



**Universidad de Concepción
Facultad de Farmacia**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE METFORMINA
SOBRE LA VÍA GLICOLÍTICA Y ACTIVACIÓN
INMUNE DE LINFOCITOS T CD4+ ACTIVADOS EN
ALTA GLUCOSA**

POR RICARDO ANDRÉS CARTES VELÁSQUEZ

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción para
optar al grado de Magíster en Bioquímica Clínica e Inmunología

Profesor guía: Dra. Estefanía Andrea Nova Lamperti
Departamento Bioquímica Clínica e Inmunología
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Septiembre, 2023

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	2
ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	9
INTRODUCCIÓN.....	11
Vías metabólicas en células inmunes.....	12
Vías metabólicas y subpoblaciones de linfocitos T CD4+.....	13
Metformina e inmunometabolismo.....	21
Metformina y metabolismo de linfocitos T.....	23
Modelo en infecciones.....	23
Modelo en autoinmunidad e inmunosupresión.....	24
Modelo de infección por VIH.....	25
Efectos inmunometabólicos en hiperglicemia.....	26
PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	29
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
Muestra de individuos.....	31
Obtención de linfocitos T CD4+.....	31
Condiciones de cultivo.....	33
Objetivo 1: Determinar el efecto de metformina sobre la captación de glucosa y producción de lactato en linfocitos T CD4+ activados en alta glucosa.....	34
Objetivo 2: Valorar el efecto de metformina sobre la actividad de fosfofructoquinasa en linfocitos T CD4+ activados en alta glucosa.....	37

Objetivo 3: Evaluar el efecto de metformina sobre la proliferación, ciclo celular y la expresión de los marcadores de activación en linfocitos T CD4+ activados en alta glucosa.....	39
Objetivo 4: Evaluar el efecto de metformina sobre la producción de citoquinas en linfocitos T CD4+ activados en alta glucosa.....	41
Análisis estadístico	42
RESULTADOS.....	44
Objetivo específico 1: Determinar el efecto de metformina sobre la captación de glucosa y producción de lactato en linfocitos T CD4+ activados en alta glucosa	44
Objetivo específico 2: Valorar el efecto de metformina sobre la actividad de fosfofructoquinasa en linfocitos T CD4+ activados en alta glucosa.	50
Objetivo específico 3: Evaluar el efecto de metformina sobre la proliferación, ciclo celular y la expresión de los marcadores de activación en linfocitos T CD4+ activados en alta glucosa.	52
Objetivo específico 4: Evaluar el efecto de metformina sobre la producción de citoquinas en linfocitos T CD4+ activados en alta glucosa.....	69
DISCUSIÓN	79
CONCLUSIÓN	94
BIBLIOGRAFÍA.....	95
ANEXOS	102
1-A Consentimiento Informado	102
1-B Hoja de firmas documento de consentimiento informado	104
1-C Tratamiento de desechos biológicos	105

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Captación de 2-NBDG por linfocitos T CD4+ según concentraciones de glucosa y metformina.....	45
Figura 2: Consumo normalizado de glucosa por linfocitos T CD4+ según concentraciones de glucosa y metformina.....	47
Figura 3: Producción normalizada de lactato por linfocitos T CD4+ según concentraciones de glucosa y metformina.....	49
Figura 4: Actividad normalizada de fosfofructoquinasa de linfocitos T CD4+ según concentraciones de glucosa y metformina.....	51
Figura 5: Recuento celular normalizado de linfocitos T CD4+ según concentraciones de glucosa y metformina.....	53
Figura 6: Número normalizado de linfocitos T CD4+ no divididos según concentraciones de glucosa y metformina.....	55
Figura 7: Índice de proliferación de linfocitos T CD4+ no divididos según concentraciones de glucosa y metformina.....	57
Figura 8: Índice de división de linfocitos T CD4+ no divididos según concentraciones de glucosa y metformina.....	58
Figura 9: Índice de replicación de linfocitos T CD4+ no divididos según concentraciones de glucosa y metformina.....	59
Figura 10: Índice de expansión de linfocitos T CD4+ no divididos según concentraciones de glucosa y metformina.....	60
Figura 11: Porcentaje de linfocitos T CD4+ CD69+ según concentraciones de glucosa y metformina.....	62
Figura 12: Porcentaje de linfocitos T CD4+ CD25+ según concentraciones de glucosa y metformina.....	64
Figura 13: Porcentaje de linfocitos T CD4+ en fase G1 según concentraciones de glucosa y metformina.....	66
Figura 14: Porcentaje de linfocitos T CD4+ en fase S según concentraciones de glucosa y metformina.....	67
Figura 15: Porcentaje de linfocitos T CD4+ en fase G2 según concentraciones de glucosa y metformina.....	68

Figura 16: Concentración de IL-17 producida por linfocitos T CD4+ según concentraciones de glucosa y metformina.....	70
Figura 17: Concentración de IFN- γ producida por linfocitos T CD4+ según concentraciones de glucosa y metformina.....	71
Figura 18: Concentración de TNF- α producida por linfocitos T CD4+ según concentraciones de glucosa y metformina.....	72
Figura 19: Concentración de IL-10 producida por linfocitos T CD4+ según concentraciones de glucosa y metformina.....	74
Figura 20: Concentración de IL-6 producida por linfocitos T CD4+ según concentraciones de glucosa y metformina.....	75
Figura 21: Concentración de IL-4 producida por linfocitos T CD4+ según concentraciones de glucosa y metformina.....	77
Figura 22: Concentración de IL-2 producida por linfocitos T CD4+ según concentraciones de glucosa y metformina.....	78

