cambios metabólicos, fenotípicos y funcionales, por lo que constituye una estrategia prometedora para optimizar la calidad funcional de los productos CAR T y fortalecer su potencial traslacional.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Salud Escuela de Medicina. Director: Bladimiro Rincón Orozco. Doctor en Ciencias Biológicas. Codirector: Mario Felipe Negrette Guzmán. Doctor en Ciencias Bioquímicas

Abstract

Title: Modulation of CAR T cell metabolism: Enhancement of *in vitro* cytotoxic capacity.

Author: Brian Mauricio Alfonso Díaz

Key Words: Adoptive Immunotherapy, CAR-T Cell Therapy, Immune System.

Description: Anti-CD19 CAR T-cell therapies have revolutionized the treatment of various hematologic malignancies; however, their long-term efficacy may be limited by terminal differentiation and cellular exhaustion during *ex vivo* expansion. Therefore, immunometabolic modulation emerges as a promising strategy to improve the functional quality of these cellular products. Metformin, a clinically used drug, can reprogram mitochondrial bioenergetics and promote the acquisition of memory-associated phenotypes. The objective of this study was to characterize the immunophenotype, metabolic profile, and *in vitro* cytotoxic capacity of anti-CD19 CAR T cells treated with metformin. To this end, an *in vitro* experimental study was conducted using purified T cells and anti-CD19 CAR T cells treated with metformin or UK-5099 as a positive control. Furthermore, the immunophenotype was characterized using spectral flow cytometry, while the absolute expression of genes associated with metabolic pathways and immune checkpoints was quantified by ddPCR. Finally, effector function was assessed by intracellular staining for GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , IL-2, and granzyme B. As a result, metformin shifted the immunophenotype toward less differentiated states, induced a metabolic signature consistent with β -oxidation, and progressively reduced the expression of PD-1, TIM-3, LAG-3, and CTLA-4. Additionally, a significant increase in IL-2 and granzyme B was observed in CD4⁺ and CD8⁺ cells ($p=0.0209$ and $p=0.0015-0.0039$, respectively), accompanied by a controlled increase in GM-CSF ($p=0.0433-0.0455$) and a modulation of IFN- γ ($p=0.0304-0.0024$). UK-5099, on the other hand, showed more pronounced mitochondrial reprogramming, as evidenced by increases in granzyme B and GM-CSF. Taken together, these findings indicate that immunometabolic modulation by metformin integrates metabolic, phenotypic, and functional changes, thereby constituting a promising strategy for optimizing the functional quality of CAR T-cell products and strengthening their translational potential.

* Degree Work

** School of Health, School of Medicine. Advisor: Bladimiro Rincón Orozco, Ph.D. in Biological Sciences. Co-advisor: Mario Felipe Negrette Guzmán, Ph.D. in Biochemical Sciences

Introducción

El cáncer se consolida como la quinta causa principal de muerte en todo el mundo. Se estima que en el año 2020 se registraron 19,3 millones de nuevos diagnósticos y cerca de 10 millones de fallecimientos a nivel global (Sung et al., 2021). Colombia no es ajena a este panorama; de acuerdo con los datos reportados por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer IARC (del inglés International Agency for Research on Cancer), durante el 2020, Colombia experimentó 113.221 casos de cáncer y 54.987 muertes debido a esta enfermedad (IARC, 2020). La mayoría de estos casos se concentraron en la región central del país, incluyendo lugares como Antioquia, los Santanderes y el Distrito Capital de Bogotá (IARC, 2020).

Dentro de esta carga de enfermedad, la leucemia sobresale como el tipo de cáncer hematológico más frecuente en niños, con cerca de 64.566 casos nuevos reportados en 2022 (Bray et al., 2024). Este tipo de neoplasia hematológica está caracterizada por una proliferación descontrolada de células sanguíneas anormales, con la médula ósea como el principal sitio de origen de la enfermedad (Bose & Bandyopadhyay, 2024). Las células neoplásicas leucémicas se expanden aprovechando las células sanas de la médula ósea, lo que provoca un déficit de plaquetas y glóbulos blancos normales, comprometiendo la capacidad del organismo para controlar el sangrado y defenderse de infecciones (Sekeres et al., 2020).

A lo largo del periodo comprendido entre 1990 y 2022, la prevalencia de esta enfermedad se ha mantenido relativamente estable en el contexto global en los países desarrollados (Bray et al., 2024). Sin embargo, al examinar la carga de mortalidad, se evidencia un impacto proporcionalmente mayor en América Latina y el Caribe, con una afectación particular en países en desarrollo como Colombia (Bray et al., 2024).

Las opciones de tratamiento más importantes para la leucemia linfoblástica aguda (LLA) incluyen principalmente esquemas de quimioterapia combinada como el uso de inhibidores de tirosina kinasa en pacientes con LLA positiva para la fusión del gen BCR-ABL1 (cromosoma Filadelfia), trasplante de células progenitoras hematopoyéticas y terapias dirigidas con anticuerpos monoclonales, como blinatumomab que es un anticuerpo biospecífico que dirige linfocitos T contra células B CD19⁺. De manera semejante, inotuzumab ozogamicina es un conjugado anticuerpo-fármaco que se une a CD22 y libera un agente citotóxico dentro de la célula tumoral (Brown et al., 2021). Por otra parte, el régimen Hiper-CVAD incluye los medicamentos ciclofosfamida, sulfato de vincristina, clorhidrato de doxorubicina (Adriamycin) y dexametasona, administrados en dosis fraccionadas más frecuentes para aumentar su intensidad terapéutica (Brown et al., 2021). Este esquema busca maximizar la destrucción de células leucémicas manteniendo la tolerancia del paciente mediante intervalos más cortos y ciclos alternados con fármacos complementarios (Brown et al., 2021). A pesar de los significativos avances en las opciones de tratamiento, especialmente en el contexto de la LLA recidivante, las alternativas disponibles siguen siendo limitadas (Brown et al., 2021).

Por este motivo, los adultos con LLA recidivante, tienen un pronóstico desalentador (Fielding et al., 2007). Los esquemas convencionales de quimioterapia solamente logran inducir una remisión completa en aproximadamente el 18 al 45 % de los casos; sin embargo, la mediana de supervivencia global se mantiene baja, oscilando entre los 3 y 9 meses (Gökbuget et al., 2012). Por esta razón, dentro de las nuevas alternativas terapéuticas, se incluyen la inmunoterapia celular, o terapia celular adoptiva (TCA), que es un enfoque terapéutico que emplea la modificación genética de las células T para expresar un receptor de antígeno quimérico CAR (del inglés chimeric antigen receptor) (Brentjens et al., 2003). El éxito inicial del

tratamiento con células CAR T dirigidas contra CD19 en neoplasias malignas de células B llevó a la aprobación de dos constructos de CAR por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos FDA (del inglés Food and Drug Administration) (Maude et al., 2018; Neelapu et al., 2017). Desde entonces, este campo ha experimentado importantes avances, ampliando sus aplicaciones y mejorando sus enfoques terapéuticos (Jacoby et al., 2019).

A pesar de la amplia variedad de combinaciones y estructuras posibles en el diseño de CAR *in vitro*, los estrictos requisitos para el desarrollo clínico han restringido el número de constructos utilizados en ensayos clínicos avanzados (Jacoby et al., 2019). Actualmente, la mayoría de las células CAR T corresponden a la segunda generación, incorporando CD28 o 4-1BB como dominios coestimuladores, mientras que CD3 ζ proporciona la señal primaria (Imai et al., 2004). La transducción se lleva a cabo mediante retrovirus γ o lentivirus, aplicándose a células mononucleares de sangre periférica PBMC, células T seleccionadas o una subpoblación específica de células T (Brentjens et al., 2007).

El dominio coestimulador es uno de los múltiples componentes del diseño de células CAR T que influyen en su funcionalidad (Imai et al., 2004). Tanto 4-1BB como CD28 han demostrado superioridad respecto a los CAR de primera generación en diversos modelos (Imai et al., 2004). Aunque los CAR basados en CD28 han mostrado una ventaja inicial *in vitro* en la proliferación celular y la producción de citocinas, su persistencia *in vivo* es limitada (Zhao et al., 2015).

Por otro lado, las células T CD8⁺ desempeñan un papel crucial en la identificación y eliminación de células infectadas o cancerosas (Soto et al., 2023). No obstante, una exposición prolongada al estímulo puede llevar a estas células a un estado de inactividad, en el que cesan su proliferación y pierden su función efectora, lo que pone en peligro la respuesta inmune

protectora (Soto-Heredero et al., 2021). Esta situación de estimulación antigénica constante puede resultar en la aparición de diversas formas de células T disfuncionales, entre las que se incluyen las células T agotadas y senescentes (Soto-Heredero et al., 2021). Ambos tipos de células T, tanto las agotadas como las senescentes, exhiben características comunes, como una alteración en la proliferación inducida por el TCR (del inglés T Cell Receptor) y en la expresión de marcadores de diferenciación terminal (Soto-Heredero et al., 2021). Las células T agotadas se distinguen por una disminución en la secreción de citocinas efectoras, tales como IFN- γ y TNF- α .

Tres estudios independientes publicados en *Nature Immunology* han explorado cómo las condiciones intratumorales, incluyendo la hipoxia y la exposición continua al antígeno, provocan el agotamiento de las células T (Scharping et al., 2021; Vardhana et al., 2020; Yu et al., 2020). En particular, Scharping y su equipo observaron que los linfocitos infiltrantes de tumor (LIT) agotados exhibían un estado de hipoxia y estrés mitocondrial más elevado en comparación con las células T efectoras CD8⁺ (Scharping et al., 2021). Bajo estas condiciones extenuantes, las células T comienzan a expresar progresivamente moléculas inhibidoras y a reducir su capacidad de secreción, transformándose en células T progenitoras agotadas (Scharping et al., 2021). Si el estímulo persiste, estas células progenitoras terminan diferenciándose en células T terminales agotadas, las cuales presentan niveles superiores de moléculas inhibidoras y una funcionalidad nula (Scharping et al., 2021).

En conjunto, estos autores sugieren que la activación continua de las células T en un ambiente hipóxico conduce a un estrés mitocondrial que incrementa los niveles de especies reactivas de oxígeno ROS (del inglés Reactive Oxygen Species), lo cual intensifica la

señalización crónica y potencia la maquinaria transcripcional asociada al inmunofenotipo de agotamiento (Scharping et al., 2021; Vardhana et al., 2020; Yu et al., 2020).

En este sentido, los tratamientos capaces de interrumpir este ciclo de retroalimentación podrían tener el potencial de recuperar la funcionalidad de las células T terminales agotadas (Soto-Heredero et al., 2021). Recientemente, se han investigado varios fármacos con el objetivo de lograr una modulación metabólica en estas células T exhaustas (Soto-Heredero et al., 2021). Sin embargo, aún no se ha determinado si la modulación de los programas de senescencia o agotamiento hacia un estado completamente funcional es factible (Soto-Heredero et al., 2021).

La metformina, un antidiabético de uso masivo, se caracteriza por su bajo perfil tóxico (incluso en dosis altas) (Wu et al., 2022). Además de regular el metabolismo, ejerce profundos efectos inmunomoduladores: promueve la proliferación de linfocitos T CD8⁺ y NK (del inglés natural killer) citotóxicos mientras inhibe células inmunosupresoras (linfocitos T reguladores) en el microambiente tumoral (Wu et al., 2022). En particular, Finisguerra y su equipo, demostraron que la metformina mejora la aptitud de las células T CD8⁺ bajo hipoxia, ya que las rescata del estrés oxidativo, aumenta su proliferación, producción de citocinas y reduce la expresión de puntos de control (Finisguerra et al., 2023). En el contexto de terapias CAR T, estudios recientes han observado que la metformina favorece la generación de subpoblaciones de memoria: T_{cm} (del inglés Central Memory T cells), T_{scm} (del inglés Stem Cell Memory T cells) mediante una mayor biogénesis mitocondrial aumento de PGC-1 α (del inglés Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) y un cambio hacia metabolismo de oxidación de ácidos grasos, lo que se asocia a una citotoxicidad antitumoral potenciada (Frlic & Pavlin, 2025; You et al., 2025). Por otra parte, se ha reportado que este fármaco juega un papel importante en la potenciación de la inmunidad antitumoral, lo que indica que podría ser utilizada para abordar

este desafío, ya que estas propiedades de formación de memoria en las células T junto con su perfil de seguridad, convierten a la metformina en un candidato prometedor para potenciar la capacidad citotóxica tanto de los linfocitos CAR T anti-CD19 como de los linfocitos T CD8⁺ convencionales en terapia antitumoral (Huang et al., 2023).

A este respecto, se plantea como pregunta de investigación si: ¿Es la modulación metabólica mediada por el fármaco metformina en linfocitos CAR T anti-CD19 suficientemente efectiva para modificar el inmunofenotipo y así incrementar su capacidad citotóxica *in vitro*? Existe evidencia de que el análisis de las actividades metabólicas de las células en el microambiente tumoral del cáncer colorrectal, realizado a nivel unicelular, reveló que la metformina reconfiguraba el metabolismo del triptófano, el cual se encontraba disminuido en las células de cáncer colorrectal y aumentado en las células T CD8⁺ (Huang et al., 2023). Las células de cáncer colorrectal no tratadas competían con las células T CD8⁺ por el triptófano, lo que resultaba en una disminución de la función de las células T CD8⁺ (Huang et al., 2023). Sin embargo, la metformina redujo la captación de triptófano por parte de las células de cáncer colorrectal, restableciendo así la disponibilidad de triptófano para las células T CD8⁺ y potenciando su citotoxicidad (Huang et al., 2023).

Considerando todo lo anteriormente descrito, el presente trabajo tiene como propósito determinar si el fármaco metformina es capaz de modular el metabolismo de linfocitos CAR T anti-CD19 y como consecuencia, modificar su inmunofenotipo e incrementar su capacidad citotóxica *in vitro*.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Caracterizar en linfocitos CAR T el inmunofenotipo, los cambios metabólicos y su capacidad citotóxica después del tratamiento con metformina.

1.2 Objetivos Específicos

- Determinar el inmunofenotipo de linfocitos CAR T tratados con metformina.
- Cuantificar la expresión de los genes asociados a beta oxidación y glucólisis después del tratamiento con metformina de linfocitos CAR T.
- Analizar la capacidad citotóxica *in vitro* de linfocitos CAR T tratados con metformina.

2. Marco teórico

El cáncer comprende un grupo heterogéneo de patologías complejas caracterizadas por la proliferación descontrolada de células anómalas. Este proceso biológico puede iniciarse en prácticamente cualquier tejido, con la capacidad de infiltrar estructuras adyacentes y diseminarse hacia órganos distantes un mecanismo conocido como metástasis (Organización Mundial de la salud, 2025), definido por el crecimiento incontrolado de células anómalas y una vigilancia inmunológica defectuosa, el cáncer constituye un problema de salud pública de gran relevancia, especialmente en los países en vías de desarrollo (Yin et al., 2021).

En el contexto colombiano, para el año 2022, la leucemia linfóide aguda (LLA) se posicionó como la neoplasia más frecuente dentro de los casos nuevos registrados en la población pediátrica, mientras que la leucemia mieloide aguda (LMA) ocupó el cuarto lugar (Bray et al., 2024). En contraste, en la población adulta, ambas patologías presentaron una menor incidencia relativa, situándose la LLA en el noveno puesto y la LMA en el décimo (Bray et al., 2024). Respecto a la región de residencia, se evidenció que las zonas Central (que incluye departamentos como Santander) y Caribe concentraron los mayores porcentajes de casos de leucemia en menores de 18 años (Bray et al., 2024). En el departamento de Santander durante la vigencia 2025, el tipo de cáncer más frecuente en menores de 18 años corresponde a la LLA, que representa el 24,6% de los casos notificados (SIVIGILA, 2025). Dentro de las leucemias, los municipios con las tasas más elevadas fueron Capitanejo (89,21 por cada 100.000 menores de 15 años) y Cerrito (62,03 por cada 100.000 menores de 15 años) (SIVIGILA, 2025). Esta distribución territorial podría estar relacionada con una menor capacidad instalada para diagnosticar o disponibilidad de servicios especializados en estas regiones.

2.1 Metformina

El clorhidrato de 1,1-dimetilbiguanida, comúnmente conocido como metformina, es un medicamento que ha recibido la aprobación de la FDA para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Bailey, 2017). Este fármaco se caracteriza por ser uno de los moduladores de moléculas pequeñas con la capacidad de dirigirse a la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR, que es esencial para las células inmunes y/o cancerosas (Deng et al., 2019). En lo que respecta a las células tumorales, la metformina ejerce su acción inhibiendo el complejo I de la cadena de transporte de electrones (Pollak, 2012). Esta inhibición provoca la acumulación de NADH dentro de las células tumorales y como consecuencia, disminuye la producción de ATP en su interior (Pollak, 2012). Como resultado de la disminución de los niveles de ATP, se activa la proteína quinasa activada por AMP (AMPK). Esta activación desencadena la vía AMPK e inhibe el objetivo de la rapamicina en los mamíferos (mTOR), lo que conduce a una mejora en la muerte de las células tumorales (Pollak, 2012).

La muerte de las células tumorales inducida por metformina favorece la expansión de las células T (Blagih et al., 2015). En un estudio específico sobre el cáncer colorrectal, se observó que el tratamiento con metformina aumentaba la proporción de células T CD8⁺ y potenciaba su función (Huang et al., 2023).

2.1.1 UK-5099

El compuesto UK-5099 (ácido 2-ciano-3-(1-fenil-1H-indol-3-il)-2-propenoico) es un inhibidor sintético potente y altamente específico del transporte de piruvato. Químicamente, pertenece a la clase de los ciano-cinamatos, caracterizados por una estructura que mimetiza el sustrato pero que posee una alta afinidad por los grupos tiol situados en el sitio activo del transportador MPC (Politte et al., 2025).

A nivel molecular, el mecanismo de acción de UK-5099 se distingue por su capacidad para bloquear la entrada de piruvato a la matriz mitocondrial de manera saturable y dependiente de la concentración. Estudios cinéticos clásicos y contemporáneos han establecido que UK-5099 actúa covalentemente o mediante una unión extremadamente fuerte a los residuos de cisteína críticos en las subunidades del MPC, impidiendo estéricamente el paso del piruvato (Zhong et al., 2015). En modelos celulares, incluyendo linfocitos T y neuronas, concentraciones en el rango micromolar bajo ($2 \mu\text{M}$ - $50 \mu\text{M}$) son suficientes para reducir la capacidad de oxidación de piruvato en más del 50%, sin inducir una citotoxicidad aguda inmediata (Divakaruni et al., 2017). Esta ventana terapéutica *in vitro* es fundamental, pues permite la manipulación metabólica durante periodos prolongados de cultivo (7-14 días para protocolos de expansión CAR-T) sin comprometer la viabilidad del producto celular (Wenes et al., 2022).

De igual forma, la inhibición farmacológica del MPC mediante UK-5099 actúa como un regulador maestro del destino celular en linfocitos T, bloqueando la entrada de piruvato a la mitocondria y forzando una reprogramación metabólica hacia la oxidación de ácidos grasos y la glutaminólisis para mantener el ciclo de Krebs (Politte et al., 2025). Este cambio bioenergético asegura niveles elevados de Acetil-CoA, lo cual impulsa la acetilación epigenética de la histona H3K27 en loci pro-memoria, favoreciendo la diferenciación hacia fenotipos de memoria central T_{CM} y de células madre de memoria T_{SCM} que son resistentes al agotamiento (Wenes et al., 2024). La aplicación transitoria de esta modulación durante la manufactura de células CAR-T ha demostrado conferir una capacidad superior de control tumoral y persistencia en modelo murino, validando simultáneamente el uso de UK-5099 como un control positivo estándar en ensayos bioenergéticos para evaluar la flexibilidad de combustible mitocondrial y la dependencia de glucosa (Politte et al., 2025; Wenes et al., 2022, 2024).

2.2 Terapia celular adoptiva (TCA)

En el transcurso de las últimas décadas, la influencia del sistema inmunológico en la evolución y el tratamiento del cáncer ha sido un área de investigación de gran relevancia (D. S. Chen & Mellman, 2013). A pesar de que la terapia dirigida y la inmunoterapia con inhibidores de puntos de control inmunológico han incrementado significativamente la supervivencia de pacientes con melanoma, entre otros tipos de cánceres, un alto porcentaje de pacientes todavía experimenta una progresión de la enfermedad con estos tratamientos (Luke et al., 2017). La TCA puede ofrecer una alternativa de tratamiento adicional para estos pacientes, la cual implica la transferencia intravenosa de células inmunitarias modificadas, ya sean de sangre periférica o residentes en el tumor, a pacientes con cáncer para ejercer una función antitumoral (June et al., 2015). En la actualidad, la TCA se puede dividir en tres categorías distintas, cada una con su propio mecanismo de acción: TCA con TIL, TCA que emplea terapia génica con TCR-T y TCA con CAR-T modificados (June et al., 2015). Además, la aplicación de distintos tipos de células inmunológicas, tales como las células NK, como fundamento para la terapia celular, también constituye un campo de estudio contemporáneo (Morvan & Lanier, 2016). No obstante, es imprescindible vencer numerosos desafíos para que esta estrategia se convierta en un tratamiento eficaz contra el cáncer (Morvan & Lanier, 2016).

2.2.1 PBMC

Las PBMC, constituyen el componente celular más relevante para la investigación inmunológica clínica y la biomanufactura terapéutica (Verhoeckx, Cotter, Kleiveland, et al., 2015). Desde una perspectiva citológica estricta, el término PBMC no define un linaje celular único, sino que agrupa a cualquier célula sanguínea circulante que posea un núcleo redondo único, excluyendo por definición a los polimorfonucleares o granulocitos (neutrófilos, basófilos

y eosinófilos), cuyos núcleos son multilobulados (Sen et al., 2018). Esta fracción celular representa una ventana accesible y mínimamente invasiva al sistema inmunológico sistémico, actuando como un tejido centinela capaz de reflejar perturbaciones fisiológicas, metabólicas e inmunopatológicas del organismo.

Los linfocitos T constituyen la fracción mayoritaria, representando típicamente entre el 70% y el 85% de la población total de linfocitos dentro de las PBMC (Verhoeckx, Cotter, Kleiveland, et al., 2015). Esta población se subdivide en dos linajes principales basados en la expresión de correceptores de superficie, manteniendo una proporción homeostática aproximada de 2:1 entre células CD4⁺ y CD8⁺ (Sen et al., 2018).

La aplicación de tecnologías ómicas (transcriptómica, proteómica, metabolómica) ha posicionado a las PBMC como un modelo robusto para estudiar la reprogramación metabólica (Končarević et al., 2014). El análisis proteómico de las PBMC ha permitido identificar nuevos biomarcadores de enfermedad que a menudo se pierden en el análisis del plasma debido a la dilución (Končarević et al., 2014). Bases de datos proteómicas específicas de PBMC, establecidas desde 2008, han comenzado a mapear el proteoma mononuclear, proporcionando una referencia para detectar desviaciones patológicas en pacientes con cáncer (Končarević et al., 2014).

2.2.1.1 Células CAR T. Las células CAR son linfocitos que han sido alterados genéticamente para adquirir especificidad hacia antígenos tumorales (Kirtane et al., 2021). A diferencia de otras formas de TCA, las células CAR T identifican antígenos extracelulares sin depender de la presentación del antígeno leucocitario humano HLA (del inglés human leukocyte antigen) (Kirtane et al., 2021). Las células CAR T se componen de un dominio activador de células T que facilita la proliferación celular y un fragmento variable de cadena única que otorga

especificidad para un objetivo (Abate-Daga & Davila, 2016). Aunque las primeras generaciones de CAR T no lograron mantener las respuestas de las células T, las generaciones más recientes de células CAR T incorporan uno o más dominios coestimuladores, como CD28 o 4-1BB, para potenciar su capacidad de proliferación (Imai et al., 2004). En la actualidad, se están llevando a cabo investigaciones intensivas sobre diversos objetivos de las células CAR T en el contexto de tumores sólidos malignos (Kirtane et al., 2021).