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1: Caracterización de subpoblaciones de linfocitos T CD4+	14
Ilustración 2: Cambios inmunometabólicos en linfocitos CD4+ activados.....	16
Ilustración 3: Cambios inmunometabólicos en células T reguladoras en medioambiente inflamatorio.....	17
Ilustración 4: Vías metabólicas durante la activación de la célula T.....	19
Ilustración 5: Efectos de la metformina sobre linfocitos T CD4.	27

RESUMEN

Los linfocitos T CD4⁺ tienen un rol central en la respuesta inmune, tanto a nivel efector como regulador. El efecto de metformina sobre el inmunometabolismo de linfocitos T CD4⁺ ha sido escasamente estudiado y se desconoce su efecto en condiciones de alta glucosa, particularmente en relación a la vía glicolítica y su respuesta efectora. El presente estudio busca evaluar el efecto de metformina sobre la modulación de la vía glicolítica y la función efectora de linfocitos T CD4⁺ activados en condiciones de normo y alta glucosa. Se realizó un estudio con linfocitos T CD4⁺ obtenidos de sangre periférica, los cuales fueron activados y cultivados por 4 días con 3 concentraciones de metformina (0.1mM, 1mM y 4mM) en condiciones de normo (5,5mM) y alta glucosa (25mM). Se determinó la captación de glucosa mediante ensayo 2-NBDG y los niveles de glucosa, lactato y actividad de fosfofructoquinasa (PFK) por ensayo colorimétrico. Para la función efectora se evaluó proliferación, recuento, ciclo celular, marcadores de activación y secreción de citoquinas por citometría de flujo. Los resultados muestran que la metformina estimuló la captación y consumo de glucosa, producción de lactato y la actividad de la PFK; estos efectos fueron mayores en alta glucosa. La metformina redujo el recuento celular mediante la inhibición de la proliferación de linfocitos T CD4⁺, asociado a un arresto de ciclo celular en fase S/G2, tanto en normo como alta glucosa. A nivel de función efectora, la metformina aumentó los niveles de CD69 y la secreción de IL-4, pero disminuyó los niveles de CD25. En conclusión, la metformina inhibe la proliferación mediante mecanismos asociados a un arresto del ciclo celular con un aumento de las fases S/G2 a expensas de G1 en linfocitos T

CD4+ activados. Pese al arresto, los linfocitos T CD4+ activados se mantienen en un estado metabólica, funcional y fenotípicamente activado.

ABSTRACT

CD4⁺ T lymphocytes play a central role in the immune response, both in effector and regulatory functions. The effect of metformin on the immunometabolism of CD4⁺ T lymphocytes has been scarcely studied, and its impact under high glucose conditions, particularly concerning the glycolytic pathway and effector response, remains unknown. This study aims to evaluate the effect of metformin on the modulation of the glycolytic pathway and effector function of activated CD4⁺ T lymphocytes under normo and high glucose conditions. A study was conducted using CD4⁺ T lymphocytes obtained from peripheral blood. These cells were activated and cultured for 4 days with three concentrations of metformin (0.1mM, 1mM, and 4mM) under normoglycemic (5.5mM) and hyperglycemic (25mM) conditions. Glucose uptake was determined using the 2-NBDG assay, and levels of glucose, lactate, and phosphofructokinase (PFK) activity were assessed by colorimetric assays. Effector function such as proliferation, cell count, cell cycle analysis, activation markers, and cytokine secretion were analyzed by flow cytometry. The results indicate that metformin stimulated glucose uptake/consumption, lactate production, and PFK activity, with greater effects under high glucose. Metformin inhibited the proliferation of CD4⁺ T lymphocytes, this is associated with an arrest in S/G2 phase within cell cycle. Regarding functional effector mechanism, metformin increased CD69 levels and IL-4 secretion, but decreased CD25 levels. Overall, Metformin inhibited proliferation through mechanisms associated with cell cycle arrest, leading to an increase in the S/G2 phases at the expense of G1 in activated CD4⁺ T lymphocytes. Despite the cell cycle

arrest, activated CD4+ T lymphocytes remain metabolically, functionally, and phenotypically activated.

INTRODUCCIÓN

La respuesta inmune y el metabolismo están estrechamente relacionados, determinando condiciones fisiológicas y patológicas expresadas tanto a nivel orgánico, celular y molecular. En condiciones fisiológicas, la presencia de nutrientes y otros metabolitos específicos favorecerán una función inmune efectora y reguladora que tiende a la homeostasis. En tanto que, en condiciones patológicas, una alteración de nutrientes y metabolitos llevará a una respuesta inmune desregulada que, de mantenerse en el tiempo, favorecerá la aparición y perpetuación de enfermedades como cáncer, infecciones, autoinmunes, entre otras. (Norata et al., 2015)

Lo anterior, ha relevado al inmunometabolismo como un área de investigación traslacional que permita, no solo mejorar la comprensión del metabolismo celular y la respuesta inmune, sino también el desarrollo de nuevas terapias para alteraciones metabólicas e inmunes. (Norata et al., 2015) A partir de esto, existen dos grandes definiciones respecto al campo de estudio del inmunometabolismo: por una parte, los efectos de las células inmunes sobre el metabolismo corporal, por otra, los cambios que ocurre en la vías metabólicas intracelulares de células inmunes cuando son activadas. (Norata et al., 2015; O'Neill et al., 2016; Pearce & Pearce, 2013) En esta tesis nos centraremos en la segunda área de estudio, particularmente a nivel de linfocitos T CD4+.

Vías metabólicas en células inmunes

Las 6 vías metabólicas más estudiadas en el inmunometabolismo corresponden a: glicolisis, fosforilación oxidativa, vía de las pentosas, síntesis de ácidos grasos, oxidación de ácidos grasos y el metabolismo de aminoácidos.(O'Neill et al., 2016) Los cambios inmunometabólicos que ocurren a nivel celular van a depender principalmente del tipo celular, el estímulo y las condiciones del medio donde se encuentra la célula, así como de la interacción con otros tipos celulares. Estos cambios inmunometabólicos afectarán la forma en que las células inmunes obtienen energía. Pero los metabolitos de estas vías también afectarán cualitativa y cuantitativamente a la funcionalidad de las células inmunes,(Norata et al., 2015; O'Neill et al., 2016; Pearce & Pearce, 2013) lo que es al final de cuentas el aspecto de mayor interés en relación a la respuesta inmune.

En términos generales, es aceptado que las células inmunes en reposo, utilizan vías más eficientes para la producción energética, como la fosforilación oxidativa. En tanto que, una vez activadas, estas cambian rápidamente a glicólisis aeróbica, la que es mucho menos eficiente, pero es capaz de entregar una mayor cantidad de energía en menos tiempo y además generaría diversos metabolitos necesarios para potenciar la proliferación de las células inmunes. Por último, linfocitos T de memoria o reguladores, vuelven a depender mayormente de fosforilación oxidativa. Cada uno de estos cambios metabólicos puede ser modificado, lo que abre la puerta para la reprogramación metabólica y funcional de las células inmunes.(Norata et al., 2015)

Vías metabólicas y subpoblaciones de linfocitos T CD4+

Los linfocitos T CD4+ desempeñan un papel fundamental en la respuesta inmunitaria adaptativa, contribuyendo tanto a su componente efectivo como regulador. En este contexto, no es infrecuente encontrar diversas subpoblaciones de linfocitos T CD4+ con funciones específicas que cooperan de manera sinérgica para lograr una respuesta inmunitaria adaptativa exitosa. La investigación en torno a los linfocitos T CD4+ a lo largo de las últimas décadas ha resultado en la identificación de varias subpoblaciones especializadas. Estas subpoblaciones de linfocitos T CD4+ se han revelado como actores clave en la coordinación de la respuesta inmune adaptativa, cada una desempeñando un papel único en la regulación y ejecución de las respuestas específicas frente a patógenos y antígenos. Su cooperación estratégica se traduce en una respuesta inmunitaria eficaz y adaptable a una amplia gama de desafíos. Este avance en la comprensión de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ ha tenido un impacto significativo en el desarrollo de terapias inmunológicas y estrategias de inmunización, ya que permite dirigir enfoques terapéuticos de manera más precisa y específica. El estudio continuo de estas subpoblaciones sigue siendo esencial para ampliar nuestra comprensión de la inmunología y mejorar nuestras capacidades para combatir enfermedades y patógenos. (Chatzileontiadou et al., 2020; Zhu & Zhu, 2020)

Actualmente, se reconocen cinco tipos: Th1, Th2, Th17, T reguladoras y T foliculares. La identificación de estas subpoblaciones se basa en la expresión de un patrón específico de citoquinas así como de factores de transcripción, los que se resumen en la Ilustración 1. (Zhu & Zhu, 2020)