Una de las ventajas de las células CAR T es que no dependen del reconocimiento específico de HLA, lo que las hace más aplicables en general que la TCA TCR (Kirtane et al., 2021). No obstante, esta característica también puede limitar su eficacia, ya que teóricamente sólo serían efectivas contra un objetivo extracelular único, que puede no estar presente en muchas neoplasias malignas de tumores sólidos (Kirtane et al., 2021). Además, las células CAR T actuales tienen una sensibilidad limitada al antígeno, lo que permite a las células tumorales regular negativamente los antígenos diana de manera relativamente fácil y se convierte en un mecanismo de resistencia adquirida (Kirtane et al., 2021). Sin embargo, es probable que las futuras tácticas de terapia con células CAR T incorporen citoquinas combinadas, enfoques de múltiples objetivos y novedosas estrategias de inmunoterapia combinada. Estas innovaciones podrían ser clave para superar la diversidad de los antígenos asociados al tumor y el ambiente inhibidor del estroma en tumores sólidos (Kirtane et al., 2021).

2.2.1.1.1 Avances en el diseño de la terapia CAR T. En 1989, el equipo de Z. Eshar ya había documentado la modificación genética de células T para que expresaran receptores sintéticos (Gross et al., 1989). Estos receptores, originalmente denominados cuerpos T, son hoy en día conocidos como CAR (Bachmann, 2019). Desde entonces, la inmunoterapia ha experimentado una revolución gracias a la terapia celular adoptiva (P. H. Chen et al., 2024). Esta

terapia emplea los mencionados receptores de antígenos quiméricos para diseñar células T que se dirigen a antígenos específicos en las células cancerosas (P. H. Chen et al., 2024). En 2017, las células CAR T se convirtieron en un tratamiento clínico líder cuando la FDA de EE. UU. aprobó las células T con CAR anti-CD19 (Ramesh et al., 2023). Desde entonces, las células CAR T han demostrado un potencial terapéutico más amplio y ahora están autorizadas para tratar una variedad de leucemias y linfomas hematológicos y relacionados con células B (Zheng et al., 2023). Sin embargo, el uso más generalizado de la terapia con células T con CAR enfrenta desafíos, como prevenir efectos secundarios perjudiciales como el síndrome de liberación de citoquinas (SLC) y la toxicidad neurológica, mitigar el agotamiento de las células T y desarrollar estrategias para aumentar la eficacia contra los tumores de tejido sólido (P. H. Chen et al., 2024).

La generación inicial de CAR T estableció una conexión entre un scFv, una bisagra y una región transmembrana con el dominio de señalización CD3 ζ , que es nativo de las células T (P. H. Chen et al., 2024). En consecuencia, los CAR T se diferencian de manera fundamental de la señalización del TCR, ya que los TCR identifican antígenos procesados dentro de la célula objetivo y expuestos en la superficie celular en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad, mientras que los CAR T detectan antígenos que aún se encuentran dentro de su proteína nativa y que generalmente se expresan en la superficie celular (P. H. Chen et al., 2024). Las células CAR T de primera generación lograron reconocer con éxito su antígeno objetivo y exhibieron una citotoxicidad limitada (P. H. Chen et al., 2024). En un intento por replicar más estrechamente la señalización de TCR, la segunda generación de células CAR T incorporó dominios de receptores coestimuladores (por ejemplo, 4-1BB, CD28, ICOS, OX-40, CD27) que intensificaron la actividad citotóxica (Honikel & Olejniczak, 2022). Aunque las diferencias en las rutas de señalización activadas por cada uno de ellos aún se están investigando,

los dominios de CD28 y 4-1BB son los más comúnmente empleados y de hecho, son los únicos que se utilizan en las CAR T que han recibido la aprobación de la FDA (P. H. Chen et al., 2024). La unión de estos dos dominios condujo al desarrollo de la tercera generación de células T con CAR, lo que resultó en un incremento adicional en la señalización intracelular y una mejor expansión celular, aunque a expensas de un agotamiento más rápido de las células T (Smith & Shen, 2023). Con la incorporación de varios dominios de señalización coestimuladores en una nueva construcción, es importante destacar que la interacción de la célula CAR T con su objetivo se diferencia en muchos aspectos fundamentales de la sinapsis inmunológica formada por el TCR normal (Katz & Rabinovich, 2020).

En 2014, Bachmann y su equipo se propusieron mejorar la seguridad de las células CAR-T (Cartellieri et al., 2014). Para lograrlo, desarrollaron una plataforma CAR que incorpora un sistema innovador (Cartellieri et al., 2014). Este sistema permite controlar la actividad de las células T a través de módulos objetivo TM (del inglés Target Modules) de corta duración (Bachmann, 2019). Este sistema, conocido como UniCAR, ha sido un avance significativo en la seguridad de las terapias con células CAR T (Bachmann, 2019). Los TM, que son moléculas que se unen específicamente a los tumores, pueden ser pequeños péptidos, nanocuerpos o variables de fragmentos monocatenarios (scFv) (Albert et al., 2017a). Estos están equipados con el epítipo peptídico E5B9 de la proteína nuclear La/SS-B (Arndt et al., 2020). En contraste, las células T UniCAR se componen de un CAR que es específico para E5B9 y su actividad contra el cáncer depende de la disponibilidad de TM (Arndt et al., 2020). Por lo tanto, la administración de TM puede regular tanto la eficacia como los posibles efectos secundarios de las células UniCAR (Arndt et al., 2020). Esta afirmación ha sido recientemente confirmada en un ensayo clínico de fase 1 (NCT04230265) (Loff et al., 2020).

Además del sistema UniCAR, el equipo de M. Bachmann ha desarrollado recientemente un innovador sistema CAR, conocido como RevCAR (Feldmann et al., 2020). A diferencia de los CAR tradicionales, en los RevCAR, el dominio extracelular ya no se basa en un anticuerpo, sino que se construye a partir de un epítipo peptídico, como el E5B9 (Feldmann et al., 2020). Los RevTM, necesarios para redirigir las células T RevCAR, son anticuerpos biespecíficos que reconocen tanto el epítipo peptídico como el antígeno tumoral (Feldmann et al., 2020). Así mismo los RevTM muestran una cinética similar a los UniCAR TM, lo que permite encender y apagar de manera reversible el adaptador CAR simplemente mediante la administración de TM (Feldmann et al., 2020). Por lo cual, las células T RevCAR presentan un perfil de seguridad superior, ya que su dominio receptor extracelular evita la agregación de CAR en la superficie celular, eliminando así la señalización tónica en las células T RevCAR (Feldmann et al., 2020).

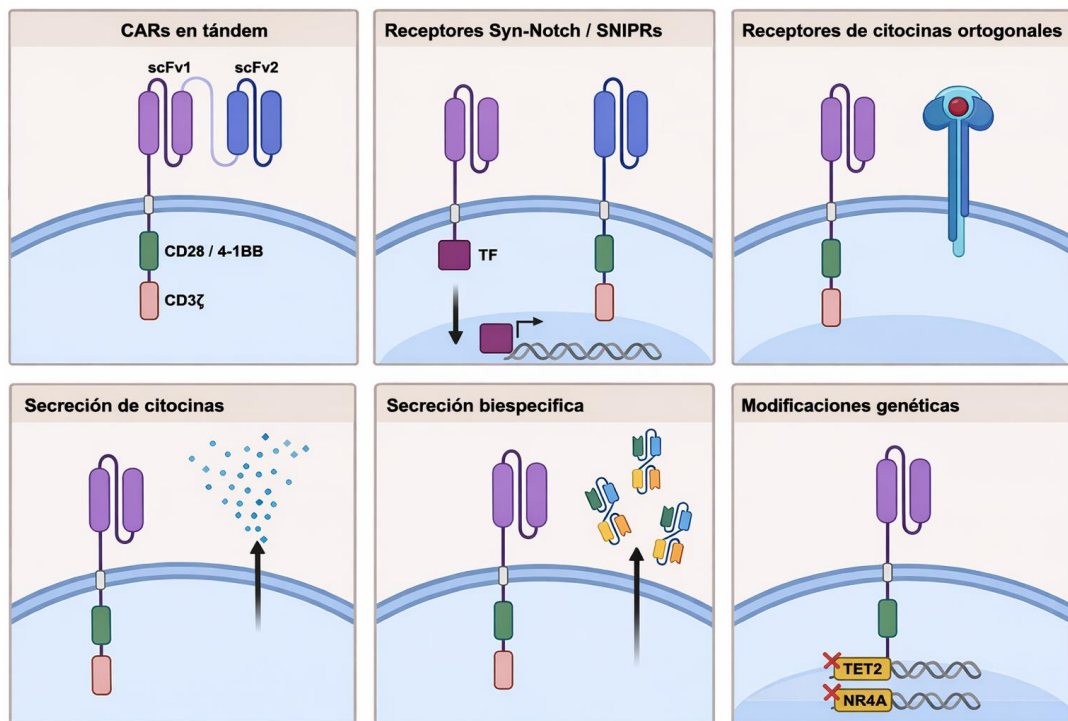
Sin embargo, es esencial identificar el blanco terapéutico, en este contexto, el antígeno tumoral de interés, para que la terapia CAR T sea exitosa.

2.2.2.1.1 CAR-T de cuarta generación y modulación del microambiente. Los linfocitos CAR T de cuarta generación, mejor conocidos como células TRUCK (del inglés T cells Redirected for Universal Cytokine Killing), constituyen una evolución estructural diseñada para operar en entornos tumorales complejos. Como se esquematiza en la Figura 1, estos constructos mantienen la arquitectura base de las generaciones previas (dominios de señalización CD3 ζ y coestimuladores), pero integran un casete de expresión adicional para la producción inducible de proteínas transgénicas. Este módulo genético suele estar bajo el control de promotores sensibles a la activación del TCR, como los elementos de respuesta nuclear de células T activadas NFAT (del inglés Nuclear Factor of Activated T-cells), lo que restringe la síntesis de su carga útil.

Generalmente citocinas proinflamatorias como IL-12, IL-18 o IL-15 al momento preciso del reconocimiento antigénico (Alsaieedi & Zaher, 2025).

Figura 1

Tecnologías de linfocitos CAR T de nueva generación. Tomado de: (Alsaieedi & Zaher, 2025).



Nota. Ilustración de las plataformas CAR-T de próxima generación para tumores sólidos están diseñadas para optimizar la especificidad y la persistencia celular mediante estrategias avanzadas como los diseños biespecíficos en tándem para mitigar la heterogeneidad antigénica y el uso de receptores SynNotch o SNIPRs que actúan como circuitos lógicos para incrementar la seguridad operativa. Además, la implementación de células "acorazadas" y receptores de citoquinas ortogonales permite contrarrestar la inmunosupresión del microambiente tumoral, mientras que la modulación genética, mediante la deleción de reguladores como TET2 y NR4A, resulta fundamental para prevenir el agotamiento celular y potenciar la eficacia antitumoral.

Este diseño se fundamenta en la capacidad de reprogramar el microambiente tumoral inmunosupresor. A diferencia de los linfocitos CAR T convencionales, cuya funcionalidad suele verse comprometida por la hostilidad del estroma tumoral, los TRUCK actúan como vehículos de entrega localizada de agentes inmunomoduladores. Esta liberación paracrina de citocinas permite alterar el perfil de citocinas del tejido, favoreciendo el reclutamiento y activación de células de la inmunidad innata. De esta manera, se busca inducir la transición de tumores inmunológicamente "fríos" a "calientes", evitando al mismo tiempo la toxicidad sistémica severa asociada a la administración sistémica de estas potentes moléculas inflamatorias (Patel et al., 2025).

Adicionalmente, esta estrategia aborda uno de los principales mecanismos de resistencia: la heterogeneidad antigénica. La inflamación local generada por los TRUCK desencadena una respuesta inmunitaria secundaria mediada por macrófagos y células NK del huésped, las cuales pueden atacar células tumorales variantes que carecen del antígeno específico del CAR. Este fenómeno, conocido como efecto espectador, es crucial para prevenir el escape tumoral por pérdida de antígeno, consolidando una respuesta terapéutica más amplia y sostenida en el tiempo (Alsaieedi & Zaher, 2025).

2.2.2.2.1 Terapia CAR T en neoplasias hematológicas. A la fecha, el panorama terapéutico de linfocitos CAR T ha experimentado una evolución exponencial desde las primeras aprobaciones descritas en 2017. Lo que comenzó con la autorización de dos agentes pioneros dirigidos a CD19 (tisagenlecleucel y axicabtagene ciloleucel) se ha expandido a un ecosistema complejo de siete terapias aprobadas por la FDA (Tabla 1), abarcando múltiples neoplasias hematológicas, incluyendo diversos subtipos de linfomas no Hodgkin NHL (del inglés Non-Hodgkin lymphoma), LLA y mieloma múltiple (MM) (Ahmad et al., 2020).

Tabla 1

Terapias CAR-T aprobadas por la FDA para neoplasias hematológicas.

Terapia	Nombre comercial	Aprobado para	Población de pacientes	Fecha de aprobación
Tisagenlecleucel	Kymriah	LBDCG	Adultos R/R	1 de mayo de 2018
		LLA-B	Pacientes hasta 25 años	30 de agosto de 2017
Axicabtagene Ciloleucel	Yescarta	LBDCG	Adultos R/R	18 de octubre de 2017
		LF	Adultos R/R	5 de marzo de 2021
Brexucabtagene Autoleucel	Tecartus	LCM	Adultos R/R	24 de julio de 2020
		LLA-B	Adultos R/R	1 de octubre de 2021
Lisocabtagene Maraleucel	Breyanzi	LBDCG	Adultos R/R	24 de junio de 2022
		LLC/LLP	Adultos R/R	14 de marzo de 2024
		LCM	Adultos R/R	30 de mayo de 2024
		LZM	Adultos R/R	4 de diciembre de 2025
Obecabtagene Autoleucel	Aucatzyl	LLA-B	Adultos R/R	11 de noviembre de 2024
Idecabtagene Vicleucel	Abecma	MM	Adultos R/R	11 de abril de 2024
Ciltacabtagene Autoleucel	Carvykti	MM	Adultos R/R	5 de abril de 2024

Nota. Adultos R/R = (Recaída/Refractario) Linfoma Difuso de Células B Grandes = (LBDCG), Leucemia Linfoblástica Aguda de Células B Precursoras = (LLA-B), Linfoma Folicular = (LF), Linfoma de Células del Manto = (LCM)

3. Métodos

El presente capítulo expone de forma detallada el diseño metodológico y los protocolos experimentales desarrollados para determinar el impacto de la modulación metabólica en la funcionalidad de los linfocitos T purificados y linfocitos CAR T anti-CD19. El estudio se

estructura bajo un modelo experimental *in vitro*. En este sentido, la determinación del tamaño muestral se fundamentó en el método de la ecuación de recursos para garantizar un nivel de confianza estadística óptimo

3.1 Tipo de Estudio

Estudio Experimental *in vitro*

3.1.1 Tamaño Muestral

Se realizarán por experimento de 3 réplicas biológicas cada una con 3 réplicas técnicas. El tamaño experimental es obtenido a través de la ecuación de recursos con n – mínimo absoluto.

$$n = \frac{DF}{k} + 1$$

DF= Definido por n – mínimo igual 10

K= 3 grupos evaluados correspondientes linfocitos CAR T anti-CD19 sin tratar control negativo (DMSO), linfocitos CAR T anti-CD19 tratados con (Metformina) y linfocitos CAR T anti-CD19 tratados con el control positivo (UK 5099).

$$n - \text{mínimo} = \frac{10}{3} + 1 = 4.33$$

Equivale a un tamaño muestral mínimo absoluto de 4 participantes.

3.2 Desarrollo metodológico del primer objetivo específico

Determinar el inmunofenotipo de linfocitos CAR T tratados con metformina.

3.2.1 Vector lentiviral anti-CD19

Para la modificación genética de las células T y la generación del producto celular, se empleó un vector lentiviral que codifica para el constructo receptor de antígeno quimérico CAR CD19-41BB. Este vector fue producido, suministrado y estandarizado por la Unidad de Terapias Avanzadas del Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e Innovación en Salud (IDCBIS).

La elección y relevancia de utilizar un sistema basado en *lentivirus* dentro de este diseño experimental radica en su alta eficiencia para integrar de manera estable el material genético exógeno (transgén del CAR) en el genoma del huésped. A diferencia de otros vectores, los *lentivirus* poseen la capacidad de transducir eficazmente tanto células en división como en etapa de no división, una característica crítica al trabajar con linfocitos T primarios (Porter et al., 2011). Esta integración genómica estable resulta fundamental para el desarrollo del estudio, ya que asegura una expresión sostenida del receptor a largo plazo y previene la dilución del transgén durante el prolongado periodo de proliferación y expansión celular.

3.2.1.1 Aislamiento de PBMC y subpoblación de células T. Se recolectaron muestras de sangre de cuatro donantes sanos, mayores de 18 años, las cuales se almacenaron en tubos BD Vacutainer de 10 ml con K2-EDTA (BD Diagnostics). A partir de estas muestras, se obtuvieron las PBMC mediante centrifugación en gradiente de densidad, utilizando Lymphoprep™ (StemCell Technologies) y tubos de aislamiento SepMate™ de 50 ml (StemCell Technologies), siguiendo las directrices del fabricante.

Para este procedimiento, se añadieron 13 ml de medio de gradiente de densidad (Lymphoprep) al tubo SepMate, pipeteando con precaución a través del orificio central del inserto. A continuación, se tomaron 15 ml de la muestra de sangre, la cual se combinó con un volumen equivalente de PBS suplementado con SFB al 2 %. Esta mezcla se vertió suavemente sobre el Lymphoprep a lo largo de las paredes del tubo, evitando que se mezclara con el gradiente de densidad. Posteriormente, el tubo SepMate se centrifugó a 1200 xg, durante 20 minutos a temperatura ambiente, con el freno activado.

Finalizada la centrifugación, se recolectó la capa enriquecida con PBMC transfiriéndola a un nuevo tubo, donde se realizó un lavado con un volumen equivalente de PBS más SFB al 2 %. Por

último, se realizó una centrifugación a 1200 xg, durante 20 minutos a temperatura ambiente con el freno activado. El pellet resultante se resuspendió en medio RPMI suplementado con SFB al 10 % y antibióticos (1×), procediéndose finalmente a la cuantificación y criopreservación celular.

3.2.1.1.1 Aislamiento de linfocitos T CD3+ mediante selección negativa. Para la obtención de una población pura de linfocitos T, se empleó una estrategia de aislamiento por selección negativa utilizando el kit comercial Dynabeads® Untouched™ Human T Cells (Thermo Fisher Scientific), siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante. Inicialmente, las PBMC obtenidas por gradiente de densidad se resuspendieron en buffer de aislamiento (PBS frío, pH 7.4, suplementado con albúmina sérica bovina [BSA] al 0,1 % y EDTA 2 mM) a una concentración de 1×10^7 células/ml. A esta suspensión celular se le añadió el Antibody Mix (mezcla de anticuerpos monoclonales de ratón IgG), el cual contenía especificidad contra marcadores de superficie de células B, células NK, monocitos, plaquetas, células dendríticas, granulocitos y eritrocitos (CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CDw123 y CD235a). La mezcla se incubó durante 20 minutos a una temperatura de 2 °C a 8 °C para permitir el marcaje específico de las células no deseadas. Posteriormente las células se lavaron con buffer de aislamiento para eliminar el exceso de anticuerpos no unidos y se resuspendieron nuevamente. Se procedió a añadir las Depletion Dynabeads (perlas superparamagnéticas recubiertas con anticuerpos secundarios), incubando la muestra durante 15 minutos a temperatura ambiente (18 °C - 25 °C) con inclinación y rotación suave para favorecer la formación del complejo perlas-célula. Finalmente, la suspensión se colocó en una gradilla magnética durante 2 minutos. Las células marcadas con el complejo anticuerpo-perla (fracción negativa) migraron hacia la pared del tubo atraídas por el campo magnético, mientras que los linfocitos T purificados permanecieron libres en suspensión. El sobrenadante, conteniendo los linfocitos T enriquecidos e

intactos, se transfirió cuidadosamente a un nuevo tubo estéril, procediendo posteriormente a su conteo y verificación de viabilidad con azul de Tripano al 0,4 % (Sigma-Aldrich).

3.2.2.1.1 Evaluación de viabilidad y recuento celular. Para determinar la viabilidad y la concentración de los linfocitos T purificados, se empleó el método de exclusión por colorante utilizando una solución de Azul de Tripano al 0,4 % (Sigma-Aldrich). Se tomó una alícuota de la suspensión celular y se mezcló en una proporción 1:1 con el colorante (por ejemplo, 10 μ l de células + 10 μ l de Azul de Tripano). La mezcla se homogeneizó suavemente y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se cargaron 10 μ l de la suspensión en el contador de células, se empleó el contador celular automatizado de fluorescencia y campo claro CellDrop™ (DeNovix Inc., Wilmington, DE, EE. UU.), eliminando la variabilidad del conteo manual.

El análisis se realizó mediante el protocolo de exclusión con Azul de Tripano, utilizando la aplicación específica "Trypan Blue Primary Cell" configurada para linfocitos (CAR T cells protocol). La cuantificación se llevó a cabo aplicando un filtro de tamaño celular estandarizado para capturar células con un diámetro entre 6 y 15 μ m, excluyendo detritos celulares y agregados fuera de este rango. El software del instrumento calculó automáticamente la densidad celular (células/ml) y el porcentaje de viabilidad, aceptándose para los pasos de activación subsiguientes únicamente aquellas muestras que superaron el 90 % de viabilidad.

3.2.2.2.1 Transducción de linfocitos T con vector lentiviral anti-CD19. Para la obtención de las células T anti-CD19, se realizó la transducción lentiviral siguiendo el protocolo estandarizado por la Unidad de Terapias Avanzadas del IDCBIS. (Cartellieri et al., 2014). Se procedió a la transducción lentiviral del constructo CAR CD19 41BB producido por el IDCBIS. La cantidad de sobrenadante viral se calculó para alcanzar una Multiplicidad de Infección MOI

(del inglés Multiplicity of Infection) de 4 a 6, basándose en los títulos virales funcionales determinados previamente (rango de $2,6 - 3,2 \times 10^6$ partículas virales/mL). Para potenciar la eficiencia de la transferencia génica, se utilizó sulfato de protamina (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 5 µg/mL. La mezcla de viriones y células se incubó a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂ (Albert et al., 2017b). realizándose el recambio de medio tras 24 horas para eliminar las partículas virales residuales y continuar con la expansión.

En detalle, se llevó a cabo la estimulación de los linfocitos T utilizando perlas activadoras policlonales recubiertas con anti-CD3/CD28 (Thermo Fisher Scientific) en una proporción de 1:1 (perla:célula) (Albert et al., 2017b). Transcurridas 24 horas, se adicionó el sobrenadante del vector lentiviral concentrado (MOI 4 a 6), manteniendo el cultivo durante las siguientes 48 horas antes de proceder al retiro de las perlas (Albert et al., 2017b).

3.2.2.2 Establecimiento de los grupos experimentales y modulación metabólica. Los linfocitos T purificados y los linfocitos CAR T anti-CD19 descongelados se distribuyeron aleatoriamente en placas de cultivo de 24 pocillos a una densidad de 1×10^6 células/ml en medio RPMI 1640 completo. Se definieron tres condiciones experimentales independientes para evaluar el impacto de la modulación metabólica sobre la diferenciación celular:

- Grupo Control Negativo (Sin tratamiento): Células cultivadas en medio estándar bajo condiciones de activación y soporte de citoquinas, suplementadas únicamente con dimetilsulfóxido (DMSO). Se aplicó una concentración final del solvente al 0,1 % (v/v), correspondiente a la dilución realizada a partir de un stock inicial de 25 mM, con el fin de mimetizar las condiciones del tratamiento experimental y descartar efectos citotóxicos asociados al solvente.

- Grupo Experimental (Metformina): Células tratadas con el fármaco metformina (clorhidrato de 1,1-dimetilbiguanida, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 5.0 mM. El fármaco se reconstituyó en agua estéril libre de nucleasas para la preparación de la solución madre. Esta dosis se seleccionó con base en reportes previos para activar la vía AMPK e inhibir mTORC1 sin comprometer la viabilidad celular (Blagih et al., 2015).