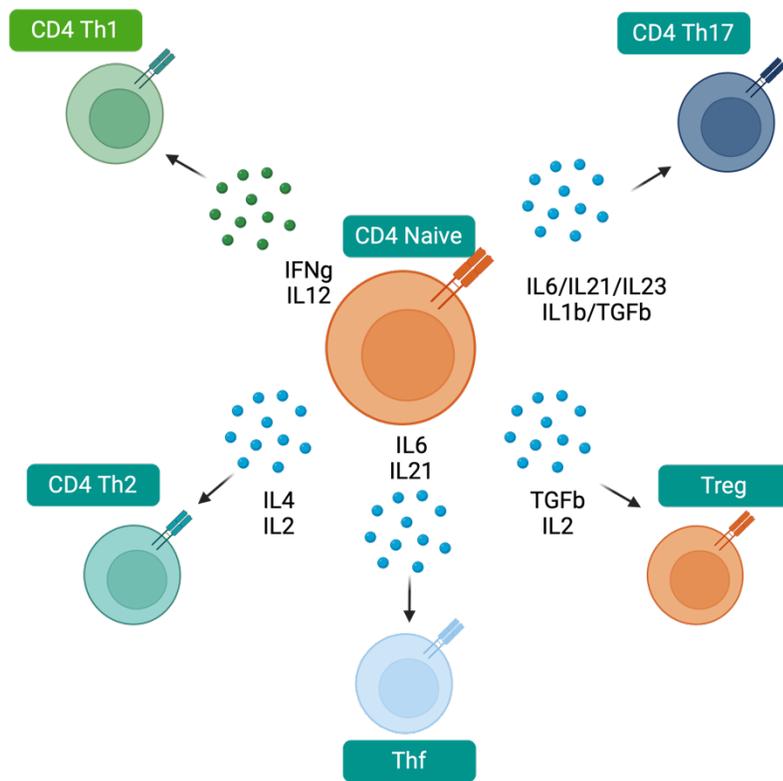


Ilustración 1: Caracterización de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y citoquinas asociadas. Adaptado desde Zhu & Zhu, 2020.

Las células Th1 se caracterizan principalmente por la expresión del factor de transcripción T-bet y la producción de IFN γ , inicialmente conocido como factor activador de macrófagos. Estas células desempeñan un papel crucial en la activación de macrófagos contra bacterias intracelulares y células cancerosas. Por otro lado, las células Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-13 y, en algunos casos, IL-9, lo que promueve el cambio de isotipo de los anticuerpos hacia IgE, así como la diferenciación, migración y supervivencia de los eosinófilos. Además, estimulan a los macrófagos para adoptar un fenotipo M2, favoreciendo la secreción de

mucosidad y la fibrosis. En cuanto a las células Th17, producen IL-17A, IL-17F, IL-22 y TNF α , lo que las convierte en aliadas eficientes para eliminar bacterias y hongos extracelulares. Además de su papel esencial en la inmunidad mucosal, también inducen inflamación tisular, promueven las respuestas de las células B y la formación de folículos linfoides ectópicos en los tejidos. Las células T reguladoras son fundamentales para la regulación del sistema inmunológico, y su ausencia puede conducir a enfermedades autoinmunes. Se cree que las células T reguladoras manipulan y controlan las respuestas inmunológicas a través de diversos mecanismos. La falta, reducción o respuestas subóptimas de las células T reguladoras se han asociado con muchas enfermedades autoinmunes en humanos. Las células T helper foliculares contribuyen tanto a la protección del huésped como a las enfermedades inflamatorias al brindar ayuda a las células B y participar en la producción de anticuerpos. Estas células se mantienen en los ganglios linfáticos, los centros germinales y el bazo, y tanto la regulación al alza de receptores de quimiocinas específicas como la interacción directa con las células B en los órganos linfoides secundarios son necesarias para su diferenciación. (Chatzileontiadou et al., 2020)

En el caso de los linfocitos T CD4+, la principal vía metabólica durante su activación corresponde a la vía glicolítica, la que se detalla en la Ilustración 2. Sin embargo, investigaciones recientes han mostrado que las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ tiene perfiles metabólicos que presentan diferencias entre ellos. (Zhu & Zhu, 2020)

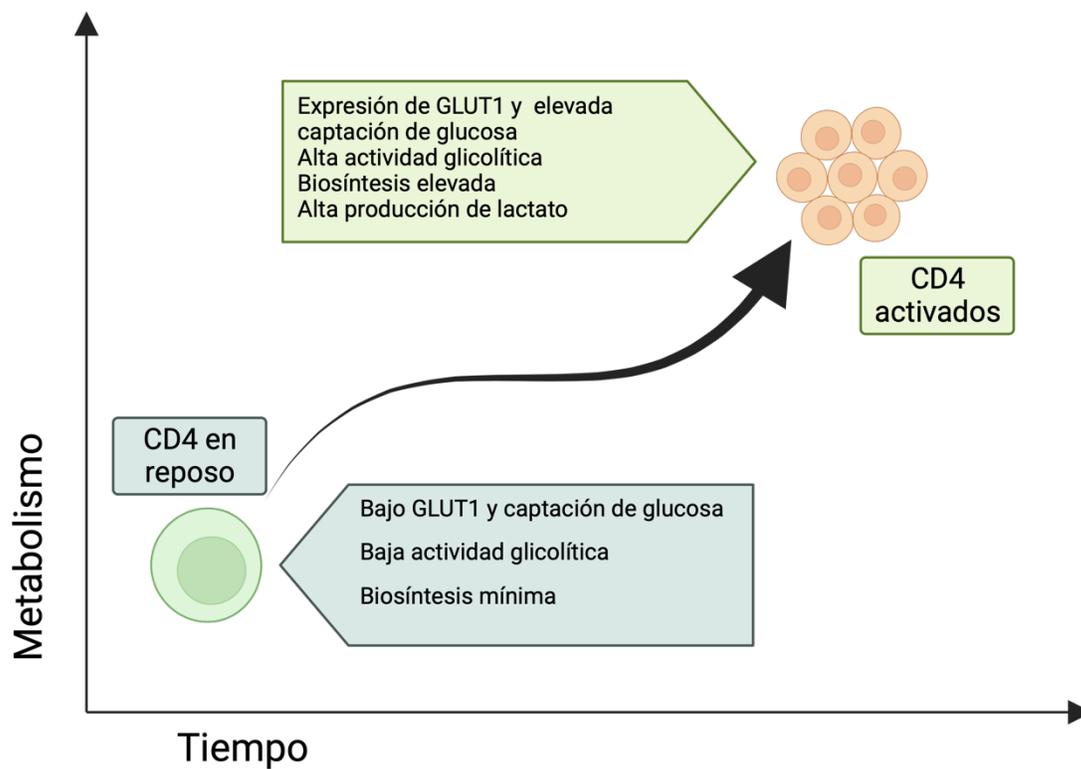


Ilustración 2: Cambios inmunometabólicos en linfocitos CD4+ posterior a la activación. Adaptado desde Palmer et al., 2016.

Por lo anterior, en el caso de la subpoblación de células T reguladoras, durante la activación y diferenciación se produciría una menor utilización de la vía glicolítica (en comparación a otras células T) a expensas de una mayor utilización de la fosforilación oxidativa y oxidación de ácidos grasos libres. Esto sería particularmente relevante en condiciones de inflamación, tal como se muestra en la Ilustración 3. (Bulygin et al., 2022)

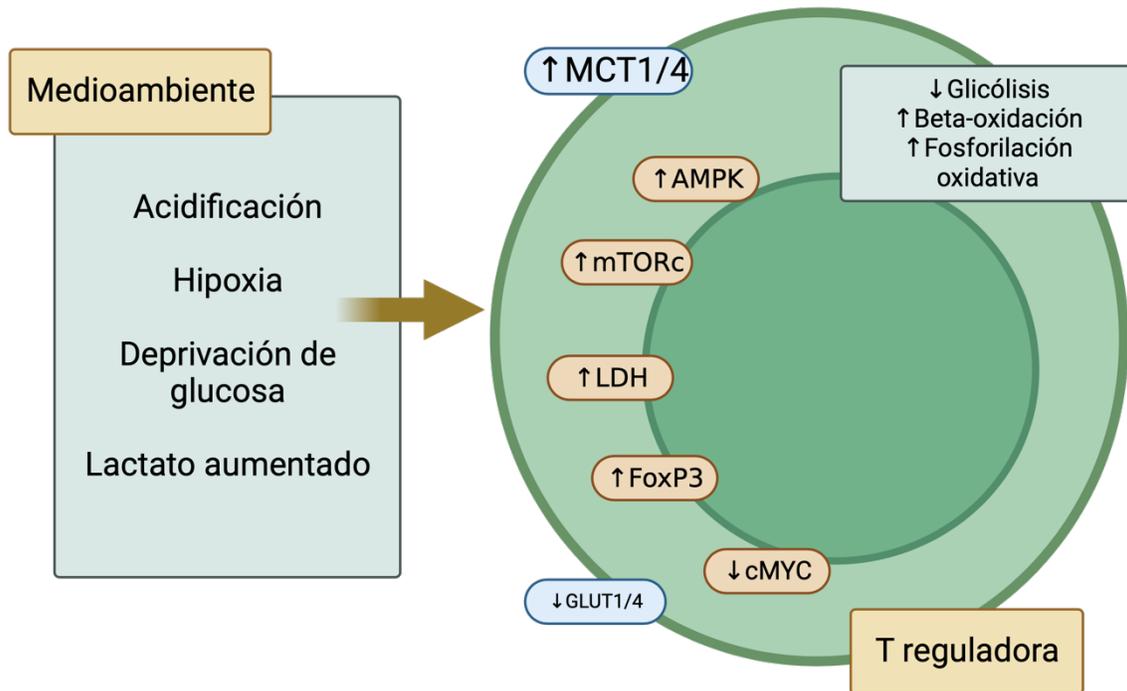


Ilustración 3: Cambios inmunometabólicos en células T reguladoras activadas en un medioambiente inflamatorio. Adaptado desde Bulygin et al., 2022.

Aunque existe un claro aumento de la glicólisis y el flujo de metabolitos a través de vías anabólicas después de la activación de las células T, no se debe pensar que la fosforilación oxidativa se regula a la baja (o incluso es prescindible) en las células T activadas. Por el contrario, se ha demostrado que tanto la tasa glicolítica como la respiración mitocondrial aumentan en la activación de las células T. Además, la fosforilación oxidativa es indispensable para la activación de las células T, ya que la inhibición de diferentes complejos de la cadena de transporte de electrones es suficiente para afectar la activación inicial de las células T. Esto

anticipa el rol que tienen otras vías metabólicas dependientes del funcionamiento mitocondrial en la activación de las células T, tal como se muestra en la Ilustración 4. (Almeida et al., 2021)

Durante la activación de las células T, la glutamina se presenta como otro sustrato crucial. Se ha observado que la depleción de glutamina en el medio de cultivo dificulta la proliferación de las células T. La glutamina se somete a una conversión metabólica a través de la glutaminólisis, y los intermediarios resultantes ingresan al ciclo del ácido tricarboxílico. Además, la glutamina actúa como donante de nitrógeno para la síntesis de purinas y pirimidinas, desempeñando un papel esencial en la producción de nucleótidos necesarios para la proliferación. (Balyan et al., 2020).