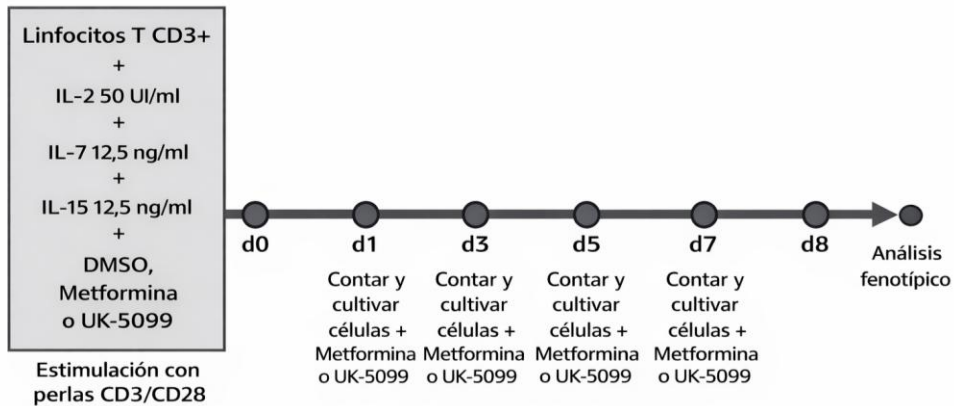
- Grupo Control Positivo (UK5099): células tratadas con el inhibidor específico del transportador mitocondrial de piruvato, UK-5099 (Cat. No. 504817, Merck/Sigma-Aldrich), a una concentración final de 25 μ M (Wenes et al., 2022). Este tratamiento se preparó a partir de una solución madre (stock) de 25 mM reconstituida en DMSO, asegurando que la concentración final del fármaco en el cultivo se mantuviera en 0.1 % (v/v), idéntica a la del grupo control.

Los tratamientos farmacológicos se administraron simultáneamente con el inicio de la activación (adición de perlas anti-CD3/CD28) y se mantuvieron constantes durante todo el periodo de expansión ex vivo. Para garantizar la estabilidad de la modulación metabólica, la renovación del medio de cultivo y de los fármacos se realizó cada 48 horas hasta el día de la cosecha final.

Posteriormente se estableció el modelo experimental que usamos para modular el metabolismo de los linfocitos T purificados y los linfocitos CAR T anti-CD19 (Figuras 2 y 3).

Figura 2

Establecimiento de la modulación metabólica en linfocitos T purificados.

**Figura 3**

Establecimiento de la modulación metabólica en linfocitos CAR T.



La selección de las concentraciones empleadas para los tratamientos (UK-5099 a 25 μ M y Metformina a 5 mM) se fundamentó en un análisis riguroso de la literatura, considerando la especificidad del blanco y los perfiles de toxicidad de cada compuesto para garantizar la modulación metabólica sin comprometer la viabilidad celular.

Por un lado, para el inhibidor del MPC, UK-5099, se seleccionó una concentración final *in vitro* de 25 μ M. El uso de esta concentración en el rango micromolar se justifica con base en ensayos previos de dosis-respuesta (Wenes et al., 2022). Originalmente, concentraciones más altas (como 75 μ M) demostraron maximizar la inducción de marcadores de células T de

memoria *in vitro* sin afectar negativamente la proliferación y viabilidad de las células T. No obstante, estudios *in vivo* posteriores a una transferencia adoptiva en modelos de infección revelaron que dicha dosis generaba efectos fuera del blanco, induciendo fenotipos de memoria incluso en células T con la delección del gen *MPC1* (Wenes et al., 2022). Por consiguiente, se optó por una dosis de 25 μ M.

Por otro lado, la metformina (clorhidrato de 1,1-dimetilbiguanida) requirió ser utilizada a una concentración sustancialmente mayor (rango milimolar de 5.0 mM). Esta disparidad se debe a que la metformina es un fármaco con un perfil toxicológico significativamente bajo (Pollak, 2012). De acuerdo con las Fichas de Datos de Seguridad (FDS), los valores de la dosis letal 50 (LD50) documentados para la metformina evidencian su amplio margen de seguridad: LD50 oral en ratas de 1 g/kg, LD50 intraperitoneal de 500 mg/kg y subcutánea de 300 mg/kg; mientras que en modelos murinos (ratón) la LD50 oral es de 1450 mg/kg, intraperitoneal de 420 mg/kg y subcutánea de 225 mg/kg. La concentración de 5.0 mM se seleccionó con base en la literatura especializada y en ensayos preliminares de dosis-respuesta, los cuales evidenciaron que este rango de concentración permite la activación farmacológica de AMPK y la inhibición de mTORC1 sin comprometer significativamente la viabilidad celular. Adicionalmente, el amplio perfil de seguridad de la metformina descrito en estudios toxicológicos respalda su utilización a concentraciones milimolares en modelos experimentales *in vitro*. (Huang et al., 2023; Zhang et al., 2020).

3.3.1.1.1 Inmunofenotipo de CAR-T. Luego de los nueve días, las células CAR-T se tiñeron en buffer de lavado FACS (PBS 1 $\times$ suplementado con BSA al 1 %) durante 30 minutos, empleando anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos específicos (Ye et al., 2011).

Se realizó la caracterización de las subpoblaciones T CD4⁺ y CD8⁺, evaluando el fenotipo de memoria mediante los marcadores CCR7, CD45RA.

Para el análisis, se adquirieron un mínimo de 50.000 eventos por muestra en un citómetro espectral. El procesamiento de los datos se llevó a cabo mediante el software FlowJo y la visualización de la complejidad fenotípica y la agrupación de subpoblaciones se representó mediante algoritmos de reducción de dimensionalidad.

3.4 Desarrollo metodológico del segundo objetivo específico

Cuantificar la expresión de los genes asociados a beta oxidación y glucólisis después del tratamiento con metformina de linfocitos CAR T.

3.4.1 Extracción de ARN

Se extrajo el ARN total de los linfocitos CAR T anti-CD19 posterior a los nueve días de tratamiento con el fármaco metformina y los controles utilizando el kit Monarch® Total RNA Miniprep Kit #T2010 (New England Biolabs, Massachusetts, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante (New England Biolabs, 2024). Brevemente, se lisaron las células agregando 300 µl de RNA Lysis Buffer, se resuspendió la mezcla y se transfirió el lisado homogeneizado a una columna de eliminación de ADN genómico colocada en un tubo de recolección. Se centrifugó durante 30 segundos a 16000 xg para retener el ADN genómico en la columna; posteriormente, se descartó la columna y se conservó el flujo pasante. A este filtrado se le agregaron aproximadamente 300 µl de etanol >95 % y se mezcló mediante pipeteo. La mezcla se transfirió a una columna de purificación de ARN colocada en un tubo de recogida y se centrifugó durante 30 segundos a 16000 xg, descartándose el líquido sobrenadante. Para la eliminación enzimática del ADN residual, se realizó un tratamiento con ADNasa I en columna, añadiendo 5 µl de ADNasa I en 75 µl de buffer de reacción e incubando durante 15 minutos a

temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 500 µl de RNA Priming Buffer a la columna y se centrifugó durante 30 segundos a 16000 xg.

Finalmente, se realizaron dos lavados con 500 µl de RNA Wash Buffer, centrifugando el último lavado durante 2 min a 16000 xg para asegurar el secado completo de la membrana. La columna se centrifugó a máxima velocidad (20000 xg) durante un minuto para eliminar residuos de etanol. Posteriormente, la columna se transfirió a un tubo colector nuevo de 1,5 ml libre de nucleasas. Para la elución del ARN, se agregaron entre 30 y 100 µl de agua libre de ARNasas directamente al centro de la membrana y se centrifugó durante 1 min a ≥ 8000 xg. Se prepararon dos alícuotas del eluido. La concentración y la pureza del ARN se determinaron mediante las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 utilizando un espectrofotómetro DS-11 (DeNovix, Wilmington, EE. UU.). Finalmente, las muestras se mantuvieron en hielo para su uso inmediato o se almacenaron a -70 °C para su conservación a largo plazo.

3.4.1.1 Retrotranscripción. La transcripción inversa se llevó a cabo utilizando el kit LunaScript® RT SuperMix #E3010 (New England Biolabs, Massachusetts, EE. UU.), siguiendo el programa térmico detallado en la Tabla 2. Para verificar la ausencia de contaminación con ADN genómico, se incluyó un control negativo para cada muestra empleando la mezcla sin transcriptasa inversa No-RT (del inglés Reverse Transcriptase) el mismo fabricante.

Tabla 2

Programa de retrotranscripción

Programa termociclador		
Síntesis de ADNc	55°C	10 minutos
Inactivación por calor	95°C	1 minuto
Conservación	4 °C	∞

3.4.1.1.1 Confirmación integridad del ARN. Posteriormente, para confirmar la integridad del ARN y la ausencia de contaminación con ADN genómico, se amplificó un fragmento del gen de la RNaseP empleando los cebadores Fwd: 5'-TCCATACCCTGTTAATTGAGCTT-3' y Rev: 5'-CATCCAGGACAGAATCAACCA-3'. La reacción se llevó a cabo utilizando la mezcla maestra GoTaq® Green Master Mix (Promega, Wisconsin, EE. UU.), siguiendo el perfil térmico recomendado por la casa comercial (Tablas 3 y 4).

Finalmente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2 % para verificar la integridad del material genético en las muestras procesadas y confirmar la ausencia de bandas en los controles sin transcriptasa inversa (No-RT).

Tabla 3

Componentes de la PCR punto final.

Componente PCR		Concentración	Volumen
Master Mix GoTaq	dNTPs	0,2 Mm	12,5 uL
Green, 2X	Taq polimerasa	5 u	
	MgCl ₂	1,5 mM	
Cebadores		1 uM	2,0 uL
Agua		-	5,5 uL
ADNc 50 ng		-	5 uL
Volumen final		-	25 uL

Tabla 4*Programa de amplificación de PCR punto final.*

Programa termociclador			
1 ciclo	Desnaturalización inicial	95°C	2 minutos
35 ciclos	Desnaturalización	95°C	30 segundos
	Alineamiento	58°C	30 segundos
	Extensión	72°C	60 segundos
1 ciclo	Extensión final	72°C	5 minutos
	Conservación	4°C	∞

3.4.2 PCR digital en gotas (ddPCR)

Para verificar la expresión de los genes seleccionados (tabla 5), se utilizó el sistema de ddPCR QX200 (Bio-Rad, California, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los ensayos se realizaron en un volumen total de 24 μ l. La mezcla de reacción contenía 12 μ l de ddPCR Supermix for EvaGreen (2 $\times$), 1,2 μ l de cebadores (para una concentración final de 125 nM), 5,8 μ l de agua libre de nucleasas y 5 μ l del ADNc de los linfocitos CAR T anti-CD19 (tabla 6) (tabla 7).

Se cargaron 20 μ l de la mezcla de reacción en los pocillos del cartucho DG8, junto con 70 μ l de aceite generador de gotas. El cartucho se procesó en el generador de gotas QX200 hasta completar el ciclo de partición. Posteriormente, se transfirieron 40 μ l de las gotas generadas a una placa de PCR de 96 pocillos, la cual se selló térmicamente con lámina de aluminio utilizando un sellador de placas PX1 (Bio-Rad, California, EE. UU.) y se ubicó en un termociclador C1000 Touch (Bio-Rad).

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: activación enzimática inicial a 95 °C durante 10 minutos, seguida de 40 ciclos de un perfil térmico de dos pasos (desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos y alineamiento/extensión a 57 °C durante 1 minuto). El protocolo finalizó con un paso de inactivación enzimática a 98 °C durante 10 minutos y estabilización de las gotas a 4 °C durante 30 minutos. Durante todos los pasos se mantuvo una velocidad de rampa de 2 °C/segundo. Finalizado el ciclo térmico, la placa se procesó en el lector de gotas QX200 y los datos se analizaron utilizando el software QuantaSoft versión 1.7.4.0917.

Tabla 5

Genes escogidos para medir expresión de diferentes vías metabólicas.

Vía metabólica	Gen	Cebador directo (de 5' a 3')	Cebador reverso (de 5' a 3')
Beta-Oxidación de Ácidos Grasos	<i>CPT1-alpha</i>	GATCCTGGACAATACCTCGGAG	CTCCACAGCATCAAGAGACTGC
	<i>CACT</i>	CCTGGAGAACGGATCAAGTG	CGCATAAGGGTAAGCACAGT
	<i>ACADVL</i>	GCTGTGGGAATGTTCAAAGG	AAACTGTGTCTGCTCTTCGTT
Glutaminólisis y Transporte de Aminoácido	<i>SLC1A5</i>	GCCTCTGAGAAGGAATCAGTC	GCCCTAGCTCATCCATTTATCC
	<i>GLS</i>	AGCTTGGAAGATTGCTGTTCTA	TCTTTCAACCTGGGATCAGAC
Estrés	<i>SOD2</i>	CTGGACAAACCTCAGCCCTAAC	AACCTGAGCCTTGGACACCAAC
Oxidativo y Defensa	<i>NRF2</i>	CACATCCAGTCAGAAACCAGTGG	GGAATGTCTGCGCCAAAAGCTG
	<i>SIRT3</i>	CCCTGGAAACTACAAGCCCAAC	GCAGAGGCAAAGGTTCCATGAG
Antioxidante	<i>GPX1</i>	GTGCTCGGCTTCCCGTGCAAC	CTCGAAGAGCATGAAGTTGGGC
Glucólisis	<i>GLUT-1</i>	AAATTCAACGGCACAGTCAAGG	TGGCTCCTCGGGTGTCTTGT
	<i>HK2</i>	GAGCCACCACTCACCTACT	CCAGGCATTGCGCAATGTG
	<i>LDHA</i>	ATGGCAACTCTAAAGGATCAGC	CCAACCCCAACAACCTGTAATCT

Tabla 6*Componentes de la ddPCR de Linfocitos CAR T.*

Componente ddPCR		Concentración	Volumen
Supermix ddPCR	2x	1X	12,0 uL
EvaGreen 2X			
Cebador F y R	2,5 uM	250 nM	2,4 uL
Agua BM	-	-	5,6 uL
ADN	10 ng/uL	40 ng	4,0 uL
Volumen final	-	-	24 uL

Tabla 7*Programa de amplificación de la ddPCR de genes seleccionados.*

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Rampa
1	95°C	5 minutos	2°C/seg
40	95°C	30 segundos	2°C/seg
	58°C	1 minuto	2°C/seg
1	4°C	5 minutos	2°C/seg
1	90°C	5 minutos	2°C/seg
1	4°C	Infinito	2°C/seg

3.4.2.1 Procesamiento de datos y normalización. Los datos de ddPCR se normalizaron al control DMSO de cada muestra. Esto significa que para cada gen se tomó el nivel de expresión promedio en células tratadas con DMSO como referencia 1 ($\log_2=0$) y los valores de expresión

en Metformina o UK-5099 se dividieron entre esta referencia. De ese modo se obtuvo el fold-change, que luego se transformó al $\log_2$ para la representación. Esta normalización al control elimina variaciones de expresión basal entre donantes y enfatiza los cambios específicos al tratamiento. El procesamiento de los datos, el cálculo de los fold-change y la generación del mapa de calor se realizaron utilizando Python mediante el uso de las librerías NumPy y pandas para el manejo y transformación de datos junto con seaborn y matplotlib para la visualización gráfica.

3.5 Desarrollo metodológico del tercer objetivo específico

Analizar la capacidad citotóxica *in vitro* de linfocitos CAR T tratados con metformina.

3.5.1 Inmunofenotipo de CAR-T luego de re-estimulación

Para analizar el perfil funcional y la capacidad de producción de citoquinas *in vitro*, se llevó a cabo un ensayo de re-estimulación en el día 9 de expansión celular (Figuras 3 y 4). Los linfocitos CAR T anti-CD19 (provenientes de los grupos tratados con metformina y controles) se cosecharon, se lavaron para retirar el medio condicionado y se sembraron nuevamente en presencia de perlas activadoras anti-CD3/CD28 (Dynabeads, Thermo Fisher Scientific) en una proporción estandarizada. Este estímulo se mantuvo durante 24 horas a 37 °C, con el fin de inducir la activación de la maquinaria efectora y la acumulación de citoquinas intracelulares.

La evaluación funcional se llevó a cabo mediante citometría de flujo multiparamétrica, siguiendo un protocolo de tinción secuencial. Inicialmente, las células se lavaron con PBS 1× y se tiñeron con el colorante de viabilidad Ghost Dye™ Violet 510 (dilución 1:100) durante 30 minutos a 4 °C en oscuridad, permitiendo la discriminación estricta de células vivas y muertas. Tras el lavado con Stain Buffer (PBS + 1 % BSA), se realizó la tinción de superficie incubando

las muestras con un panel de anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos específicos. Este panel permitió evaluar:

- Marcadores de linaje y de memoria: CD3, CD4, CD8, CCR7 y CD45RA.
- Marcadores de agotamiento: Se incluyeron los receptores inhibitorios PD-1, TIM-3, LAG-3 y CTLA-4 para determinar el fenotipo exhausto.

Para la detección de moléculas efectoras, las células se sometieron a un proceso de fijación y permeabilización con el kit comercial correspondiente (*Cytofix/Cytoperm*, BD Biosciences). Posteriormente, se realizó la tinción intracelular mediante la incubación con anticuerpos específicos contra las citoquinas proinflamatorias interferón gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la citoquina inmunomoduladora factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), el factor proliferativo interleucina-2 (IL-2) y el mediador citotóxico granzima B, lo que permitió cuantificar la polifuncionalidad de los linfocitos CAR T anti-CD19 luego del reconocimiento antigénico.

3.5.1.1 Adquisición y análisis de datos. La adquisición de las muestras se realizó en un citómetro espectral (Cytek Northern Lights), registrando un mínimo de 50.000 eventos por tubo. El análisis de los datos se efectuó utilizando el software FlowJo, aplicando estrategias de gating para excluir dobletes y células muertas (Ghost Dye+), Finalmente, debido a la distribución no normal de los datos y al diseño experimental (muestras pareadas provenientes del mismo participante bajo distintas condiciones), se utilizó la prueba de Friedman para evaluar las diferencias globales entre los grupos. Para las comparaciones múltiples post hoc entre tratamientos, en lugar de las correcciones tradicionales de la tasa de error familiar, se aplicó el procedimiento de dos etapas de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Este método fue seleccionado

para controlar la Tasa de Falsos Descubrimientos ($FDR < 0.05$). Los análisis se realizaron con el software GraphPad Prism v.9.4.

3.5.1.1.1 ddPCR de puntos de control inhibitorio. De manera complementaria y con el fin de correlacionar la respuesta citotóxica observada con el estado de agotamiento celular, se determinó el perfil de expresión génica de receptores de punto de control inhibitorio. A partir de alícuotas paralelas de los cocultivos, se extrajo el ARN total y se cuantificó mediante ddPCR la abundancia absoluta de transcritos codificantes para PD-1, TIM-3, LAG-3 y CTLA-4. Estos datos moleculares se integraron con los resultados de citometría para establecer una asociación directa entre la modulación metabólica inducida por metformina, la expresión de marcadores de agotamiento y la potencia lítica *in vitro*.

4. Resultados.

Inicialmente, se describen los resultados asociados a la producción y caracterización inmunofenotípica de linfocitos CD3⁺ derivados de sangre periférica y linfocitos CAR T anti-CD19, evaluando el impacto del tratamiento con metformina sobre la proporción de subpoblaciones de memoria y diferenciación celular. Posteriormente, se presentan los hallazgos relacionados con la reprogramación metabólica, incorporando UK-5099 como control positivo de la inhibición del transporte mitocondrial de piruvato, y se detalla la cuantificación de la expresión diferencial de genes asociados a la glucólisis y a la β -oxidación mediante PCR digital. Por último, se describen los resultados obtenidos de la evaluación funcional tras la re-estimulación, correlacionando la capacidad de producción de citoquinas y los niveles de expresión de receptores de agotamiento para determinar la mejora en la potencia citotóxica *in vitro*.

4.1 Fase I: Producción y Caracterización Fenotípica de Células CAR-T

4.1.1 *Obtención de Material Biológico Primario*

La fase de recolección de muestras biológicas se llevó a cabo en estricto cumplimiento de los lineamientos bioéticos nacionales e internacionales para la investigación en seres humanos. El protocolo del estudio, así como el formato de consentimiento informado, contaron con la aprobación y aval del Comité de Ética en Investigación Científica (CEINCI) de la Universidad Industrial de Santander (UIS). Para la conformación del grupo de estudio, se seleccionaron cuatro donantes voluntarios sanos, con edades comprendidas entre los 18 y 65 años, residentes en el departamento de Santander. Previo a la toma de muestra, el investigador a cargo socializó con cada participante los objetivos del proyecto, así como los procedimientos, beneficios y riesgos mínimos asociados a la venopunción. Una vez verificada la comprensión de la información, se procedió a la firma del consentimiento informado por duplicado, el cual puede consultarse en el Apéndice B, garantizando la autonomía de los participantes y su derecho a retirarse del estudio en cualquier momento sin perjuicio alguno. De acuerdo con lo establecido en la Ley 1751 de 2015 y las normativas vigentes de hábeas data, se aseguró la absoluta confidencialidad y el anonimato de los donantes. Las muestras y la información recolectada fueron codificadas mediante un sistema alfanumérico, impidiendo la identificación individual de los participantes en el procesamiento de datos y en la divulgación de los resultados científicos. A partir de estos donantes autorizados, se procedió a la recolección de sangre venosa periférica mediante sistema de vacío en tubos con anticoagulante (K2-EDTA), iniciando de inmediato el protocolo de aislamiento celular descrito anteriormente. La integridad celular y la pureza visual de las muestras procesadas se documentaron mediante microscopía de campo claro durante el conteo automatizado. Como se evidencia en la Figura 4, correspondientes al aislamiento del cuarto

participante, las células recuperadas exhibieron una morfología uniforme, esférica y refringente, característica de linfocitos viables en reposo, con una notable ausencia de detritos celulares o contaminación por eritrocitos. Tras el proceso de selección negativa, se evaluó la eficiencia del aislamiento, confirmando mediante citometría de flujo espectral que la pureza de la subpoblación de linfocitos T CD3⁺ fue del 97 % en todos los participantes evaluados, como se evidencia en la Figura 5.

Figura 4

Morfología de linfocitos T purificados del participante 4.