Se ha observado que las células T reguladoras muestran una mayor tasa de oxidación de ácidos grasos en comparación con otros subconjuntos de células T efectoras. Es interesante notar que la inhibición farmacológica de la oxidación de ácidos grasos de cadena larga obstaculiza la diferenciación de las células T reguladoras, lo que sugiere una relación significativa entre esta vía metabólica y la función reguladora de estas células. En este contexto, se ha planteado la hipótesis de que los ácidos grasos de cadena larga desempeñan un papel importante en la promoción de la diferenciación de las células T reguladoras mediante la activación de la enzima AMPK. Esta hipótesis se sustenta en la evidencia de que el tratamiento con metformina, un activador conocido de AMPK, conduce a un aumento en el número de células T reguladoras. Esto indica una interconexión crucial entre el metabolismo de los ácidos grasos y la función reguladora de las células T. Además,

se ha observado que la activación de la AMPK mediante el uso de AICAR (un activador directo de AMPK) incrementa la expresión de FoxP3 en las células T reguladoras de manera independiente al TGF- β . Esto sugiere que la AMPK desempeña un papel directo en la regulación de la función de las células T reguladoras y su capacidad para mantener la tolerancia inmunológica. (Almeida et al., 2021) Por otra parte, en pacientes con diabetes tipo 2, la inhibición de la oxidación de ácidos grasos resultaron en una producción reducida de IL-17 por parte de las células Th17 proinflamatorias. (Cai et al., 2021)

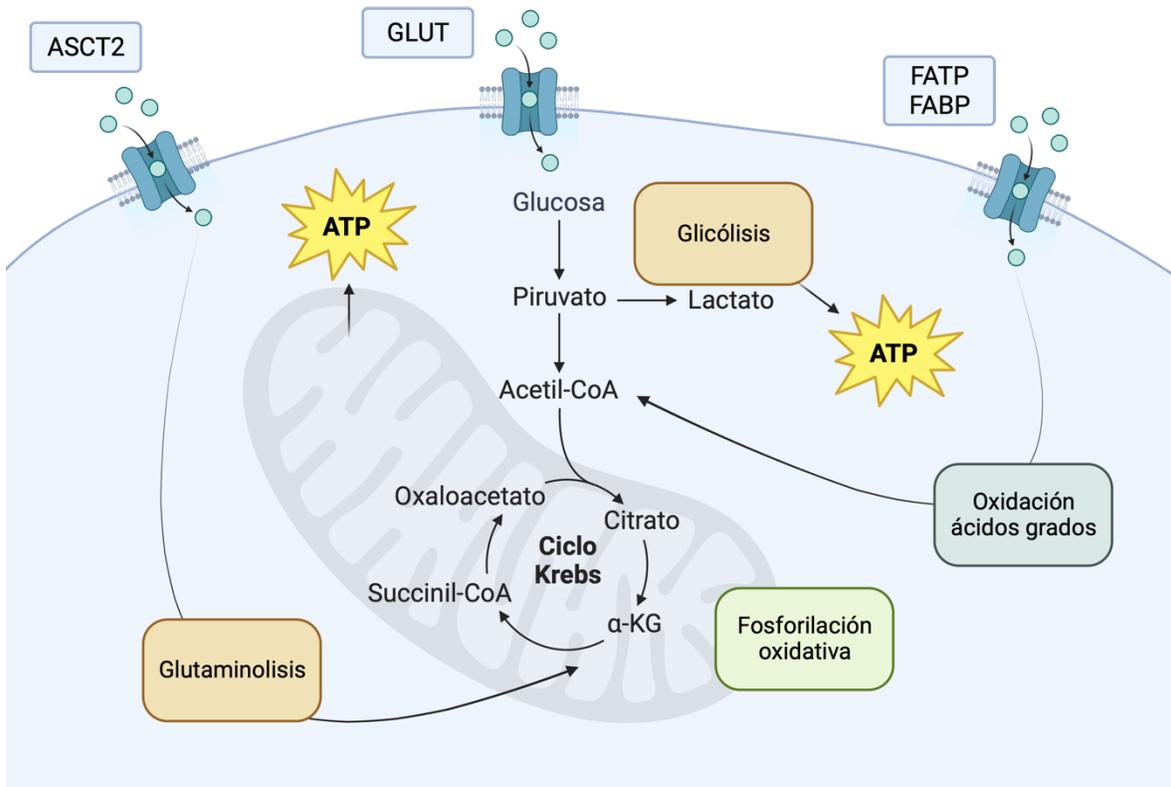


Ilustración 4: Principales vías metabólicas usadas durante la activación de la célula T. Adaptado desde Almeida et al., 2021.

Para sustentar estos procesos que dependen principalmente de una mayor captación de glucosa, se produce un rápido aumento en la expresión de GLUT1. Algo similar ocurre con el antiporter CD98 en el caso de la glutamina. Se ha visto que la insuficiencia de nutrientes o la inhibición metabólica directa impiden la activación y proliferación de las células T, y en algunos casos, conducen a anergia o muerte celular. La variación en la capacidad de captación de glucosa o glutamina de las células T *naive* puede regular los resultados de la activación y diferenciación de las células T. Esto muestra que la reprogramación metabólica está intrincadamente involucrada en el crecimiento y función de las células T. (Almeida et al., 2021; Dumitru et al., 2018).