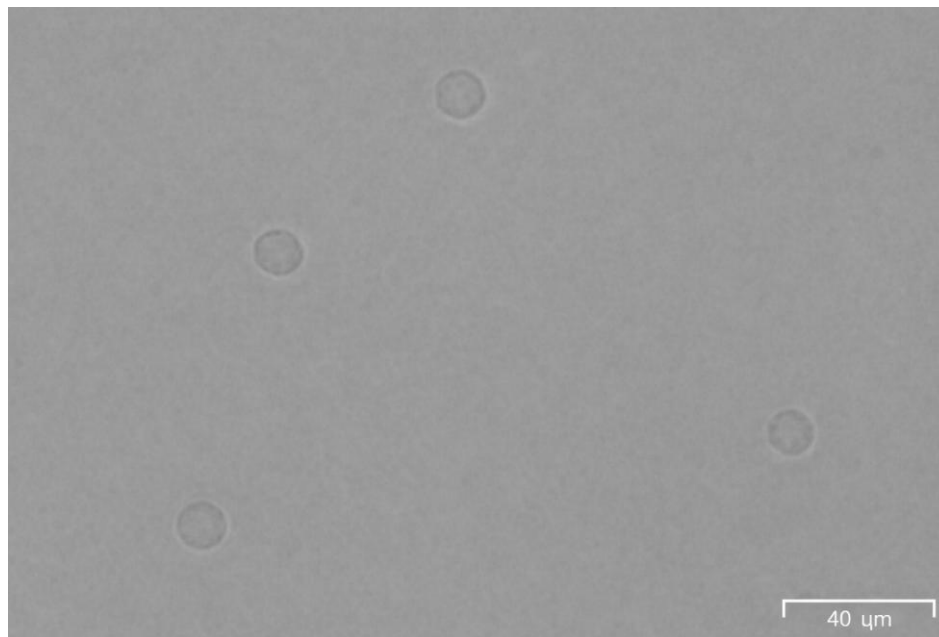
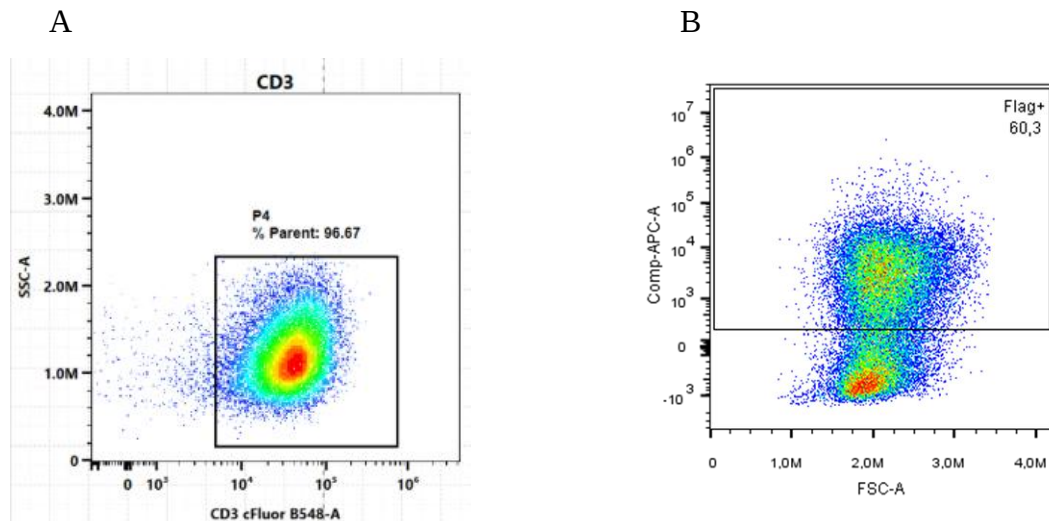


Figura 5

Eficiencia del aislamiento de linfocitos T purificados y porcentaje de células que expresaron el CAR CD19 41BB del participante 4.



Nota. Estrategia de análisis por citometría de flujo espectral para el control de calidad del producto celular. (A) Evaluación de la pureza celular mediante selección negativa; el gráfico de puntos muestra una eficiencia de purificación del 96,67% de linfocitos T CD3⁺ en la población seleccionada. (B) Determinación de la eficiencia de transducción lentiviral; evidenciando que el 60,3% de la población celular expresa de forma estable el constructo CAR anti-CD19 41BB (Flag+). Los datos corresponden a los análisis de eventos adquiridos en un citómetro espectral tras la exclusión previa de dobletes y células muertas.

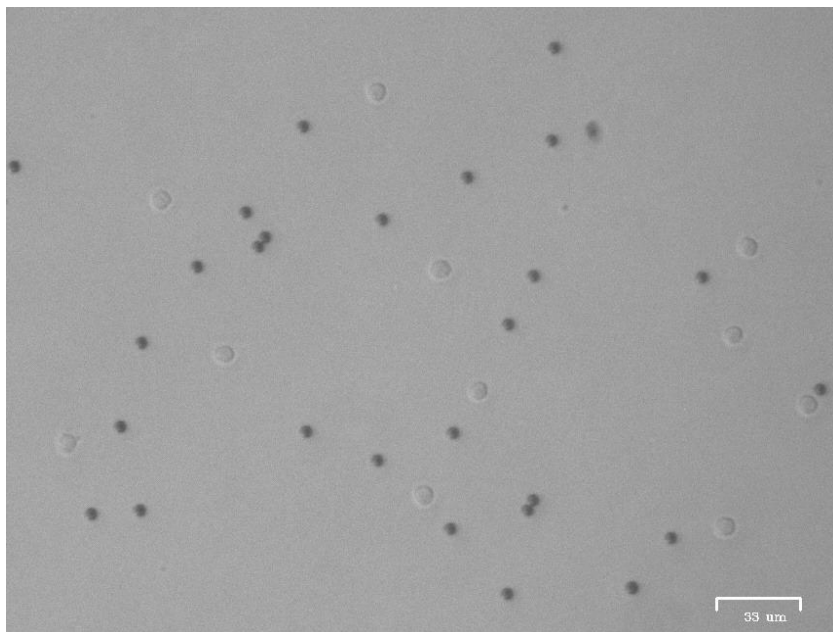
Una vez confirmada la viabilidad de los linfocitos T CD3⁺ (Apéndice C) y completada la transducción viral en los participantes 3 y 4, las células se sometieron a un proceso de criopreservación. Posteriormente, tras la descongelación del material biológico, se procedió al acondicionamiento farmacológico. El propósito de este paso fue inducir una reprogramación metabólica temprana durante la reactivación celular, definiendo las condiciones que influirían en el fenotipo final de las células CAR T.

4.2. Ingeniería Genética y Manufactura Celular

La implementación del protocolo de manufactura celular estandarizado por el IDCBIS, empleando el constructo lentiviral CAR anti-CD19 41BB de su propiedad, permitió obtener una población de linfocitos CAR T con alta eficiencia de transducción y viabilidad óptima (Figura 5), garantizando la homogeneidad necesaria para las fases de acondicionamiento y evaluación metabólica subsiguientes. El uso de perlas de activación (CD3/CD28), combinado con una multiplicidad de infección calculada (MOI: 4–6) y la adición de sulfato de protamina, aseguró una transducción eficiente sin comprometer la viabilidad celular inicial (Figura 6).

Figura 6

Activación in vitro de linfocitos T mediante microesferas magnéticas anti-CD3/CD28.



Nota. Micrografía de campo claro donde se evidencia la adhesión de las perlas anti-CD3/CD28 a la superficie celular, mimetizando la presentación antigénica para inducir la proliferación de los linfocitos T purificados.

4.3. Caracterización Inmunofenotípica de linfocitos T purificados y linfocitos CAR T anti-CD19

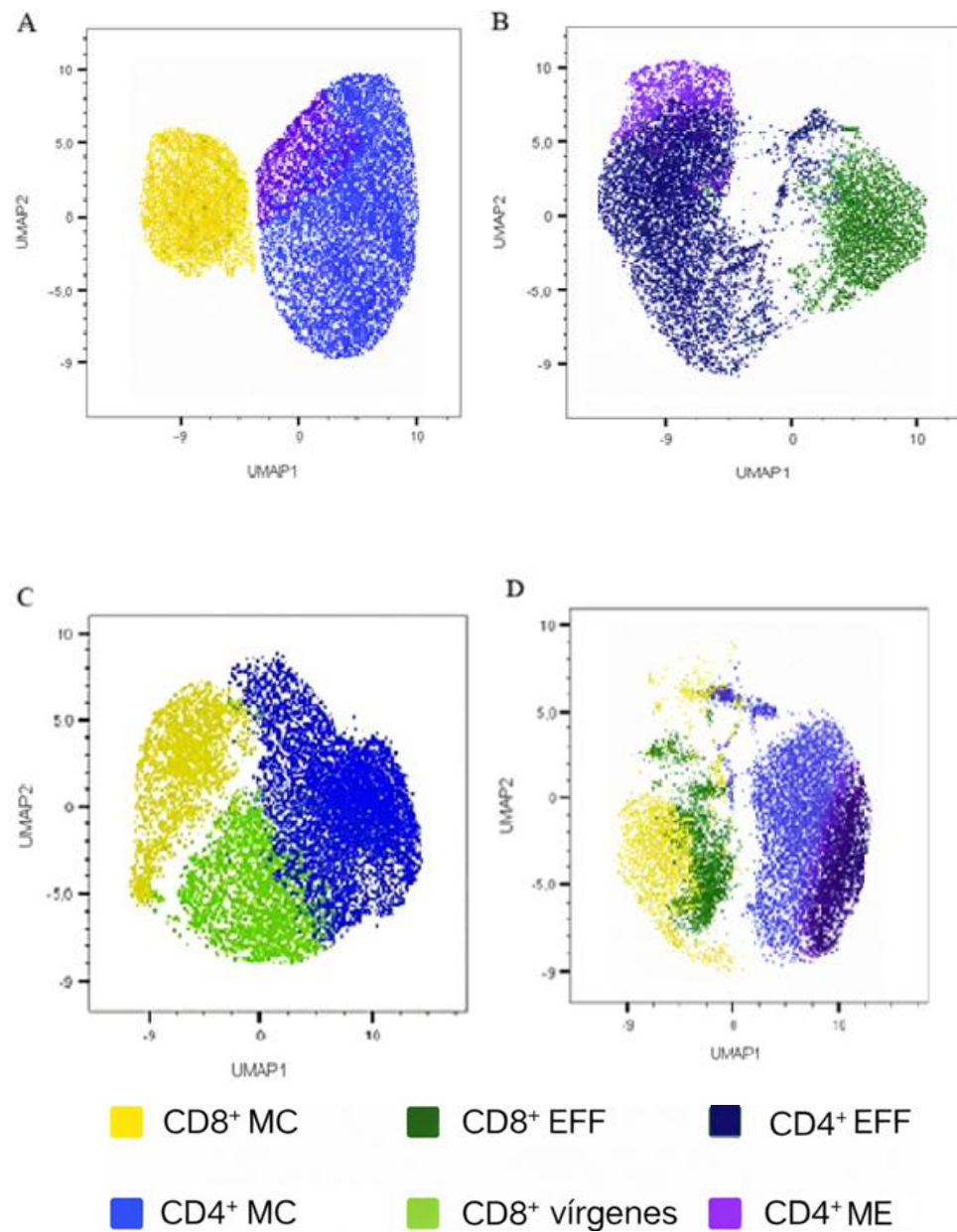
Para el análisis comparativo de la evolución fenotípica, se incluyeron las muestras biológicas provenientes de los cuatro participantes del estudio. La estrategia de evaluación se estructuró en dos tiempos experimentales críticos:

- Caracterización basal (Día 0): Se realizó una medición inicial inmediatamente después de la purificación de los linfocitos T, con el fin de establecer el perfil de distribución de subpoblaciones de partida previo a cualquier manipulación.
- Caracterización post tratamiento (Día 9): Se efectuó la medición final tras completar el período de expansión celular, comparando el efecto de la modulación con metformina frente a los controles (DMSO y UK-5099) y la condición basal.

El procesamiento de los archivos FCS y el análisis de datos se llevaron a cabo utilizando el software FlowJo v10. Para visualizar la complejidad fenotípica y detectar transiciones discretas entre estados celulares, se ejecutó el algoritmo de reducción de dimensionalidad UMAP. Los resultados obtenidos mostraron que el inmunofenotipo experimentó variaciones significativas a lo largo del tiempo y tras los tratamientos farmacológicos. La citometría de flujo espectral evidenció una reorganización de los compartimentos celulares entre la toma basal y el día 9 de expansión, revelando patrones de diferenciación específicos inducidos por la modulación metabólica con metformina y UK-5099 en comparación con los controles para los diferentes participantes (Figura 7-10).

Figura 7

Inmunofenotipo de linfocitos T purificados del Participante 1 visualizado mediante UMAP.

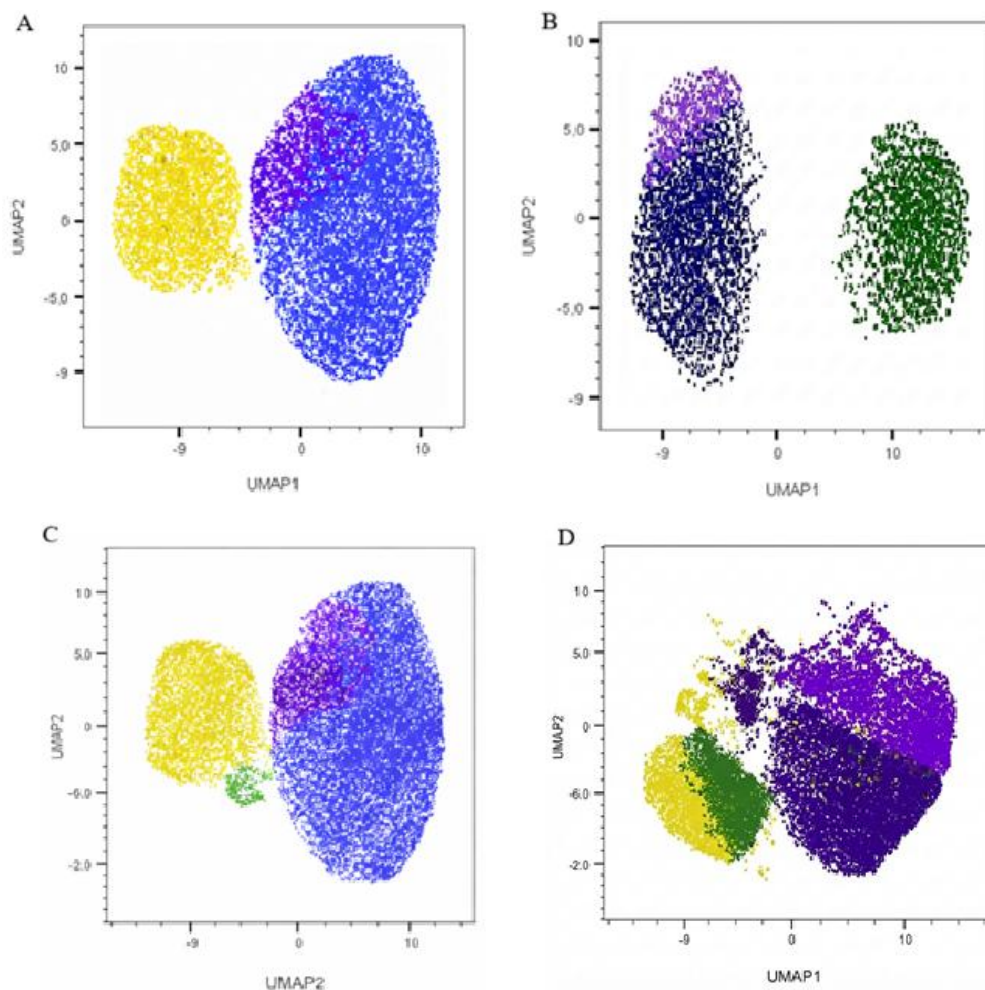


Nota. UMAP del inmunofenotipo de linfocitos T del participante uno, obtenida a partir de citometría de flujo espectral. El panel A corresponde al estado basal en el día 0, previo a la exposición a los tratamientos. En este, el color amarillo identifica linfocitos T CD8⁺ con fenotipo

de memoria central (MC), la población de mayor densidad corresponde a linfocitos T CD4⁺, donde el color azul representa MC y el morado claro, memoria efectora (ME). Los paneles B, C y D muestran la dinámica del inmunofenotipo tras nueve días de cultivo bajo las condiciones B) DMSO, C) UK-5099 y D) metformina. En estos, los linfocitos T CD8⁺ efectores finales (EFF) se muestran en verde oscuro, los linfocitos T CD8⁺ vírgenes en verde claro y los linfocitos T CD4⁺ EFF en morado oscuro.

Figura 8

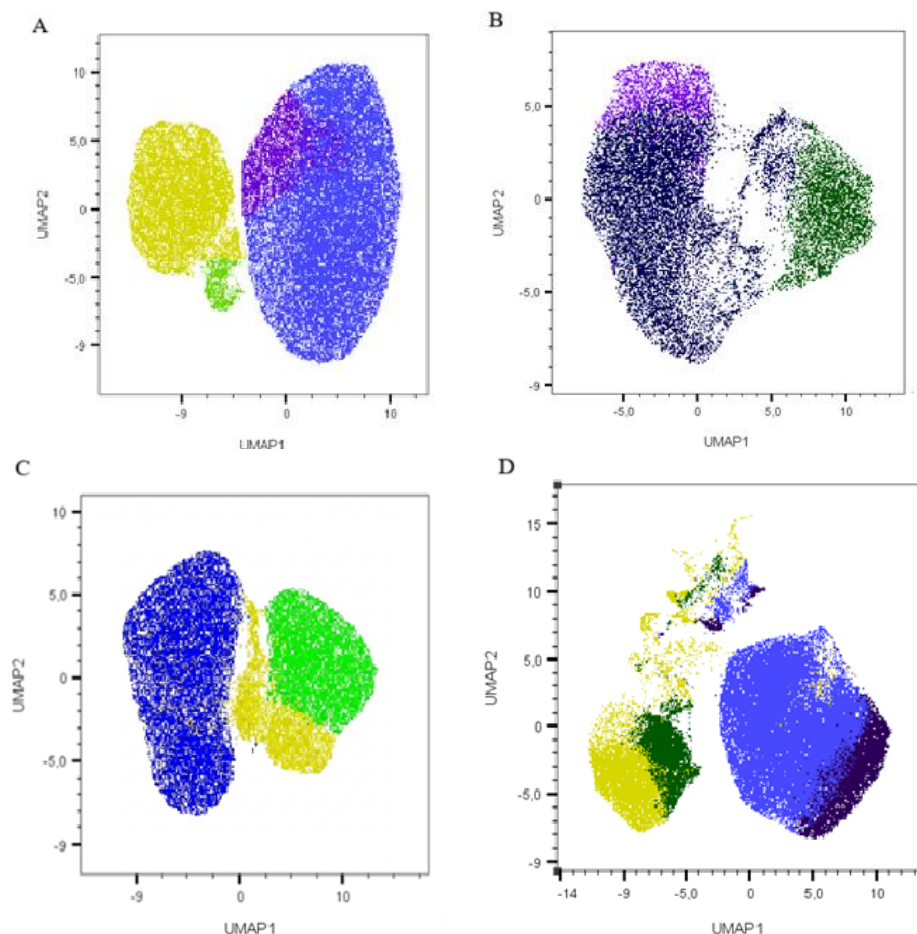
Inmunofenotipo de linfocitos T purificados del participante 2 visualizado mediante UMAP.



Nota. Los datos fueron obtenidos mediante citometría de flujo espectral. Las UMAP del inmunofenotipo de linfocitos T del participante uno se representan en el panel A, que corresponde al estado basal en el día 0, previo a la exposición a los tratamientos. En este, el color amarillo identifica linfocitos T CD8⁺ con fenotipo de MC; la población de mayor densidad corresponde a linfocitos T CD4⁺, donde el color azul representa MC y el morado claro, ME. Los paneles B, C y D muestran la dinámica del inmunofenotipo tras nueve días de cultivo bajo las condiciones DMSO, UK-5099 y metformina, respectivamente. En estos, los linfocitos T CD8⁺ EFF se muestran en verde oscuro, los linfocitos T CD8⁺ vírgenes en verde claro y los linfocitos T CD4⁺ EFF en morado oscuro.

Figura 9

Inmunofenotipo de linfocitos CAR T anti-CD19 del participante 3 visualizado mediante UMAP.

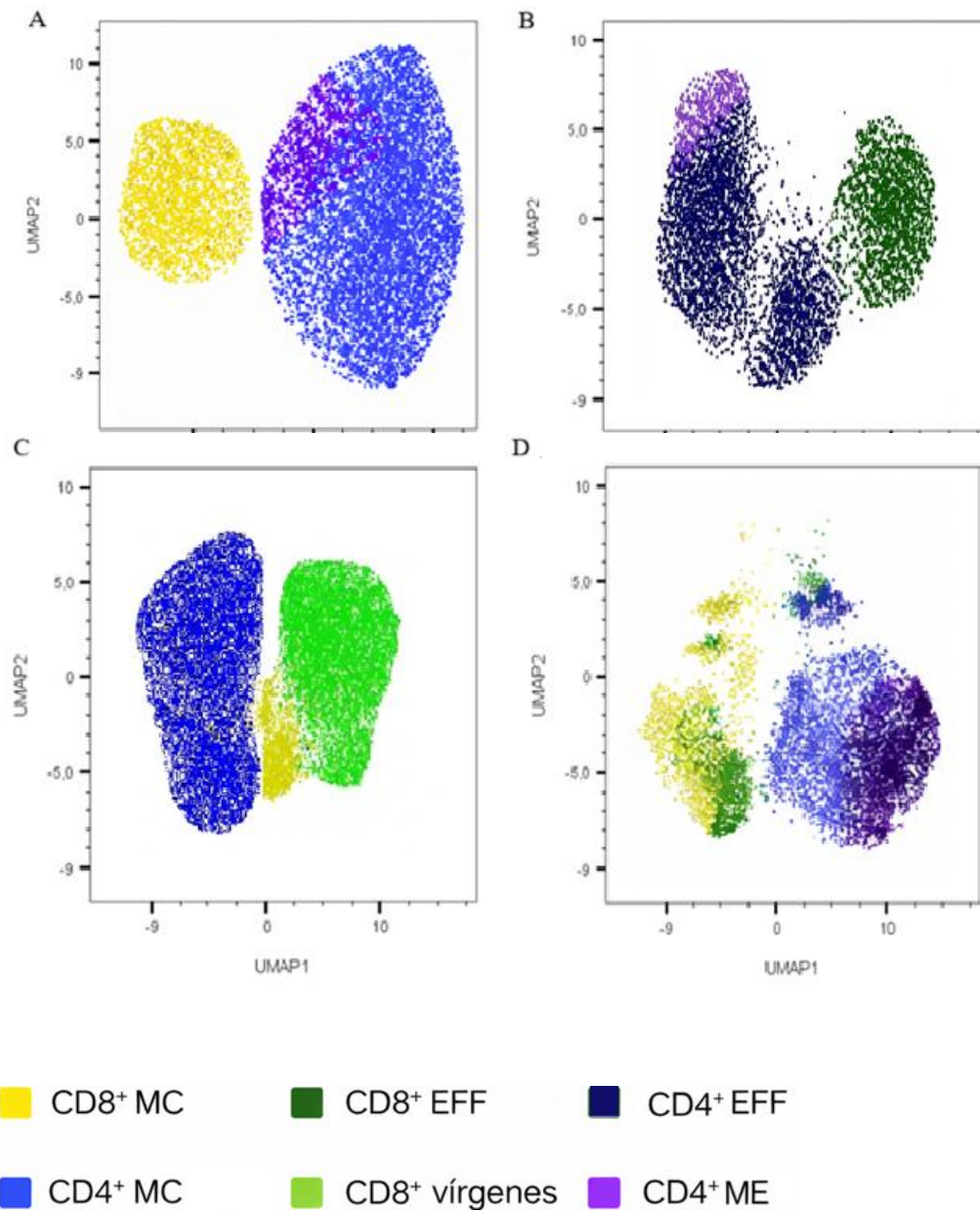




Nota. Los datos se obtuvieron mediante citometría de flujo espectral. (A) Estado basal (día 0) previo a la intervención de los linfocitos CAR T anti-CD19. En esta fase, se identifican linfocitos CD8⁺ MC en amarillo y vírgenes en verde claro; a su vez, la población de mayor densidad corresponde a linfocitos CAR T CD4⁺, subdivididos en MC de color azul y ME de color morado claro. (B-D) Dinámica del inmunofenotipo tras nueve días de expansión: en el control negativo DMSO (B), se distinguen las poblaciones en verde oscuro correspondientes a linfocitos CAR T CD8⁺ EFF. Adicionalmente, se aprecia una población en morado oscuro que representa a los linfocitos CAR T CD4⁺ EFF y finalmente, una población de muy baja densidad en morado claro que representa a los linfocitos CAR T CD4⁺ ME. (C) Por su parte, en el control positivo UK-5099, se hallaron poblaciones de linfocitos CAR T CD8⁺ vírgenes en verde claro y en amarillo, la población de linfocitos CAR T CD8⁺ MC; en este caso, el grupo de mayor densidad celular corresponde a los linfocitos CAR T CD4⁺ MC. (D) En lo que respecta al fármaco metformina, se destacan en verde oscuro los linfocitos CAR T CD8⁺ EFF y en morado oscuro los linfocitos CAR T CD4⁺ EFF, así como linfocitos CAR T CD8⁺ MC en amarillo y la población de linfocitos CAR T CD4⁺ MC en color azul.