Por otra parte, en el tejido inflamado y en condiciones de bajo nivel de oxígeno, las células T efectoras aumentan sus mecanismos de supervivencia. Uno de estos mecanismos es el aumento de la expresión del factor de transcripción sensible al oxígeno, HIF-1 α , que promueve el metabolismo anaeróbico al aumentar la expresión de transportadores de glucosa e inducir enzimas glicolíticas. Sin embargo, la disponibilidad de glucosa es limitada en el tejido inflamado, mientras que el lactato es abundante. Como resultado, las células T priorizan la conversión del lactato a piruvato. Por otro lado, las células T reguladoras pueden utilizar eficientemente el piruvato derivado del lactato como fuente de energía mediante la generación de NAD⁺ durante la fosforilación oxidativa. Esto indicaría que las células T reguladoras están mejor preparadas para activarse y cumplir su función en ambientes inflamados y con menor disponibilidad de nutrientes. (Bulygin et al., 2022)

Metformina e inmunometabolismo

En este contexto, un fármaco ampliamente estudiado para estos fines de reprogramación inmunometabólica corresponde a la metformina. Tal como mencionamos, uno de los blancos más relevantes en el inmunometabolismo son los linfocitos T CD4+,(Copsel et al., 2020; Lai et al., 2022; Shikuma et al., 2020; Takahara et al., 2022; Tan et al., 2020) dado su rol central tanto a nivel efector como regulador. Además, esto tiene relevancia epidemiológica a nivel chileno, dado que nuestra población presenta una elevada prevalencia de diabetes, la que sigue aumentando. (Leiva et al., 2018)

La metformina es el fármaco más ampliamente usado a nivel mundial en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. Pertenece a la familia de las biguanidas y sus principales efectos incluyen la disminución en la absorción de glucosa a nivel intestinal, la mejora de la captación de glucosa a nivel periférico, la disminución de los niveles plasmáticos de insulina en ayuno mediante un aumento de la sensibilidad a ésta, lo que en su conjunto lleva a una disminución de la glicemia. Si bien tiene efectos adversos, principalmente a nivel gastrointestinal, en dosis de 500 a 2500mg al día es bien tolerada. Sin embargo, en los últimos años, se han descritos efectos más allá del hipoglicemiante, con usos potenciales a nivel cardiovascular y neurológico,(Y.-W. Wang et al., 2017) donde en los últimos años se ha relevado la terapia de enfermedades autoinmunes,(Iwata & Tanaka, 2021; Pålsson-McDermott & O'Neill, 2020; Stathopoulou et al., 2019) como complemento en el tratamiento adyuvante del cáncer (Verdura et al., 2019; Yang et al., 2020) y el VIH,(H. Guo et

al., 2021) e incluso para el manejo del COVID-19.(Hashemi & Pezeshki, 2021; Omarjee et al., 2020; Xian et al., 2021)

A pesar de lo anterior, la investigación de los efectos de la metformina sobre el inmunometabolismo es aún incipiente e incluye estudios con células mieloides, monocitos, macrófagos y células B. En células mieloides, incluyendo las supresoras, se ha descrito que la administración de metformina disminuye la respiración basal y las tasas de consumo de oxígeno y acidificación del medio en células CD11+b en tumores; lo que implicaría que la metformina en este tipo particular de células redirige el metabolismo hacia glicólisis en desmedro de la fosforilación oxidativa.(Uehara et al., 2019) En tanto que en monocitos, su co-cultivo con células de cáncer de mamas en presencia de metformina, se asoció con un marcado aumento en los niveles de IFN- γ y una disminución de IL-10, lo que llevaría a una modulación de una respuesta inmune pro inflamatoria.(Dahmani et al., 2020) Mientras que en relación a COVID-19, se ha demostrado que la metformina es capaz de suprimir la respuesta inflamatoria inducida por la proteínas *spike* en monocitos.(Cory et al., 2021) En el caso de macrófagos en el contexto del microambiente tumoral, se ha descrito que la administración de metformina mediante nanopartículas mejora la hipoxia y promueve una diferenciación tipo M1, lo que logra revertir las condiciones inmunosupresoras que caracterizan al microambiente tumoral.(Gong et al., 2021) Mientras que en relación a la reparación de heridas, en un modelo de pez cebra, se encontró que la metformina reduce los macrófagos TNF- α +, lo que reduce el estado redox intracelular, favoreciendo la reparación de los tejidos.(Miskolci et al., 2022) En tanto que en células B,

metformina disminuye la captación de glutamina, las funciones mitocondriales y suprime la diferenciación del plasmoblasto, lo que tendría implicancias específicas en el manejo de la respuesta humoral en el lupus eritematoso sistémico.(Sumikawa et al., 2021)

Metformina y metabolismo de linfocitos T

Las interacciones de la metformina a nivel metabólico en linfocitos T son múltiples y se han evidenciado en distintos modelos de patologías, principalmente con estudios en ratones.