Figura 10

Inmunofenotipo de linfocitos CAR T anti-CD19 del participante 4 visualizado mediante UMAP.



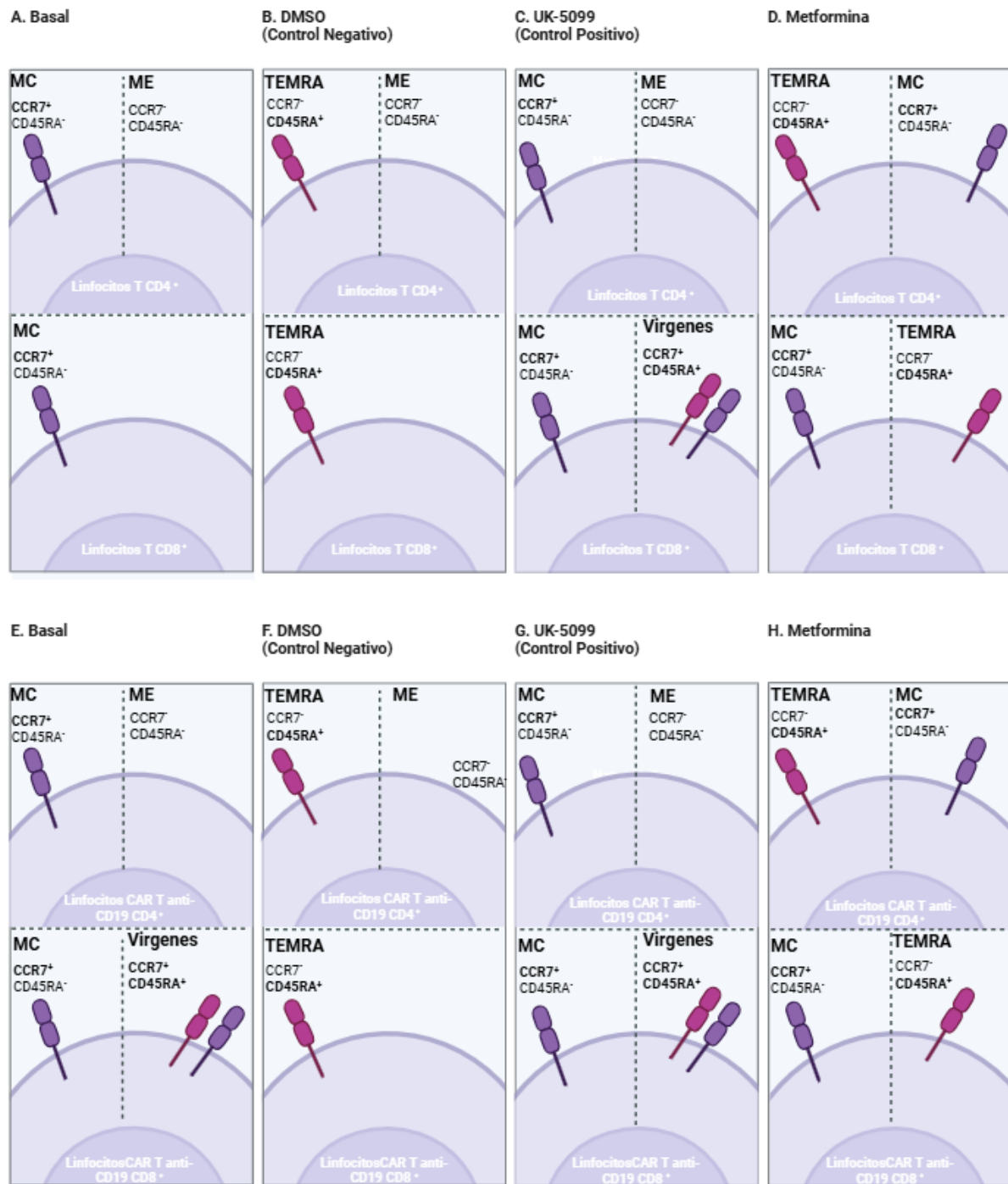
Nota. Los datos se recabaron mediante citometría de flujo espectral. (A) Estado basal (día 0) previo a la intervención de los linfocitos CAR T anti-CD19. En esta fase, se identifican linfocitos CD8⁺ MC en amarillo y vírgenes en verde claro; a su vez, la población de mayor densidad corresponde a linfocitos CAR T CD4⁺, subdivididos en MC de color azul y ME en morado claro.

(B-D) Dinámica del inmunofenotipo tras nueve días de expansión: (B) en el control negativo DMSO, se distinguen las poblaciones en verde oscuro correspondientes a linfocitos CAR T CD8⁺ EFF. Adicionalmente, se aprecia una población en morado oscuro que representa a los linfocitos CAR T CD4⁺ EFF y finalmente, una población de muy poca densidad en morado claro que representa a los linfocitos CAR T CD4⁺ ME. (C) En lo que respecta al control positivo UK-5099, se encontraron poblaciones de linfocitos CAR T CD8⁺ vírgenes en verde claro y en amarillo, la población de linfocitos CAR T CD8⁺ MC; en este caso, el grupo de La mayor densidad celular corresponde a los linfocitos CAR T CD4⁺ MC. (D) Por su parte, en verde oscuro se destacan los linfocitos CAR T CD8⁺ EFF y en morado oscuro los linfocitos CAR T CD4⁺ EFF, así como en amarillo los linfocitos CAR T CD8⁺ MC y en azul la población de linfocitos CAR T CD4⁺ MC.

La generación de estos UMAP se basó estrictamente en la expresión de los marcadores de superficie de linaje y memoria: CD4, CD8, CCR7 y CD45RA. Esta aproximación permitió observar la dinámica de las diferentes poblaciones y evidenciar los cambios en el inmunofenotipo de memoria (vírgenes, memoria central, memoria efectora, efectores finales) (Figura 11), inducidos por el tratamiento a lo largo del tiempo.

Figura 11

Resumen esquemático del inmunofenotipo de linfocitos T y CAR T anti-CD19 CD4⁺ y CD8⁺ tras la modulación metabólica.



Nota. Representación esquemática de los cambios en el inmunofenotipo de linfocitos T convencionales y CAR T anti-CD19, CD4⁺ y CD8⁺, bajo diferentes condiciones experimentales:

basal, DMSO (control negativo), UK-5099 (control positivo) y metformina. Se muestran las principales subpoblaciones definidas por la expresión de CCR7 y CD45RA: células T de memoria central (MC; CCR7⁺CD45RA⁻), memoria efectora (ME; CCR7⁻CD45RA⁻), células vírgenes (CCR7⁺CD45RA⁺) y células T de memoria efectora con reexpresión de CD45RA (TEMRA; CCR7⁻CD45RA⁺). El esquema resume las tendencias observadas en la redistribución fenotípica inducida por cada tratamiento.

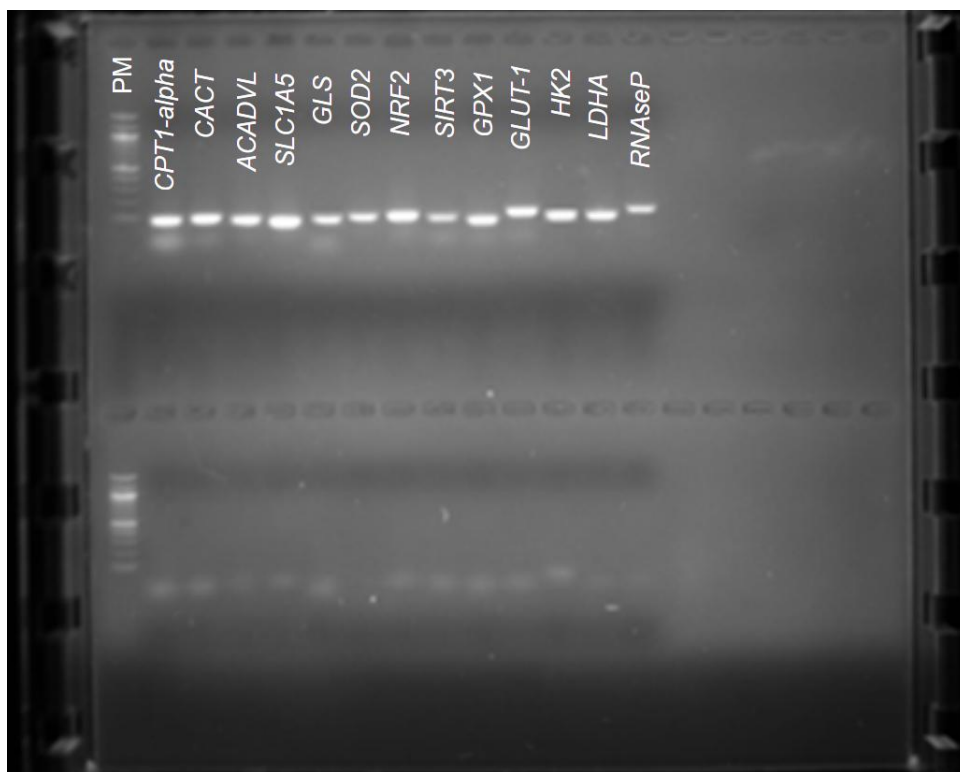
4.4 Fase II: Análisis Molecular del Perfil Metabólico

4.4.1 Validación de la Calidad del Material Genético

Para el análisis de la expresión génica diferencial asociada a la reprogramación metabólica, se procedió a la extracción del ARN total en el día 9 postratamiento. Las muestras se obtuvieron a partir del material biológico de los cuatro participantes, estratificados de la siguiente manera: linfocitos T purificados (participantes 1 y 2) y linfocitos CAR T anti-CD19 (participantes 3 y 4). Se empleó un sistema de purificación basado en columnas de sílice para garantizar la obtención de material genético libre de inhibidores y de alta integridad. Posteriormente, el ARN purificado fue sometido a un proceso de transcripción inversa (RT) utilizando un SuperMix optimizado, que incluyó pasos de eliminación de ADN genómico residual y controles sin enzima (No-RT), asegurando así la síntesis exclusiva de ADNc complementario para su posterior cuantificación absoluta mediante PCR digital (Figura 12).

Figura 12

Validación de la especificidad de los cebadores y control de contaminación de ADN genómico mediante PCR de punto final.



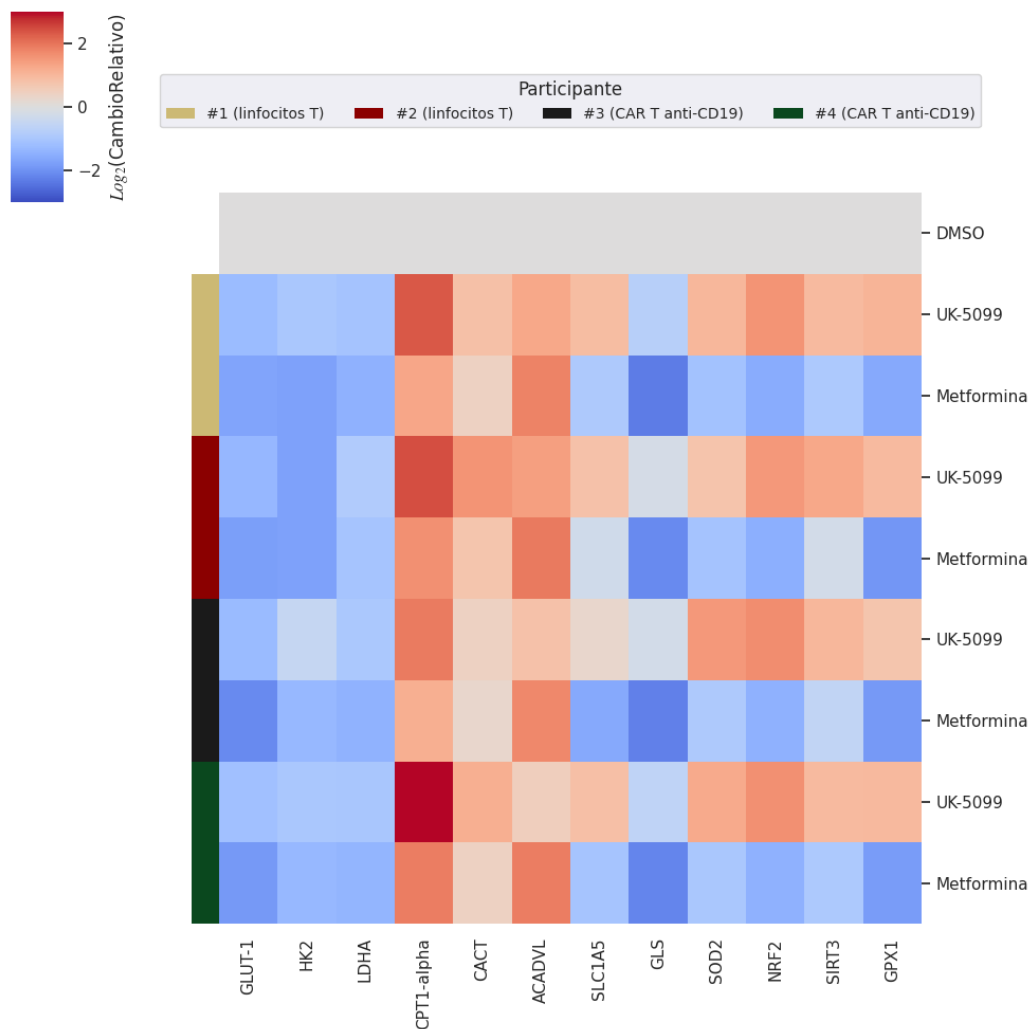
Nota. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % de los productos de amplificación de los genes seleccionados para el perfil metabólico. Distribución de carriles: PM: Marcador de peso molecular. Los carriles adyacentes corresponden, en orden de izquierda a derecha, a los genes: *CPT1-alpha*, *CACT*, *ACADVL* (Beta-oxidación); *SLC1A5*, *GLS* (Metabolismo de aminoácidos); *SOD2*, *NRF2*, *SIRT3*, *GPX1* (Defensa antioxidante); *GLUT-1*, *HK2*, *LDHA* (Glucólisis) y *RNaseP* (gen constitutivo).

4.4.1.1 Cuantificación Absoluta de la Expresión Génica. Luego de confirmar la integridad del ARN extraído y la ausencia de contaminación genómica, se cuantificó la expresión génica absoluta mediante el sistema de PCR digital en gotas. Esta metodología de alta sensibilidad permitió determinar el número exacto de copias de transcritos representativos de vías metabólicas centrales, incluyendo la glucólisis. (*GLUT-1*, *HK2* y *LDHA*), beta-oxidación (*CPT1- α* , *CACT* y *ACADVL*), metabolismo de glutamina (*SLC1A5* y *GLS*) y defensa antioxidante mitocondrial (*SOD2*, *NRF2*, *SIRT3* y *GPX1*), empleando *RNaseP* como gen

constitutivo. El análisis se centró en evaluar las diferencias en la carga transcripcional entre linfocitos T purificados y linfocitos CAR T anti-CD19 sometidos a modulación farmacológica con metformina y UK-5099 (Figura 13).

Figura 13

Perfil de expresión génica metabólica en linfocitos T purificados y linfocitos CAR T anti-CD19.



Nota. Mapa de calor de la expresión génica relativa cuantificada mediante ddPCR. La escala de color refleja la dirección y magnitud de la regulación génica (expresada como log₂ fold-change) tras el acondicionamiento metabólico con metformina o UK-5099 durante nueve días,

normalizado respecto al control negativo (DMSO). Se observa un patrón de modulación génica dependiente del tratamiento, lo que evidencia la plasticidad basal y las diferencias en la magnitud de la regulación entre participantes. Los datos evidencian cambios robustos en genes asociados al metabolismo y la respuesta redox frente a los fármacos.

4.5 Fase III: Evaluación Funcional y Potencial Citotóxico

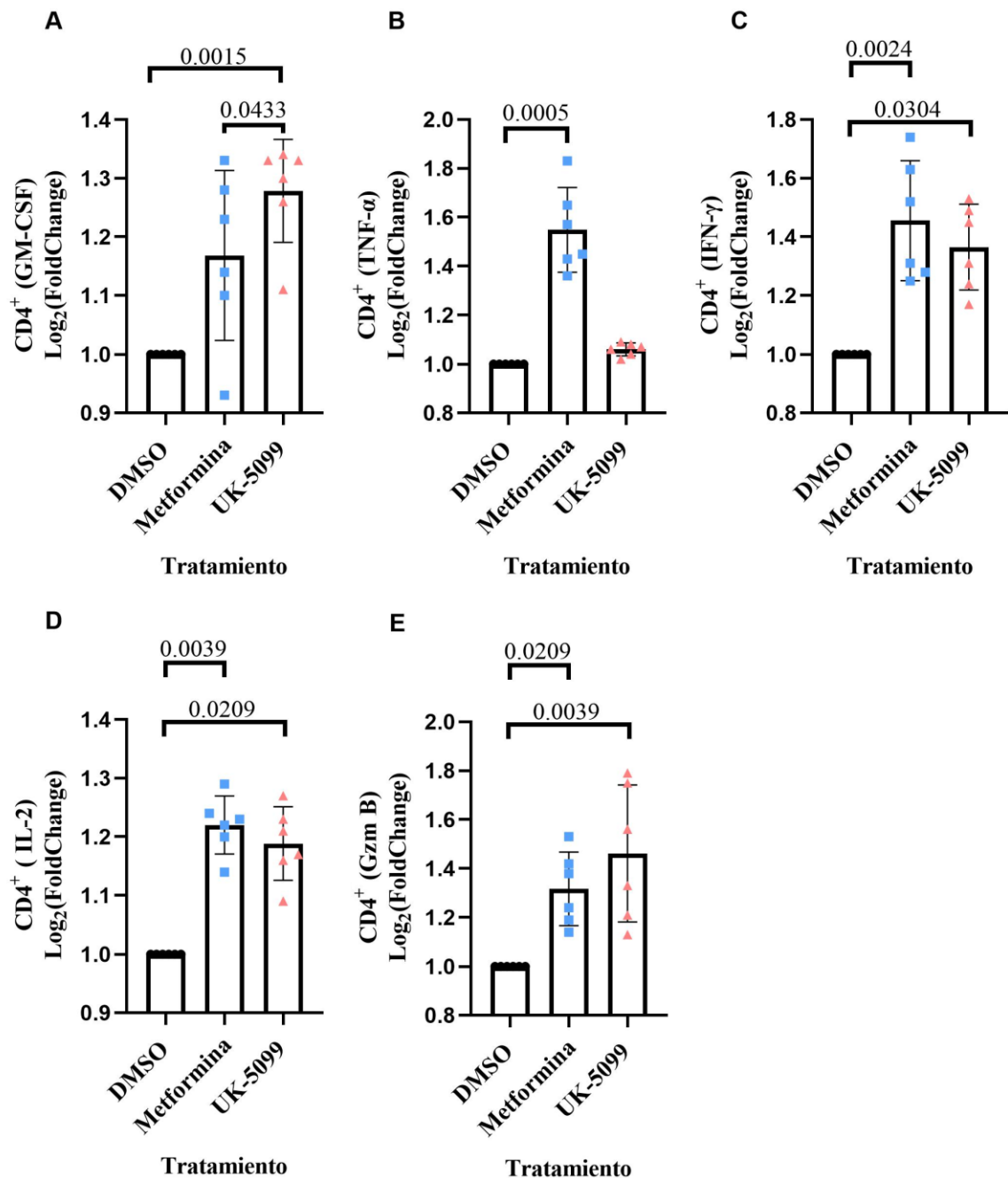
Luego de establecer que los tratamientos con los fármacos metformina y UK-5099 respectivamente inducen una modulación metabólica hacia la oxidación de ácidos grasos y la defensa antioxidante, se procedió a determinar el impacto biológico de estos cambios en la competencia efectora de los linfocitos T purificados y los linfocitos CAR T anti-CD19. En esta fase, se evaluó la calidad funcional del producto celular mediante un ensayo de potencia *in vitro* bajo condiciones de re-estimulación antigénica forzada. El objetivo central fue correlacionar la firma metabólica de memoria previamente identificada, con una mejora en el perfil de polifuncionalidad (capacidad de secreción sostenida de citoquinas) y una reducción concomitante en los marcadores de agotamiento inmunológico, validando así la superioridad terapéutica de las células metabólicamente moduladas frente al fenotipo exhausto convencional.

4.5.1 Capacidad Citotóxica Postestímulo

La preservación de las funciones efectoras tras la exposición repetida al antígeno constituye el sello distintivo de una respuesta inmunitaria antitumoral eficaz y duradera. En este apartado se analizó el perfil de secreción de las citoquinas proinflamatorias IFN- γ y TNF- α , de la citoquina inmunomoduladora GM-CSF, del factor proliferativo IL-2 y del mediador citotóxico granzima B, en linfocitos T purificados y linfocitos CAR T anti-CD19 sometidos a reestimulación mediante el sistema de perlas anti-CD3/anti-CD28 (Figuras 14 -17).

Figura 14

Perfil de secreción de citoquinas en linfocitos T CD4⁺ de los participantes uno y dos, sometidos a modulación metabólica in vitro.

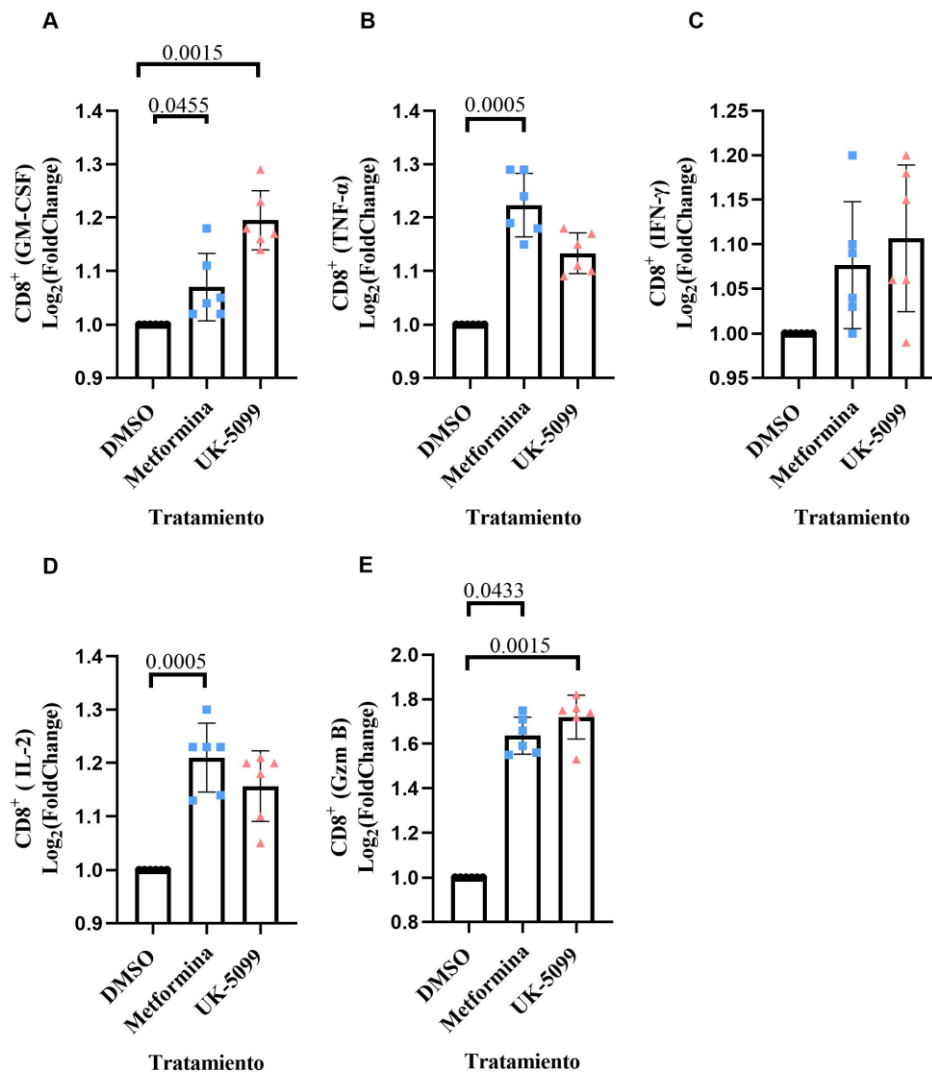


Nota. Cuantificación de la respuesta efectora en linfocitos T CD4⁺ purificados mediante citometría de flujo espectral con tinción intracelular, tras reestimulación antigénica mediada por

perlas recubiertas con anti-CD3/anti-CD28. Los datos se expresan como $\log_2$ (fold change) de las intensidades medias de fluorescencia MFI (del inglés mean fluorescence intensity) correspondientes a GM-CSF (A), TNF- α (B), IFN- γ (C), IL-2 (D) y granzima B (E), normalizadas respecto al control de referencia tratado con DMSO. Cada punto representa un donante independiente; las barras indican la media $\pm$ error estándar de la media (SEM). Los valores de p significativos se muestran sobre las comparaciones indicadas.

Figura 15

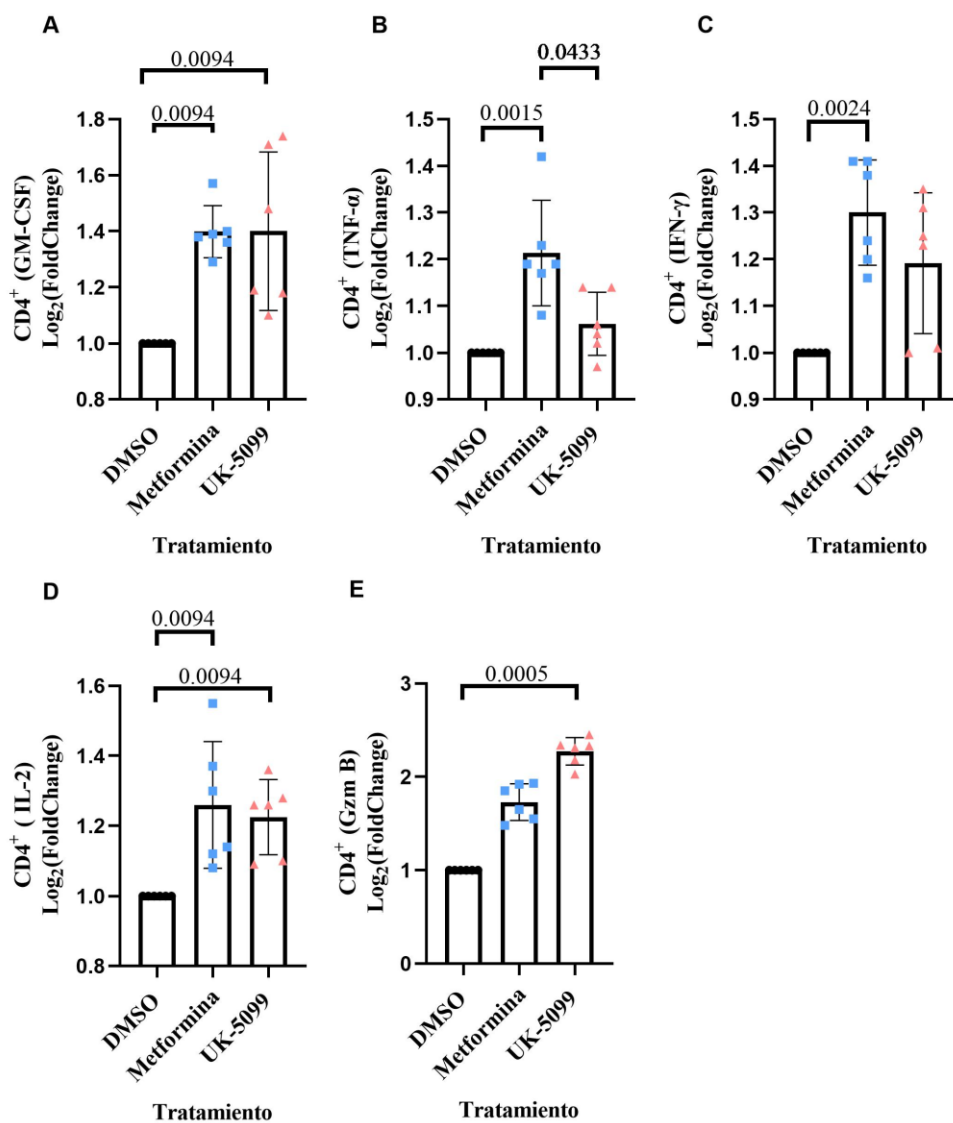
Perfil de secreción de citoquinas en linfocitos T CD8⁺ de los participantes uno y dos, sometidos a modulación metabólica in vitro.



Nota. Cuantificación de la respuesta efectora en linfocitos T CD8⁺ purificados mediante citometría de flujo espectral con tinción intracelular, tras reestimulación antigénica mediada por perlas anti-CD3/anti-CD28. Los datos se expresan como log₂ (fold change) de las MFI, de GM-CSF (A), TNF- α (B), IFN- γ (C), IL-2 (D) y granzima B (E), normalizadas respecto al control de referencia tratado con DMSO. Cada punto representa un donante independiente; las barras indican la SEM. Los valores de p significativos se muestran sobre las comparaciones indicadas.

Figura 16

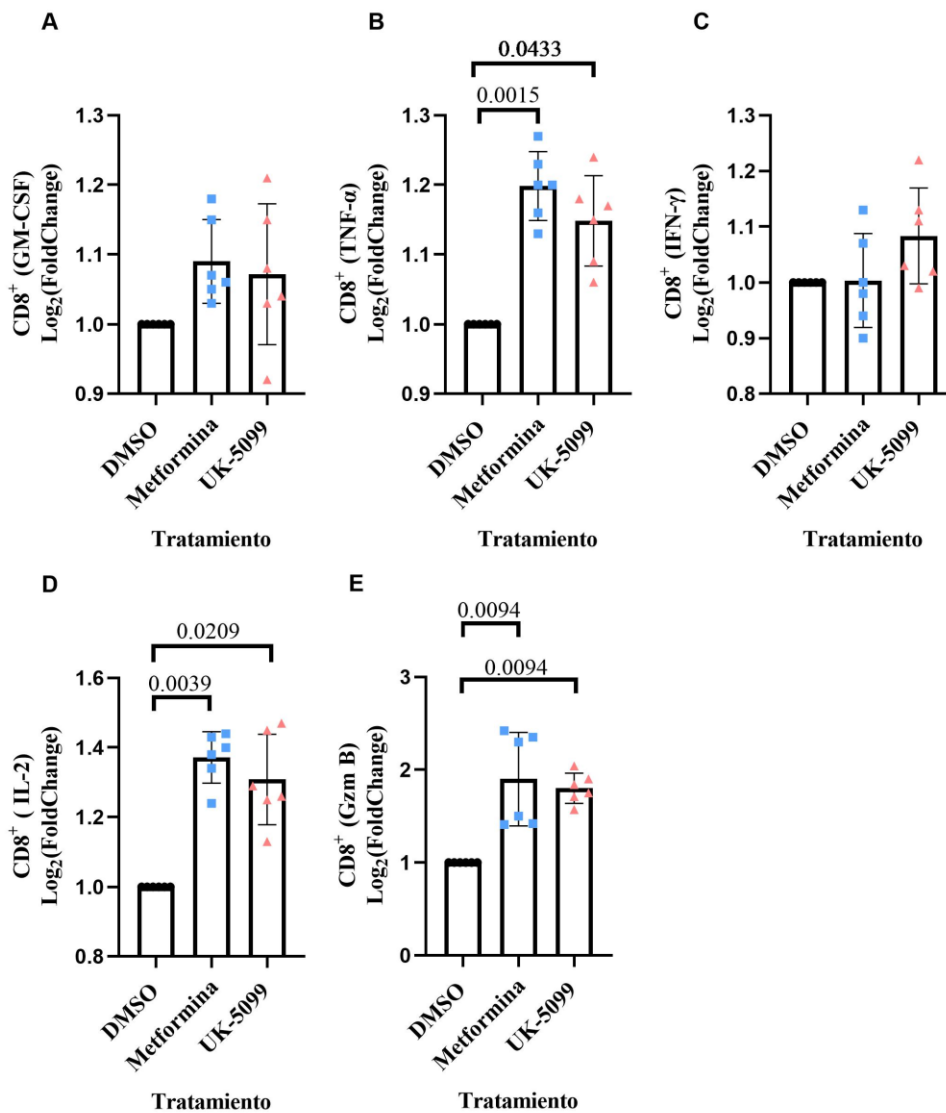
Perfil de secreción de citoquinas en linfocitos CAR T anti-CD19 CD4⁺ de los participantes tres y cuatro, sometidos a modulación metabólica in vitro.



Nota. Cuantificación de la respuesta efectora en linfocitos CAR T anti-CD19 CD4⁺ mediante citometría de flujo espectral con tinción intracelular, tras reestimulación antigénica mediada por perlas anti-CD3/anti-CD28. Los datos se expresan como *fold change* de las MFI de GM-CSF (A), TNF- α (B), IFN- γ (C), IL-2 (D) y granzima B (E), normalizadas respecto al control tratado con DMSO. Las barras indican la SEM. Los valores de p significativos se muestran sobre las comparaciones indicadas.

Figura 17

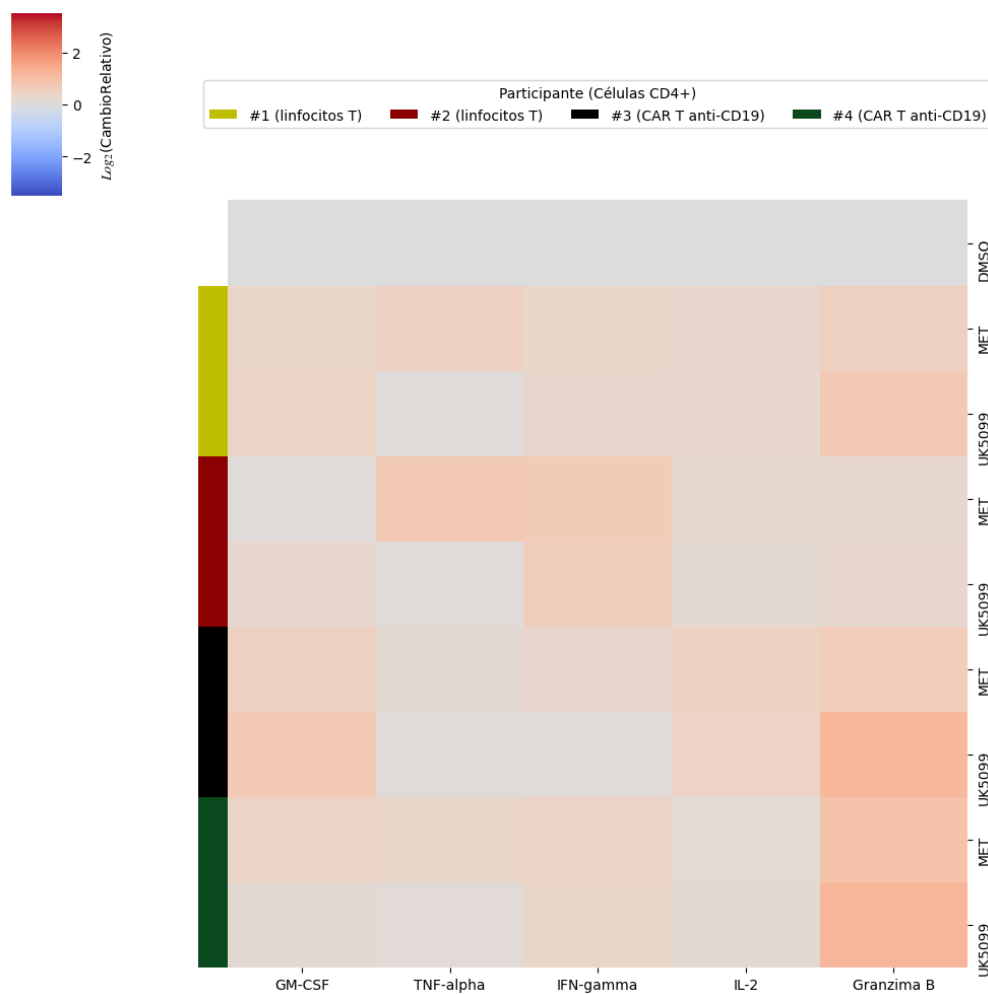
Perfil de secreción de citoquinas en linfocitos CAR T anti-CD19 CD8⁺ de los participantes tres y cuatro, sometidos a modulación metabólica in vitro.



Nota. Cuantificación de la respuesta efectora en linfocitos CAR T anti-CD19 CD8⁺ mediante citometría de flujo espectral con tinción intracelular, tras reestimulación antigénica mediada por perlas anti-CD3/anti-CD28. Los datos se expresan como *fold change* de las MFI de GM-CSF (A), TNF- α (B), IFN- γ (C), IL-2 (D) y granzima B (E), normalizadas respecto al control tratado con DMSO. Las barras indican la SEM. Los valores de p significativos se muestran sobre las comparaciones indicadas.

Figura 18

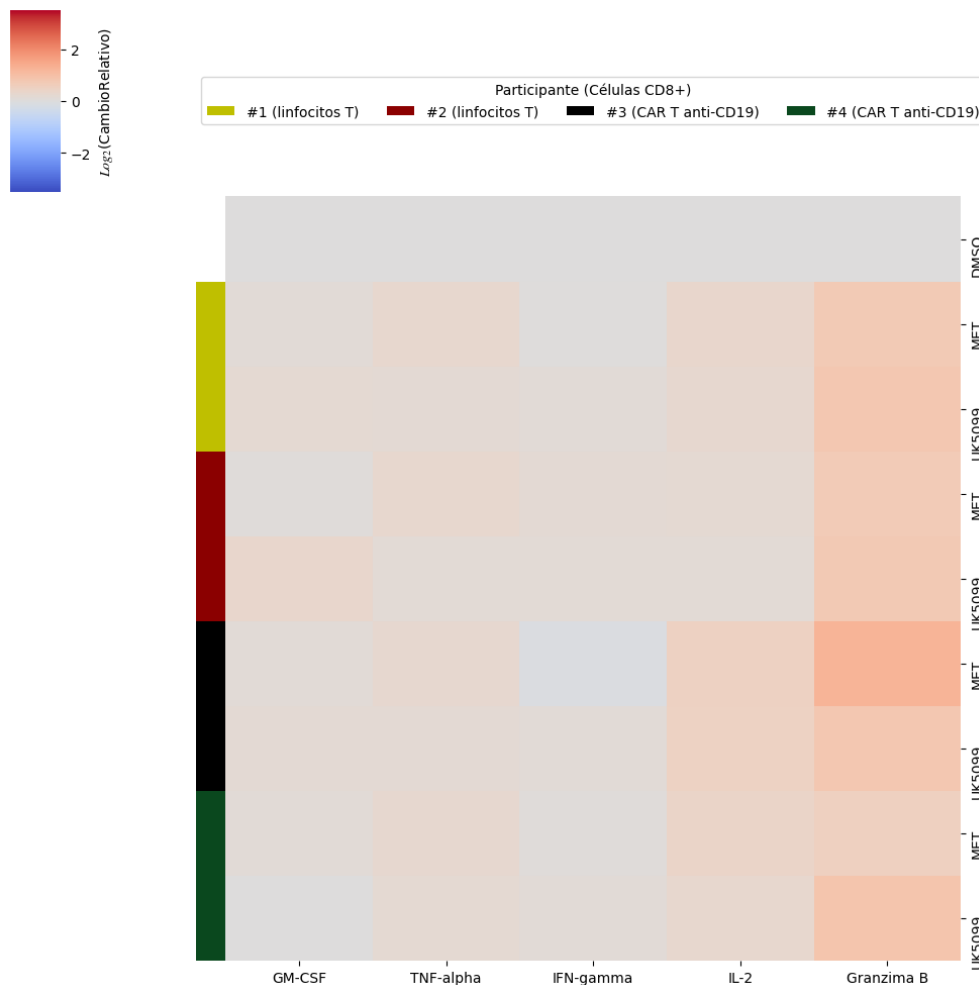
Dinámica de secreción de citoquinas en subpoblaciones T CD4⁺ tras la reprogramación metabólica.



Nota. Mapa de calor de resumen de los cambios relativos (fold change) en la MFI de citoquinas intracelulares en linfocitos T purificados y en linfocitos CAR T anti-CD19 de la subpoblación CD4⁺, postestímulo, bajo condiciones de DMSO (control negativo), tratamiento con metformina o UK-5099 (control positivo). Los valores están normalizados respecto al control y se expresan como *fold change*, donde los incrementos se visualizan en tonalidades rojas y las disminuciones en tonalidades azules. En la fracción CD4⁺, ambos tratamientos inducen una modulación funcional coordinada caracterizada por el aumento relativo de IL-2 junto con la expresión de citoquinas efectoras como TNF- α e IFN- γ .

Figura 19

Dinámica de secreción de citoquinas en subpoblaciones T CD8⁺ tras la reprogramación metabólica.



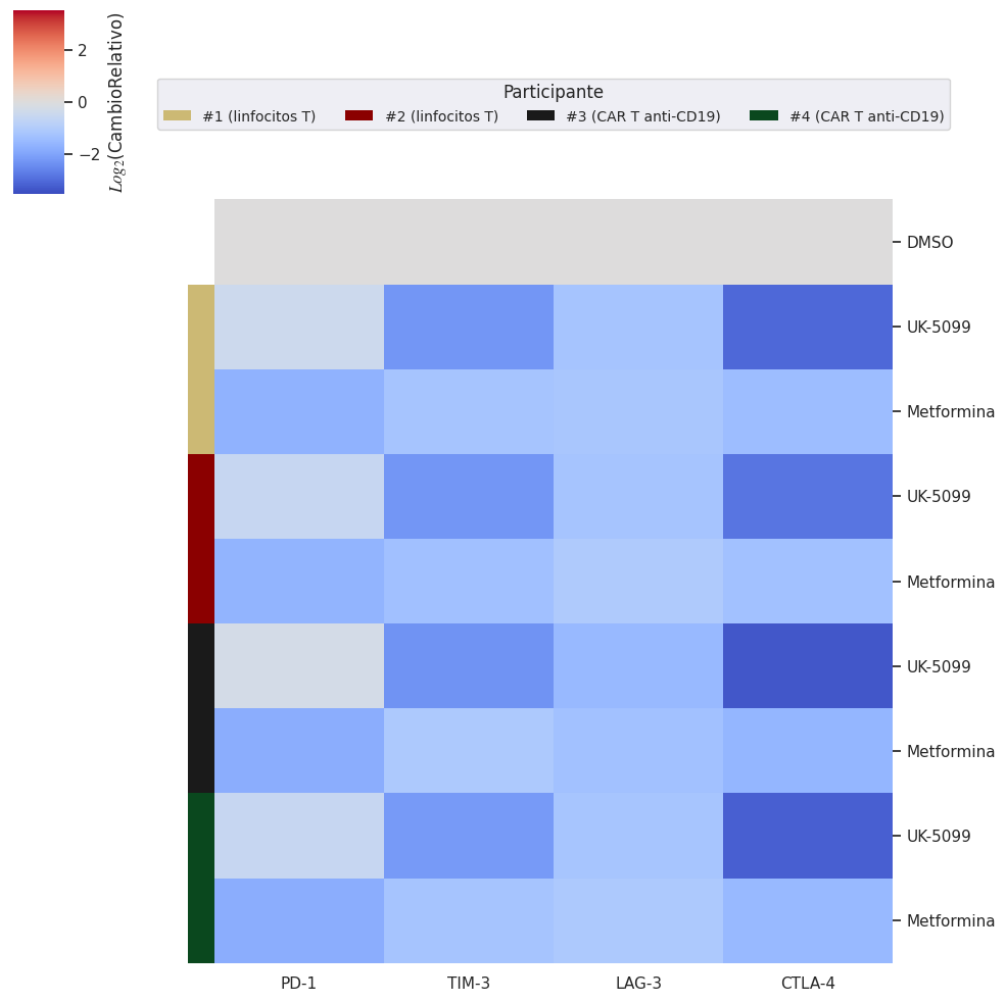
Nota. Mapa de calor resumen representativos del cambio relativo (*fold change*) en la MFI de citoquinas intracelulares en linfocitos T purificados y linfocitos CAR T anti-CD19 subpoblación CD8⁺, postestímulo bajo condiciones de DMSO (control negativo), tratamiento con metformina o UK-5099 (control positivo). Los valores están normalizados respecto al control y se expresan como *fold change*, donde los incrementos se visualizan en tonalidades rojas y las disminuciones en tonalidades azules. En las células CD8⁺, la reprogramación metabólica se asocia principalmente con un aumento marcado de Granzima B, acompañado por la modulación de IL-2, lo que define un perfil citotóxico polifuncional. Esta combinación refleja una integración eficiente entre capacidad efectora inmediata y soporte proliferativo, rasgo característico de linfocitos CD8⁺ no agotados y con elevada aptitud antitumoral.

4.5.1.1 Modulación del perfil de agotamiento inmunológico y expresión de receptores inhibitorios. El agotamiento de los linfocitos T se define como un destino de diferenciación disfuncional que emerge ante la persistencia antigénica crónica y la señalización persistente del TCR (Jiang et al., 2015). Este estado se caracteriza por una insuficiencia efectora progresiva y la expresión coordinada de una red de receptores de coinhibición o puntos de control inmunológico, que actúan de manera sinérgica para atenuar la respuesta inmune (Jiang et al., 2015). Entre estos mediadores proteicos, destacan por su relevancia diagnóstica y funcional la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) (del inglés Programmed Cell Death Protein 1) , el gen de activación de linfocitos 3 (LAG-3) (del inglés Lymphocyte Activation Gene 3 Protein), la proteína de dominio de inmunoglobulina y mucina de células T 3 (TIM-3) (del inglés T-cell Immunoglobulin Domain and Mucin Domain Protein 3) y el antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA-4) (del inglés Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4) (Jiang et al., 2015). En investigaciones recientes, sugieren que esta transición fenotípica está íntimamente

ligada a una crisis bioenergética y al estrés mitocondrial (Scharping et al., 2017). En consecuencia, la evaluación de estos marcadores es fundamental para determinar si el acondicionamiento metabólico propuesto preserva la aptitud funcional de los linfocitos T purificados y de las células CAR T anti-CD19. Los hallazgos derivados de la determinación de la carga transcripcional absoluta mediante ddPCR para los genes asociados al programa de agotamiento se detallan a continuación:

Figura 20

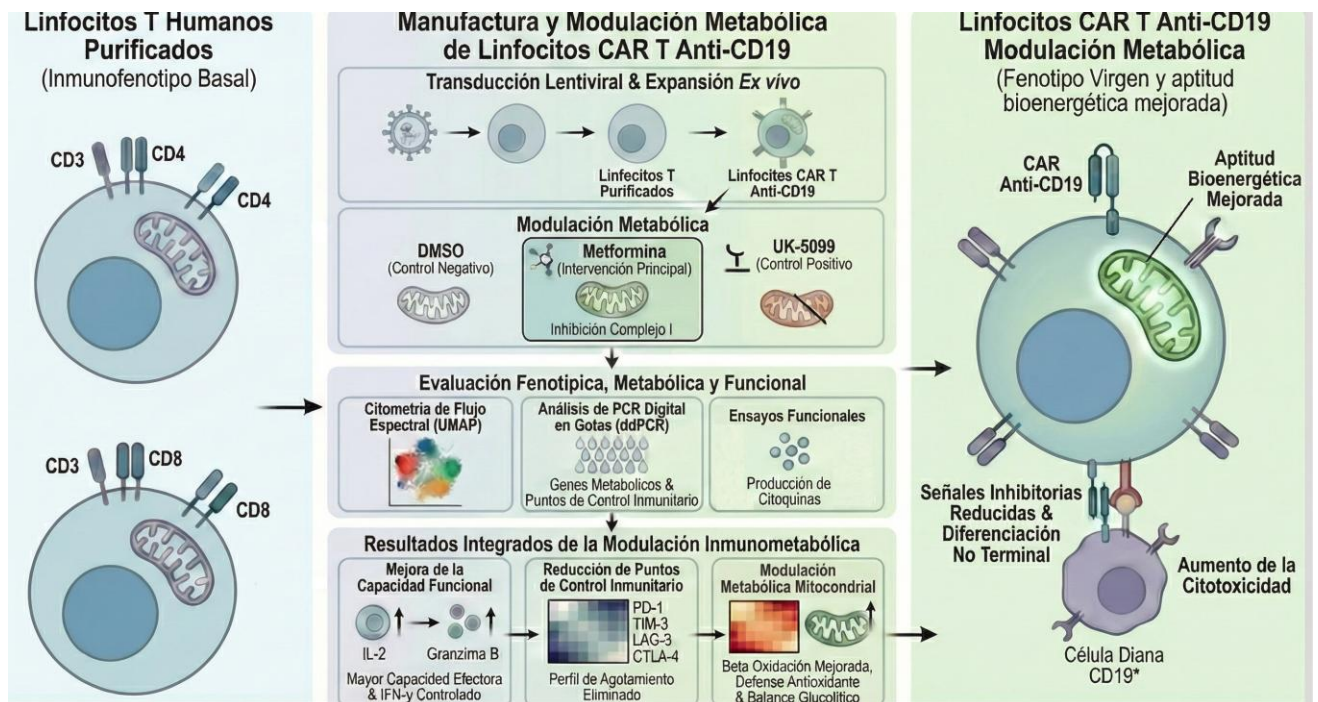
Modulación de la expresión de receptores inhibitorios asociados al agotamiento inmunológico en linfocitos T purificados y linfocitos CAR T anti-CD19 luego de modulación metabólica, participante uno.



Nota. Mapa de calor de la expresión génica relativa de los marcadores de agotamiento PD-1, TIM-3, LAG-3 y CTLA-4. Los datos se presentan como el cambio relativo en escala logarítmica ($\log_2$ fold-change) tras nueve días de acondicionamiento metabólico con metformina o con el control positivo UK-5099, normalizados respecto al control negativo (DMSO).

Figura 21

Esquema del impacto de la modulación inmunometabólica durante la manufactura de linfocitos CAR T anti-CD19.



Nota. Representación esquemática resumen del proceso de manufactura, modulación metabólica y evaluación funcional de linfocitos T purificado y linfocitos CAR T anti-CD19 humanos. A partir de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ purificados con inmunofenotipo basal, se realizó la transducción lentiviral y expansión ex vivo, seguida de una modulación metabólica utilizando metformina, DMSO y UK-5099. La caracterización fenotípica, metabólica y funcional se lleva a

cabo mediante citometría de flujo espectral, ddPCR para genes implicados en el metabolismo, puntos de control inmunitario y ensayo funcional de producción de citoquinas. La modulación inmunometabólica favorece la preservación de un fenotipo virgen en el tratamiento con UK-5099, mientras que las células acondicionadas con metformina presentan un fenotipo de MC, una bioenergética mejorada, una reducción de las señales inhibitorias y una diferenciación no terminal, lo que se asocia con un aumento de la citotoxicidad *in vitro*.

5. Discusión.

En concordancia con los datos obtenidos, se logró establecer el inmunofenotipo basal en células T frescas obtenidas de las PBMC, estableciendo un punto de referencia fisiológico para la evaluación de la modulación metabólica en cada participante. De acuerdo con los rangos de referencia establecidos en la literatura para donantes sanos, los linfocitos T (CD3+) representan típicamente entre el 70 % y el 80 % de la fracción mononuclear aislada, lo cual concuerda con nuestros datos. Dentro de este compartimento, se identificó una distribución jerárquica en la que los linfocitos T CD4+ constituyen aproximadamente del 45 % al 60 % de la población, mientras que los linfocitos T CD8+ comprenden entre el 20 % y el 35 %, manteniendo un cociente fisiológico de CD4/CD8 (Verhoeckx, Cotter, López-Expósito, et al., 2015). En nuestro diseño experimental, usamos un cóctel triple de IL-2, IL-7 e IL-15 para suplementar el medio de cultivo RPMI (Figuras 2 y 3). Nuestra decisión se fundamentó en la capacidad sinérgica de estas citocinas para desacoplar la expansión numérica de la diferenciación terminal y el sesgo regulador (Cieri et al., 2013). Mientras que la IL-2 actúa como un potente mitógeno para iniciar el ciclo celular, la incorporación simultánea de IL-7 e IL-15 resulta crítica para contrarrestar la apoptosis inducida por activación AICD (del inglés Activation-induced cell death) y preservar

los fenotipos TSCM y MC, mediante la regulación al alza de moléculas antiapoptóticas (Cieri et al., 2013).

Específicamente, este diseño experimental buscó mitigar la polarización hacia las células T reguladoras inducida por la IL-2 aislada, aprovechando la capacidad de la IL-15 para favorecer selectivamente la expansión y supervivencia del linaje CD8⁺ citotóxico y evitar la polarización hacia el linaje CD4⁺. Coppola y colaboradores usaron modelos predictivos de señalización celular para confirmar que esta combinación triple optimiza las redes transcripcionales de supervivencia, permitiendo maximizar el rendimiento celular manteniendo un ratio CD4/CD8 equilibrado y funcionalmente competente (Coppola et al., 2020).

Este inmunofenotipo inicial, caracterizado por una proporción significativa de células en estadios tempranos de diferenciación (Figuras 7-10), como las subpoblaciones de MC e ingenuas, resulta fundamental para el estudio (Wenes et al., 2024). Dado que estas células poseen su composición basal intacta y establecen el marco propicio para que la metformina actúe como un modulador metabólico, preservando la función y mitigando la transición hacia el fenotipo exhausto, inducido por la estimulación constante y estrés mitocondrial (Scharping et al., 2021). Nuestros datos sugieren que el acondicionamiento metabólico con el fármaco metformina preserva el fenotipo de memoria, tal como se aprecia en los resultados obtenidos de las (Figuras 7-10) que corresponden a los cuatro participantes de nuestro estudio.

Estudios sobre la inhibición del MPC muestran que el bloqueo transitorio de la importación mitocondrial de piruvato con UK-5099 o con nuevos inhibidores como MITO-66 desencadena un programa metabólico-epigenético que favorece la generación de células T con características de memoria ME, CM y TSCM, incrementa H3K27ac y mejora la eficacia antitumoral de las células CAR T condicionadas *in vitro* (Wenes et al., 2022, 2024). Estas

publicaciones demuestran que la inhibición del MPC desvió el metabolismo hacia la glutamina y la β -oxidación de ácidos grasos, aumentando el acetil-CoA disponible para modificaciones histonas y apertura de la cromatina en genes promueven el fenotipo de memoria; cuando el condicionamiento es transitorio durante la manufactura, el resultado es una población CAR T con mayor persistencia y eficacia *in vivo* (Wenes et al., 2022, 2024).

Sin embargo, el estudio realizado por Wenes y su equipo también muestra una advertencia fisiológica clave: la dependencia de los LIT de la importación mitocondrial de piruvato para oxidar lactato en microambientes pobres en glucosa. La eliminación permanente de MPC puede provocar un colapso funcional del efecto efector en LIT expuestos a condiciones tumorales restrictivas, lo que explica por qué la manipulación del MPC exige un diseño temporal y contextual cuidadoso (por ejemplo, el bloqueo breve durante la expansión *ex vivo* con posterior eliminación del inhibidor antes de infundir el producto en un paciente).

La metformina, por su parte, actúa mediante mecanismos distintos pero que convergen en la dinámica del cambio del inmunofenotipo en los linfocitos CAR T. Numerosos estudios preclínicos describen que la metformina activa AMPK, modula la función mitocondrial (inhibición parcial del complejo I), reduce especies reactivas de oxígeno y favorece rutas oxidativas que promueven la formación del fenotipo de memoria en linfocitos T CD8⁺ (mayor biogénesis mitocondrial), además de asociarse con menor expresión de PD-1/PD-L1 en distintos modelos (Zhang et al., 2020).

Estos mecanismos podrían explicar la reducción transcripcional en PD-1 y CTLA-4 (Figura 20) en nuestros datos. Zhang y sus colaboradores mostraron que el fármaco metformina potencia la formación de linfocitos T CD8⁺ de memoria y que la activación de la AMPK (del inglés AMP-activated protein kinase) media la regulación de microARNs como la expresión del

microARN-107, lo que mejora la expresión del factor de transcripción eomesodermina, suprimiendo la transcripción de PDCD1 en los linfocitos T CD8 + tratados con metformina (Zhang et al., 2020).

En este escenario, la modulación metabólica inducida por agentes como la metformina y el UK-5099 actúa como un coadyuvante que logra desacoplar la expansión numérica de la diferenciación efectora terminal (Wenes et al., 2022; You et al., 2025). Al bloquear rutas dependientes de la glucólisis aeróbica rápida e inducir un cambio bioenergético hacia la oxidación de ácidos grasos (Wenes et al., 2022; You et al., 2025). Esta flexibilidad metabólica no solo satisface las altas demandas energéticas requeridas para la división celular sostenida durante los 9 días de cultivo, sino que impulsa una modulación que favorece directamente la consolidación de fenotipos de memoria resistentes al agotamiento. Por lo tanto, la modulación metabólica no frena la expansión homeostática de los linfocitos CAR T, sino que optimiza su calidad, asegurando un producto funcionalmente superior.

En este contexto, resulta fundamental profundizar en el análisis del inmunofenotipo de los linfocitos T y CAR T anti-CD19 desde una perspectiva integradora que permita visualizar cambios globales en la arquitectura poblacional inducidos por la modulación metabólica (Azevedo et al., 2025). El uso de la citometría de flujo espectral, combinado con herramientas de reducción de dimensionalidad como UMAP, ofrece una aproximación robusta para capturar transiciones fenotípicas complejas que no son evidentes en análisis bivariados convencionales (Hatae et al., 2024). Este enfoque permite evaluar no solo variaciones en la frecuencia de subpoblaciones clásicas, sino también desplazamientos continuos entre estados vírgenes, de memoria central, memoria efectora y efectores terminales, proporcionando una lectura funcional del impacto del acondicionamiento metabólico sobre la diferenciación y el estado de activación

de los linfocitos T. A partir de esta premisa, se discuten a continuación los cambios observados en linfocitos T purificados y linfocitos CAR T anti-CD19, poniendo especial énfasis en la comparación entre el control positivo UK-5099 y la metformina como moduladores inmunometabólicos.

En el presente estudio se evidencia que la modulación metabólica mediada por metformina reconfigura el inmunofenotipo de los linfocitos CAR T anti-CD19, favoreciendo la adquisición de características asociadas a una mayor funcionalidad citotóxica *in vitro* (Figuras 14-17). En este contexto, los resultados obtenidos indican que la exposición a metformina durante el período de expansión de los linfocitos induce cambios en la composición de las subpoblaciones de memoria (Figuras 7-10), así como una disminución en la expresión transcripcional de receptores inhibitorios vinculados al agotamiento inmunológico, incluyendo PD-1, TIM-3, LAG-3 y CTLA-4 (Figura 20). La coexistencia de subpoblaciones con fenotipo efector y memoria central identificados mediante citometría de flujo espectral sugiere que la intervención metabólica no promueve una diferenciación terminal acelerada, sino que permite conservar un estado funcional intermedio, potencialmente más favorable para la persistencia y la respuesta antitumoral sostenida (Figuras 7-10).

Desde otra perspectiva, estos hallazgos responden a la pregunta de investigación, en tanto que confirman que la metformina es capaz de modular el inmunofenotipo de los linfocitos CAR T anti-CD19 (Figuras 7-10) y de atenuar, a nivel transcripcional, la expresión de marcadores clásicos de agotamiento (Figura 20). Sin embargo, la ausencia de diferencias marcadas frente al control positivo UK-5099 indica que la metformina ejerce un efecto de menor magnitud. Por ello, si bien los datos respaldan la reproducibilidad biológica de la modulación del inmunometabolismo como estrategia para optimizar productos CAR T, las conclusiones sobre un

incremento funcional directo de la citotoxicidad deben interpretarse con cautela y requerirán ser respaldadas por ensayos funcionales complementarios en otro tipo de modelos, (por ejemplo, el modelo murino).

Esto nos lleva a la comparación entre numerosos estudios los cuales han demostrado que los moduladores metabólicos reprograman la diferenciación linfocitaria hacia fenotipos de memoria (Alsaieedi & Zaher, 2025; Ton Nu & Park, 2025; Wenes et al., 2022, 2024). Por ejemplo, Hatae y su equipo demostraron que los linfocitos CAR T precondicionados con metformina y rapamicina regulan positivamente IFN- γ en tumores cerebrales, modulando el microambiente tumoral mediante la reducción de células supresoras monocíticas derivadas de mieloides (MDSC) (del inglés onocytic myeloid-derived suppressor cells) en el microambiente tumoral (Hatae et al., 2024). Este efecto se asoció con la prevención del agotamiento y el favorecimiento de un fenotipo de memoria central en las células CAR T infiltrantes (Hatae et al., 2024). En una revisión reciente, se concluyó que la metformina enriquece poblaciones de linfocitos T CD8⁺ de memoria y mejora la eficacia de inmunoterapias basadas en estas células (Ton Nu & Park, 2025). En conjunto, estos datos sugieren que la metformina actúa como modulador inmunometabólico, favoreciendo fenotipos de memoria tanto en linfocitos T CD8⁺ como en linfocitos T CD4⁺.

Por otra parte, la inhibición del MPC, ya sea por edición genética o farmacológica (UK-5099, MITO-66), desvía la respuesta de los linfocitos CD8⁺ hacia un inmunofenotipo de memoria (Wenes et al., 2022, 2024). Wenes y su equipo demostraron que el acondicionamiento de células CAR T humanas con el inhibidor MITO-66 aumentó el porcentaje de la fracción que expresaba CD62L⁺ (fenotipo de memoria tipo célula madre) en subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, lo que se asocia a mayor persistencia y eficacia antitumoral (Wenes et al., 2024)..

En concordancia con esta línea, nuestros resultados de tinción extra e intracelular para determinar el inmunofenotipo y la secreción de citoquinas muestran que el preacondicionamiento metabólico con UK-5099 induce una modulación significativa del inmunofenotipo y del perfil secretor en linfocitos T purificados y linfocitos CAR T anti-CD19 (CD4⁺ y CD8⁺) (Figuras 14-17), compatible con un estado funcional no terminal (Scharping et al., 2021). En particular, se observa un aumento significativo en la producción de GM-CSF y granzima B tanto en CD4⁺ como en CD8⁺ ($p < 0.05$), mientras que las citocinas proinflamatorias como TNF- α e IFN- γ se mantienen en niveles comparables a los del control negativo (Figuras 14-17). Este patrón sugiere que la inhibición del MPC no promueve una hiperactivación efectora sostenida, sino una respuesta citotóxica funcionalmente competente y potencialmente más controlada, coherente con la preservación de estados de memoria previamente descritos (Wenes et al., 2022).

En este contexto y en apoyo de nuestra hipótesis, aunque con una magnitud más moderada, el tratamiento con metformina reproduce parcialmente este perfil funcional (Figuras 14-17). Nuestros datos muestran incrementos significativos en la producción de IL-2 y granzima B en subpoblaciones de linfocitos T del MPC, lo que puede provocar el colapso funcional del efecto efector en LIT expuestos a condiciones tumorales restrictivas, lo que explica por qué la manipulación del MPC exige un diseño temporal y contextual cuidadoso (por ejemplo, el bloqueo breve durante la expansión ex vivo, figuras 18 y 19). Este efecto es consistente con el mecanismo de acción de la metformina como modulador metabólico indirecto, capaz de favorecer la biogénesis mitocondrial y la reserva respiratoria a través de la activación de AMPK, promoviendo así programas de memoria funcional más estables (You et al., 2025). En conjunto, estos resultados indican que tanto la inhibición directa del MPC como la modulación mitocondrial inducida por metformina convergen en la generación de un estado funcional

optimizado, aunque con intensidades distintas, lo que respalda el uso de UK-5099 como control positivo robusto y posiciona a la metformina como una estrategia translacionalmente atractiva para el acondicionamiento metabólico de células CAR T, con potencial citotóxico sostenido *in vitro* y posiblemente *in vivo*.

Estos hallazgos demuestran que la modulación metabólica mediada por metformina es capaz de reconfigurar el inmunofenotipo de los linfocitos CAR T anti-CD19 (Figuras 7-10), preservando subpoblaciones de memoria central y atenuando la expresión transcripcional de receptores inhibitorios asociados al agotamiento inmunológico, como PD-1, TIM-3, LAG-3 y CTLA-4 (Figura 20).

Resulta particularmente relevante el perfil secretor identificado en los participantes 3 y 4 de sus linfocitos CAR T anti-CD19, donde el incremento de IL-2, granzima B y de niveles moderados de IFN- γ , sugiere un estado de activación que elude la senescencia citotóxica (Figura 15). Si bien el impacto de la metformina es de menor magnitud cuantitativa en comparación con el bloqueo drástico del transportador mitocondrial de piruvato mediante UK-5099, su perfil de seguridad y su capacidad para inducir cambios fisiológicos más equilibrados le otorgan una ventaja traslacional superior.

Desde una perspectiva clínica y traslacional, los hallazgos de este estudio tienen una implicación directa en el tratamiento de neoplasias hematológicas, particularmente en la LLA de células B. Actualmente, aunque las tasas de supervivencia de la LLA han mejorado drásticamente en los países de altos ingresos, los resultados clínicos en países de ingresos bajos y medios (LMICs, por sus siglas en inglés) continúan siendo subóptimos debido al acceso limitado a diagnósticos avanzados y terapias innovadoras (Rujkijyanont & Inaba, 2024). La llegada de la inmunoterapia, específicamente los linfocitos CAR T anti-CD19, está cambiando el paradigma

del manejo de la LLA refractaria o en recaída, logrando remisiones duraderas. Sin embargo, el alto costo de estas terapias y los inmensos desafíos técnicos en su manufactura celular limitan severamente su implementación y accesibilidad en entornos con recursos limitados (Rujkijyanont & Inaba, 2024).

En este contexto, la optimización del proceso de manufactura de los linfocitos CAR T anti-CD19 mediante la modulación inmunometabólica adquiere una relevancia central. Los resultados obtenidos demuestran que la adición de metformina (un fármaco de bajo costo, uso clínico consolidado y perfil de seguridad reconocido) durante la fase de expansión es capaz de reconfigurar el inmunofenotipo celular hacia estados de memoria de tipo MC, al mismo tiempo que reduce significativamente la expresión de marcadores de agotamiento como PD-1, TIM-3, LAG-3 y CTLA-4. Esta reconfiguración se traduce directamente en una mejora de la calidad del producto celular final.

La proyección de estos hallazgos *in vitro* al escenario clínico permite anticipar que los pacientes con LLA de células B podrían beneficiarse de infusiones de linfocitos CAR T anti-CD19 con mayor aptitud bioenergética, una persistencia *in vivo* prolongada y una capacidad citotóxica sostenida. Esto favorecería la evasión de la senescencia y el agotamiento celular inducidos por la elevada carga tumoral leucémica, dos obstáculos que históricamente han limitado la eficacia de estas terapias. Más aún, esta estrategia resulta especialmente pertinente para los países de ingresos bajos y medios, donde el acondicionamiento metabólico con metformina representaría una intervención accesible, adaptable a los recursos disponibles y capaz de maximizar la eficacia terapéutica sin incrementar los costos de producción.

En consecuencia, los resultados presentados validan la hipótesis planteada y posicionan el acondicionamiento metabólico como una estrategia racional, reproducible y necesaria para superar las limitaciones actuales de la manufactura de células CAR T.

A pesar de la coherencia biológica de los resultados obtenidos, es preciso reconocer las limitaciones inherentes al diseño de este trabajo. En primer lugar, la evaluación de la modulación metabólica y su impacto en la proliferación celular se realizó exclusivamente en un modelo *in vitro* con una ventana temporal de 9 días, período que, si bien reproduce adecuadamente la fase de manufactura *ex vivo*, no permite determinar si la evasión del agotamiento inmunológico se mantiene bajo condiciones de estimulación antigénica crónica y prolongada. En segundo lugar, la inferencia sobre el potencial citotóxico de los linfocitos preacondicionados se sustentó en marcadores indirectos (secreción de citocinas efectoras y granzima B tras reestimulación) sin incluir ensayos funcionales directos. La ausencia de modelos de co-cultivo con células tumorales diana CD19⁺, como la línea NALM-6, impidió cuantificar la lisis tumoral en tiempo real y bajo condiciones que simulen el microambiente leucémico, lo que representa una brecha que deberá subsanarse en estudios posteriores.

Los hallazgos presentados abren una serie de líneas de investigación con alto potencial traslacional. El paso inmediato consiste en validar los efectos del preacondicionamiento con metformina en modelos *in vivo*, particularmente en ratones inmunodeficientes con xenoinjerto de leucemia linfoblástica aguda (modelos NSG-NALM-6), los cuales permitirían evaluar la persistencia celular, la expansión *in vivo* y el control tumoral en un microambiente inmunosupresor que reproduce más fielmente la condición clínica.

Paralelamente, sería relevante incorporar ensayos de citotoxicidad directa mediante co-cultivos con líneas CD19⁺, así como experimentos de agotamiento inducido por estimulación

antigénica constante, para confirmar la durabilidad funcional de las células acondicionadas. Desde una perspectiva de biomanufactura, la implementación de este protocolo resulta técnicamente accesible: la metformina podría incorporarse como coadyuvante metabólico en el medio de cultivo dentro de plataformas cerradas o biorreactores de uso clínico, sin modificar sustancialmente los flujos de trabajo actuales ni incrementar los costos de producción. Finalmente, explorar la combinación del preacondicionamiento metabólico con otras estrategias de optimización (como la edición génica de puntos de control inmunitario o de reguladores maestros del metabolismo celular) podría potenciar aún más la calidad y eficacia del producto celular final.

6. Conclusiones

En primera instancia, se concluye que la modulación metabólica mediada por metformina constituye una estrategia eficaz para reprogramar el inmunofenotipo de los linfocitos T purificados y linfocitos CAR T anti-CD19 hacia estadios de diferenciación no terminales (Figuras 6-9). Los hallazgos demuestran que la activación de la vía AMPK favorece la persistencia de subpoblaciones de MC y T_{SCM} (Figuras 7-10). Este desplazamiento fenotípico es de vital importancia en el tratamiento de la leucemia, donde la capacidad de autorrenovación y la longevidad de las células modificadas en el torrente circulatorio son determinantes para evitar las recaídas tardías y garantizar una vigilancia inmunológica prolongada.

La cuantificación absoluta de la expresión génica mediante ddPCR permitió establecer con alta sensibilidad y precisión los cambios inducidos por la metformina en genes asociados a rutas metabólicas claves, obteniendo una firma metabólica coherente con programas de beta oxidación, evidenciada por la regulación coordinada de *CPT1- α* , *CACT* y *ACADVL*, junto con

cambios en genes vinculados al metabolismo de la glutamina (*SLC1A5* y *GLS*) y a la defensa antioxidante mitocondrial (*SOD2*, *NRF2* y *SIRT3*); de la misma forma, la metformina atenúa el programa de agotamiento a nivel transcripcional (Figura 13). Esta doble acción de promoción de oxidación de ácidos grasos y reducción gradual de transcripciones de receptores inhibitorios sugiere que la manipulación bioenergética restaura la homeostasis mitocondrial y reduce la presión antigénica transcripcional que conduce al fenotipo de células T exhausto.

Estos hallazgos sugieren que el acondicionamiento metabólico confiere a los linfocitos CAR T una mayor resistencia frente a la estimulación antigénica continua, característica de las altas cargas de células malignas en las leucemias, lo que ofrece una alternativa traslacional contra este tipo de neoplasias hematológicas.

En términos de productos y resultados, el trabajo entrega: (a) UMAP que documenta la dinámica poblacional bajo modulación metabólica de cada participante; (b) una cuantificación absoluta por ddPCR del comportamiento transcripcional de genes implicados en el metabolismo y receptores inhibitorios (PD-1, TIM-3, LAG-3 y CTLA-4); (c) un perfil secretor que integra GM-CSF, IL-2, granzima B, TNF- α e IFN- γ como lectura funcional de la activación controlada; y (d) una comparación con un control positivo (UK-5099) que valida la potencia de la reprogramación mitocondrial y posiciona a la metformina como alternativa prometedora. En conjunto, estos productos constituyen un cuerpo de evidencia que responde directamente a los objetivos y propósitos planteados.

7. Recomendaciones

Si bien los resultados obtenidos son consistentes y biológicamente plausibles, es preciso delimitar su alcance a partir de una serie de consideraciones metodológicas que, al mismo

tiempo, orientan las líneas prioritarias de investigación subsiguiente. En primer lugar, la disminución observada en la expresión transcripcional de los receptores inhibitorios requiere validación a nivel proteico. Para ello, se recomienda emplear citometría de flujo de superficie evaluando tanto la frecuencia de células positivas como la intensidad media de fluorescencia (MFI) para (PD-1, TIM-3, LAG-3 y CTLA-4), complementada con Western blot para cuantificar los niveles totales de proteína. Esta validación es indispensable para confirmar que los cambios detectados mediante ddPCR se traducen efectivamente en una reducción funcional de la señalización inhibitoria. En segundo lugar, la caracterización metabólica funcional de las células tratadas representa una prioridad analítica aún pendiente. La aplicación de aproximaciones unicelulares, como SCENITH, complementadas con análisis metabolómicos y proteómicos, permitiría correlacionar directamente el inmunofenotipo observado con la reprogramación bioenergética subyacente, fortaleciendo la interpretación mecanística de los hallazgos. En tercer lugar, el tamaño muestral limitado y la variabilidad interdonante inherente al trabajo con células primarias humanas constituyen una restricción que deberá abordarse ampliando la cohorte experimental e incorporando modelos estadísticos de mayor robustez para evaluar la reproducibilidad del efecto observado. En conjunto, estas consideraciones no comprometen la validez de los resultados presentados, sino que definen un marco metodológico claro para la consolidación preclínica de la modulación inmunometabólica como estrategia de optimización en la manufactura de terapias celulares CAR T.

Referencias Bibliográficas

- Abate-Daga, D., & Davila, M. L. (2016). CAR models: Next-generation CAR modifications for enhanced T-cell function. *Molecular Therapy Oncolytics*, 3(February), 16014. <https://doi.org/10.1038/mto.2016.14>
- Ahmad, A., Uddin, S., & Steinho, M. (2020). CAR-T cell therapies: An overview of clinical studies supporting their approved use against acute lymphoblastic leukemia and large b-cell lymphomas. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 1–9. <https://doi.org/10.3390/ijms21113906>
- Albert, S., Arndt, C., Feldmann, A., Bergmann, R., Bachmann, D., Koristka, S., Ludwig, F., Ziller-Walter, P., Kegler, A., Gärtner, S., Schmitz, M., Ehninger, A., Cartellieri, M., Ehninger, G., Pietzsch, H. J., Pietzsch, J., Steinbach, J., & Bachmann, M. (2017a). A novel nanobody-based target module for retargeting of T lymphocytes to EGFR-expressing cancer cells via the modular UniCAR platform. *OncoImmunology*, 6(4), 1–17. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1287246>
- Albert, S., Arndt, C., Feldmann, A., Bergmann, R., Bachmann, D., Koristka, S., Ludwig, F., Ziller-Walter, P., Kegler, A., Gärtner, S., Schmitz, M., Ehninger, A., Cartellieri, M., Ehninger, G., Pietzsch, H. J., Pietzsch, J., Steinbach, J., & Bachmann, M. (2017b). A novel nanobody-based target module for retargeting of T lymphocytes to EGFR-expressing cancer cells via the modular UniCAR platform. *OncoImmunology*, 6(4), 1–17. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1287246>
- Alsaieedi, A. A., & Zaher, K. A. (2025). Tracing the development of CAR-T cell design: from concept to next-generation platforms. *Frontiers in Immunology*, 16(July), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1615212>

- Arndt, C., Loureiro, L. R., Feldmann, A., Jureczek, J., Bergmann, R., Máthé, D., Hegedüs, N., Berndt, N., Koristka, S., Mitwasi, N., Fasslrunner, F., Lamprecht, C., Kegler, A., Hoffmann, A., Bartsch, T., Köseer, A. S., Egan, G., Schmitz, M., Hořejší, V., ... Bachmann, M. (2020). UniCAR T cell immunotherapy enables efficient elimination of radioresistant cancer cells. *OncoImmunology*, 9(1). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1743036>
- Azevedo, C. M., Xie, B., Gunn, W. G., Peralta, R. M., Dantas, C. S., Fernandes-Mendes, H., Joshi, S., Dean, V., Almeida, P., Wilfahrt, D., Mendes, N., Portero, J. L., Poves, C., Fernández-Aceñero, M. J., Marcos-Pinto, R., Fernandes, Â., Delgoffe, G. M., & Pinho, S. S. (2025). Reprogramming CD8⁺ T-cell Branched N-Glycosylation Limits Exhaustion, Enhancing Cytotoxicity and Tumor Killing. *Cancer Immunology Research*, 13(10), 1655–1673. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-25-0313>
- Bachmann, M. (2019). The UniCAR system: A modular CAR T cell approach to improve the safety of CAR T cells. *Immunology Letters*, 211(January), 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.05.003>
- Bailey, C. J. (2017). Metformin: historical overview. *Diabetologia*, 60(9), 1566–1576. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4318-z>
- Blagih, J., Coulombe, F., Vincent, E. E., Dupuy, F., Galicia-Vázquez, G., Yurchenko, E., Raissi, T. C., vanderWindt, G. J. W., Viollet, B., Pearce, E. L., Pelletier, J., Piccirillo, C. A., Krawczyk, C. M., Divangahi, M., & Jones, R. G. (2015). The Energy Sensor AMPK Regulates T Cell Metabolic Adaptation and Effector Responses InVivo. *Immunity*, 42(1), 41–54. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.030>
- Bose, P., & Bandyopadhyay, S. (2024). A Comprehensive Assessment and Classification of Acute Lymphocytic Leukemia. *Mathematical and Computational Applications*, 29(3).

<https://doi.org/10.3390/mca29030045>

- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Brentjens, R. J., Latouche, J. B., Santos, E., Marti, F., Gong, M. C., Lyddane, C., King, P. D., Larson, S., Weiss, M., Rivière, I., & Sadelain, M. (2003). Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nature Medicine*, 9(3), 279–286. <https://doi.org/10.1038/nm827>
- Brentjens, R. J., Santos, E., Nikhamin, Y., Yeh, R., Matsushita, M., La Perle, K., Quintás-Cardama, A., Larson, S. M., & Sadelain, M. (2007). Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts. *Clinical Cancer Research*, 13(18), 5426–5435. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0674>
- Brown, P. A., Shah, B., Advani, A., Aoun, P., Boyer, M. W., Burke, P. W., DeAngelo, D. J., Dinner, S., Fathi, A. T., Gauthier, J., Jain, N., Kirby, S., Liedtke, M., Litzow, M., Logan, A., Luger, S., Maness, L. J., Massaro, S., Mattison, R. J., ... Campbell, M. (2021). Acute lymphoblastic leukemia, version 2.2021. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 19(9), 1079–1109. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2021.0042>
- Cartellieri, M., Koristka, S., Arndt, C., Feldmann, A., Stamova, S., Von Bonin, M., Töpfer, K., Krüger, T., Geib, M., Michalk, I., Temme, A., Bornhäuser, M., Lindemann, D., Ehninger, G., & Bachmann, M. P. (2014). A novel Ex Vivo isolation and expansion procedure for chimeric antigen receptor engrafted human T cells. *PLoS ONE*, 9(4), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093745>

- Chen, D. S., & Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity*, 39(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012>
- Chen, P. H., Raghunandan, R., Morrow, J. S., & Katz, S. G. (2024). Finding Your CAR: The Road Ahead for Engineered T Cells. *American Journal of Pathology*, 194(8), 1409–1423. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2024.04.002>
- Cieri, N., Camisa, B., Cocchiarella, F., Forcato, M., Oliveira, G., Provasi, E., Bondanza, A., Bordignon, C., Peccatori, J., Ciceri, F., Lupo-Stanghellini, M. T., Mavilio, F., Mondino, A., Biciato, S., Recchia, A., & Bonini, C. (2013). IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors. *Blood*, 121(4), 573–584. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-431718>
- Coppola, C., Hopkins, B., Huhn, S., Du, Z., Huang, Z., & Kelly, W. J. (2020). Investigation of the impact from il-2, il-7, and il-15 on the growth and signaling of activated cd4+ t cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 1–23. <https://doi.org/10.3390/ijms21217814>
- Deng, J., Peng, M., Wang, Z., Zhou, S., Xiao, D., Deng, J., Yang, X., Peng, J., & Yang, X. (2019). Novel application of metformin combined with targeted drugs on anticancer treatment. *Cancer Science*, 110(1), 23–30. <https://doi.org/10.1111/cas.13849>
- Divakaruni, A. S., Wallace, M., Buren, C., Martyniuk, K., Andreyev, A. Y., Li, E., Fields, J. A., Cordes, T., Reynolds, I. J., Bloodgood, B. L., Raymond, L. A., Metallo, C. M., & Murphy, A. N. (2017). Inhibition of the mitochondrial pyruvate carrier protects from excitotoxic neuronal death. *Journal of Cell Biology*, 216(4), 1091–1105. <https://doi.org/10.1083/jcb.201612067>
- Feldmann, A., Hoffmann, A., Bergmann, R., Koristka, S., Berndt, N., Arndt, C., Rodrigues

- Loureiro, L., Kittel-Boselli, E., Mitwasi, N., Kegler, A., Lamprecht, C., González Soto, K. E., & Bachmann, M. (2020). Versatile chimeric antigen receptor platform for controllable and combinatorial T cell therapy. *OncoImmunology*, 9(1). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1785608>
- Fielding, A. K., Richards, S. M., Chopra, R., Lazarus, H. M., Litzow, M. R., Buck, G., Durrant, I. J., Luger, S. M., Marks, D. I., Franklin, I. M., McMillan, A. K., Tallman, M. S., Rowe, J. M., & Goldstone, A. H. (2007). Outcome of 609 adults after relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL); an MRC UKALL12/ECOG 2993 study. *Blood*, 109(3), 944–950. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-018192>
- Finisguerra, V., Dvorakova, T., Formenti, M., Van Meerbeeck, P., Mignon, L., Gallez, B., & Van Den Eynde, B. J. (2023). Metformin improves cancer immunotherapy by directly rescuing tumor-infiltrating CD8 T lymphocytes from hypoxia-induced immunosuppression. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 11(5), 1–15. <https://doi.org/10.1136/jitc-2022-005719>
- Frlic, T., & Pavlin, M. (2025). Metabolic reprogramming of CAR T cells: a new frontier in cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 16(November). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1688995>
- Gökbuget, N., Stanze, D., Beck, J., Diedrich, H., Horst, H. A., Hüttmann, A., Kobbe, G., Kreuzer, K. A., Leimer, L., Reichle, A., Schaich, M., Schwartz, S., Serve, H., Starck, M., Stelljes, M., Stuhlmann, R., Viardot, A., Wendelin, K., Freund, M., & Hoelzer, D. (2012). Outcome of relapsed adult lymphoblastic leukemia depends on response to salvage chemotherapy, prognostic factors, and performance of stem cell transplantation. *Blood*, 120(10), 2032–2041. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-399287>

- Gross, G., Waks, T., & Eshhar, Z. (1989). Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(24), 10024–10028. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.24.10024>
- Hatae, R., Kyewalabye, K., Yamamichi, A., Chen, T., Phyu, S., Chuntova, P., Nejo, T., Levine, L. S., Spitzer, M. H., & Okada, H. (2024). Enhancing CAR-T cell metabolism to overcome hypoxic conditions in the brain tumor microenvironment. *JCI Insight*, 9(7). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.177141>
- Honikel, M. M., & Olejniczak, S. H. (2022). *Co-Stimulatory Receptor Signaling in CAR-T Cells*.
- Huang, X., Sun, T., Wang, J., Hong, X., Chen, H., Yan, T., Zhou, C., Sun, D., Yang, C., Yu, T., Su, W., Du, W., & Xiong, H. (2023). Metformin Reprograms Tryptophan Metabolism to Stimulate CD8⁺ T-cell Function in Colorectal Cancer. *Cancer Research*, 83(14), 2358–2371. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-22-3042>
- Imai, C., Mihara, K., Andreansky, M., Nicholson, I. C., Pui, C. H., Geiger, T. L., & Campana, D. (2004). Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 18(4), 676–684. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403302>
- Jacoby, E., Shahani, S. A., & Shah, N. N. (2019). Updates on CAR T-cell therapy in B-cell malignancies. *Immunological Reviews*, 290(1), 39–59. <https://doi.org/10.1111/imr.12774>
- Jiang, Y., Li, Y., & Zhu, B. (2015). T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death and Disease*, 6(6), 1–9. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.162>
- June, C. H., Riddell, S. R., & Schumacher, T. N. (2015). Adoptive cellular therapy: A race to the finish line. *Science Translational Medicine*, 7(280), 280ps7–280ps7.

<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa3643>

- Katz, S. G., & Rabinovich, P. M. (2020). *T Cell Reprogramming Against Cancer BT - Cell Reprogramming for Immunotherapy: Methods and Protocols* (S. G. Katz & P. M. Rabinovich (eds.); pp. 3–44). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0203-4_1
- Kirtane, K., Elmariah, H., Chung, C. H., & Abate-Daga, D. (2021). Adoptive cellular therapy in solid tumor malignancies: Review of the literature and challenges ahead. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 9(7), 1–11. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-002723>
- Končarević, S., Lößner, C., Kuhn, K., Prinz, T., Pike, I., & Zucht, H.-D. (2014). In-Depth Profiling of the Peripheral Blood Mononuclear Cells Proteome for Clinical Blood Proteomics. *International Journal of Proteomics*, 2014, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/129259>
- Loff, S., Dietrich, J., Meyer, J. E., Riewaldt, J., Spehr, J., von Bonin, M., Gründer, C., Swayampakula, M., Franke, K., Feldmann, A., Bachmann, M., Ehninger, G., Ehninger, A., & Cartellieri, M. (2020). Rapidly Switchable Universal CAR-T Cells for Treatment of CD123-Positive Leukemia. *Molecular Therapy Oncolytics*, 17(June), 408–420. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2020.04.009>
- Luke, J. J., Flaherty, K. T., Ribas, A., & Long, G. V. (2017). Targeted agents and immunotherapies: Optimizing outcomes in melanoma. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(8), 463–482. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.43>
- Maude, S. L., Laetsch, T. W., Buechner, J., Rives, S., Boyer, M., Bittencourt, H., Bader, P., Verneris, M. R., Stefanski, H. E., Myers, G. D., Qayed, M., De Moerloose, B., Hiramatsu, H., Schlis, K., Davis, K. L., Martin, P. L., Nemecek, E. R., Yanik, G. A., Peters, C., ... Grupp, S. A. (2018). Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell

- Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 378(5), 439–448.
<https://doi.org/10.1056/nejmoa1709866>
- Morvan, M. G., & Lanier, L. L. (2016). NK cells and cancer: You can teach innate cells new tricks. *Nature Reviews Cancer*, 16(1), 7–19. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.5>
- Neelapu, S. S., Locke, F. L., Bartlett, N. L., Lekakis, L. J., Miklos, D. B., Jacobson, C. A., Braunschweig, I., Oluwole, O. O., Siddiqi, T., Lin, Y., Timmerman, J. M., Stiff, P. J., Friedberg, J. W., Flinn, I. W., Goy, A., Hill, B. T., Smith, M. R., Deol, A., Farooq, U., ... Go, W. Y. (2017). Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 377(26), 2531–2544.
<https://doi.org/10.1056/nejmoa1707447>
- Patel, K. K., Tariveranmoshabad, M., Kadu, S., Shobaki, N., & June, C. (2025). From concept to cure: The evolution of CAR-T cell therapy. *Molecular Therapy*, 33(5), 2123–2140.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2025.03.005>
- Politte, H., Maram, L., & Elgendy, B. (2025). Advances in the Development of Mitochondrial Pyruvate Carrier Inhibitors for Therapeutic Applications. *Biomolecules*, 15(2).
<https://doi.org/10.3390/biom15020223>
- Pollak, M. N. (2012). Investigating metformin for cancer prevention and treatment: The end of the beginning. *Cancer Discovery*, 2(9), 778–790. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0263>
- Porter, D. L., Levine, B. L., Kalos, M., Bagg, A., & June, C. H. (2011). Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 365(8), 725–733. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1103849>
- Ramesh, P., Hui, H. Y. L., Brownrigg, L. M., Fuller, K. A., & Erber, W. N. (2023). Chimeric

- antigen receptor T-cells: Properties, production, and quality control. *International Journal of Laboratory Hematology*, 45(4), 425–435. <https://doi.org/10.1111/ijlh.14121>
- Rujkijyanont, P., & Inaba, H. (2024). Diagnostic and treatment strategies for pediatric acute lymphoblastic leukemia in low- and middle-income countries. *Leukemia*, 38(8), 1649–1662. <https://doi.org/10.1038/s41375-024-02277-9>
- Scharping, Nicole E. Rivadeneira, Dayana B. Menk, Ashley V. Vignali, Paolo D. A. Ford, B. Rhodes Rittenhouse, Natalie L. Peralta, Ronal Wang, Yiyang Wang, Yupeng DePeaux, Kristin Poholek, Amanda C. Delgoffe, G. M. (2017). Mitochondrial stress induced by continuous stimulation under hypoxia rapidly drives T cell exhaustion. *Physiology & Behavior*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00834-9>
- Scharping, N. E., Rivadeneira, D. B., Menk, A. V, Vignali, P. D. A., Ford, B. R., Rittenhouse, N. L., Peralta, R., Wang, Y., Wang, Y., DePeaux, K., Poholek, A. C., & Delgoffe, G. M. (2021). Mitochondrial stress induced by continuous stimulation under hypoxia rapidly drives T cell exhaustion. *Nature Immunology*, 22(2), 205–215. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00834-9>
- Sen, P., Kemppainen, E., & Orešič, M. (2018). Perspectives on systems modeling of human peripheral blood mononuclear cells. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 4(JAN), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00096>
- Smith, R., & Shen, R. (2023). Complexities in comparing the impact of costimulatory domains on approved CD19 CAR functionality. *Journal of Translational Medicine*, 21(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12967-023-04372-4>
- Soto-Herederó, G., Desdín-Micó, G., & Mittelbrunn, M. (2021). Mitochondrial dysfunction defines T cell exhaustion. *Cell Metabolism*, 33(3), 470–472.

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.02.010>

Soto, K. E. G., Loureiro, L. R., Bartsch, T., Arndt, C., Kegler, A., Mitwasi, N., Drewitz, L., Hoffmann, L., Saleh, H. A., Crespo, E., Mehnert, M., Daglar, C., Abken, H., Momburg, F., Bachmann, M., & Feldmann, A. (2023). Targeting colorectal cancer cells using AND-gated adaptor RevCAR T-cells. *Frontiers in Immunology*, 14(December), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1302354>

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

Ton Nu, Q. C., & Park, P. H. (2025). Metabolic modulation of CD8⁺ T cells by metformin: A promising adjuvant strategy for CD8⁺ T Cell-Based Immunotherapies. *Pharmacological Research*, 222(October), 108015. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2025.108015>

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>

Verhoeckx, K., Cotter, P., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., & Requena, T. (2015). In vitro fermentation models: General introduction. In *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4>

Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., & Wichers, H. (2015). The impact of food bioactives on health: In vitro and

Ex Vivo models. In *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*.

<https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4>

Wenes, M., Jaccard, A., Wyss, T., Maldonado-Pérez, N., Teoh, S. T., Lepez, A., Renaud, F., Franco, F., Waridel, P., Yacoub Maroun, C., Tschumi, B., Dumauthioz, N., Zhang, L., Donda, A., Martín, F., Migliorini, D., Lunt, S. Y., Ho, P. C., & Romero, P. (2022). The mitochondrial pyruvate carrier regulates memory T cell differentiation and antitumor function. *Cell Metabolism*, 34(5), 731-746.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.03.013>

Wenes, M., Lepez, A., Arinkin, V., Maundrell, K., Barabas, O., Simonetta, F., Dutoit, V., Romero, P., Martinou, J. C., & Migliorini, D. (2024). A novel mitochondrial pyruvate carrier inhibitor drives stem cell-like memory CAR T cell generation and enhances antitumor efficacy. *Molecular Therapy Oncology*, 32(4), 200897. <https://doi.org/10.1016/j.omton.2024.200897>

Wu, Z., Zhang, C., & Najafi, M. (2022). Targeting of the tumor immune microenvironment by metformin. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 16(3), 333–348. <https://doi.org/10.1007/s12079-021-00648-w>

Ye, Q., Loisiou, M., Levine, B. L., Suhoski, M. M., Riley, J. L., June, C. H., Coukos, G., & Powell, D. J. (2011). Engineered artificial antigen presenting cells facilitate direct and efficient expansion of tumor infiltrating lymphocytes. *Journal of Translational Medicine*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-131>

Yin, W., Wang, J., Jiang, L., & James Kang, Y. (2021). Cancer and stem cells. *Experimental Biology and Medicine*, 246(16), 1791–1801. <https://doi.org/10.1177/15353702211005390>

You, J., Yang, X., Zhao, J., Chen, H., Tang, Y., Ouyang, D., Liu, Y., Wang, Y., Xie, S., Chen, Y., Liao, J., Xiang, T., Xia, J., Yang, C., & Weng, D. (2025). Enhancing CAR-T Cell

- Metabolic Fitness and Memory Phenotype for Improved Efficacy against Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Biological Sciences*, 21(9), 4231–4251. <https://doi.org/10.7150/ijbs.110406>
- Yu, Y. R., Imrichova, H., Wang, H., Chao, T., Xiao, Z., Gao, M., Rincon-Restrepo, M., Franco, F., Genolet, R., Cheng, W. C., Jandus, C., Coukos, G., Jiang, Y. F., Locasale, J. W., Zippelius, A., Liu, P. S., Tang, L., Bock, C., Vannini, N., & Ho, P. C. (2020). Disturbed mitochondrial dynamics in CD8⁺ TILs reinforce T cell exhaustion. *Nature Immunology*, 21(12), 1540–1551. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0793-3>
- Zhang, Z., Li, F., Tian, Y., Cao, L., Gao, Q., Zhang, C., Zhang, K., Shen, C., Ping, Y., Maimela, N. R., Wang, L., Zhang, B., & Zhang, Y. (2020). Metformin Enhances the Antitumor Activity of CD8⁺ T Lymphocytes via the AMPK–miR-107–Eomes–PD-1 Pathway. *The Journal of Immunology*, 204(9), 2575–2588. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901213>
- Zhao, Z., Condomines, M., van der Stegen, S. J. C., Perna, F., Kloss, C. C., Gunset, G., Plotkin, J., & Sadelain, M. (2015). Structural Design of Engineered Costimulation Determines Tumor Rejection Kinetics and Persistence of CAR T Cells. *Cancer Cell*, 28(4), 415–428. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.09.004>
- Zheng, Z., Li, S., Liu, M., Chen, C., Zhang, L., & Zhou, D. (2023). Fine-Tuning through Generations: Advances in Structure and Production of CAR-T Therapy. *Cancers*, 15(13), 1–27. <https://doi.org/10.3390/cancers15133476>
- Zhong, Y., Li, X., Yu, D., Li, X., Li, Y., Long, Y., Yuan, Y., Ji, Z., Zhang, M., Wen, J. G., Nesland, J. M., & Suo, Z. (2015). Application of mitochondrial pyruvate carrier blocker UK5099 creates metabolic reprogram and greater stem-like properties in LnCap prostate cancer cells in vitro. *Oncotarget*, 6(35), 37758–37769.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.5386>