Modelo en infecciones

En la tuberculosis, la metformina se ha propuesto como terapia adjunta, dado sus efectos en la disminución de una excesiva inflamación y una mejora en la respuesta inmune vinculada a un aumento en la fosforilación oxidativa y la oxidación de ácidos grasos en linfocitos CD8+.(Böhme et al., 2020; Russell et al., 2019) (Restrepo, 2016) Esta inmunomodulación estaría relacionada con una mayor inducción de células T reguladoras en desmedro de una respuesta Th17, lo que estaría mediado por una mayor capacidad de oxidación de ácidos grasos.(Gualdoni et al., 2016) Los positivos efectos descritos anteriormente, se relacionarían a que una vía metabólica comúnmente activada sería AMPK,(Biondo et al., 2020; Cheng et al., 2016a; Gualdoni et al., 2016). Esta activación no solo modularían la respuesta inmune propiamente tal, sino que estaría vinculada al estado bioenergético de las células inmunes,(Auger et al., 2018) lo que también se relacionaría con la

fosforilación de mTOR (Kamyshnyi et al., 2021; Putilin et al., 2020) y Akt.(Xiong et al., 2021). Por lo tanto, los efectos inmunometabólicos de la metformina sobre linfocitos T estaría determinada en gran medida sobre sus efectos en AMPK, mTOR y Akt.

En el caso de sepsis, se ha descrito que la metformina bloquea la vía glicolítica, lo que lleva a una disminución en la producción de IL-1 β , IFN- γ , IL-17 e IL-22 y un aumento de TNF- α en linfocitos CD4+, lo que se asocia a una mayor mortalidad en el caso de infecciones fúngicas. Esta modulación también se debería a los efectos de metformina sobre mTOR. (Cheng et al., 2016)

En tanto que, en un modelo de influenza en ratones obesos, CD4+ aislados y tratados con metformina presentaron una inhibición de la tasa de consumo de oxígeno acompañado de un aumento en los marcadores CD44, CD62L y CD69 con una disminución de CD25. Además, la metformina logró reducir la tasa de mortalidad por influenza en este modelo. (Alwarawrah et al., 2020a)

Modelo en autoinmunidad e inmunosupresión

En relación a linfocitos T CD4+ en modelos de tiroiditis en humanos y ratón, se ha descrito un aumento de la activación de la vía mTOR/HIF-1 α /HK2/glicólisis, la que tratada con metformina se vio disminuida. Además se encontró que el ratio Th17/Th1 se vio disminuida con la administración de este hipoglicemiante, lo que implica cambios no solo metabólicos, sino también, de inmunofenotipo. (Zhao et al., 2021). Mientras que en un modelo de lupus eritematoso sistémico, se vio que metformina inhibió la fosforilación de pSTAT1 y su unión a los elementos

responsivos a IFN-g, lo que ocurrió independientemente de AMPK y mTOR.(Titov et al., 2019)

Estos cambios en la diferenciación de las subpoblaciones de CD4+ también se han descrito en modelos murinos de diabetes tipo I, asma, trasplante, colitis y nefritis lúpica donde aumenta la cantidad subpoblaciones reguladoras y disminuye las efectoras, especialmente Th1 y Th17. (Cornaby et al., 2020; Duan et al., 2019a; Y. Guo et al., 2021; S. K. Lee et al., 2020; Liu et al., 2021; Park et al., 2016; Planas et al., 2021a; Takahara et al., 2022; Wilson et al., 2021)

Lo anterior se refuerza con los resultados del estudio de Park et al., (2016), quienes trabajaron con un modelo ratón de enfermedad aguda de injerto contra huésped y del estudio de Duan et al., (2019), quienes trabajaron en un modelo ratón de insulinitis. En ambos casos, los resultados son prácticamente idénticos en cuanto a la modificación del fenotipo de CD4+. En estos dos estudios se observa un aumento de la repuesta Th2 y T reguladora a expensas de una disminución de Th1 y Th17 con dosis de metformina 5mM.

Modelo en infección por VIH

En pacientes con VIH, se ha observado que una expresión aumentada de CD54 en células CD4+ se asocia con una progresión de la enfermedad (Chen et al., 2019). CD54, también conocida como ICAM-1, desempeña un papel esencial en la adhesión de células inmunitarias, como los linfocitos T CD4+, a las células infectadas por el VIH. Su aumento en la superficie de las células CD4+ puede facilitar la entrada del virus y la propagación de la infección. Chen et al., (2019) demostraron que la metformina reduce la expresión de CD54 en células CD4+ a

través de la vía NF- κ B/p65. Esta vía de señalización, asociada con la inflamación y la respuesta inmunitaria, se modula positivamente por el VIH. La reducción de la expresión de CD54 por la metformina podría contribuir a disminuir la facilidad de entrada del virus en las células CD4+, lo que podría ralentizar la progresión de la enfermedad.

Además de su efecto sobre CD54, la metformina también ha demostrado otros beneficios inmunometabólicos. Shikuma et al., (2020) encontraron que la metformina reduce la expresión de diversas moléculas inhibitoras en células CD4+ de pacientes con VIH. Estas moléculas inhibitoras pueden suprimir la respuesta inmunitaria antiviral, y su reducción podría permitir que el sistema inmunitario responda de manera más efectiva al VIH.

Por otro lado, Planas et al., (2021) identificaron que la metformina también tiene la capacidad de inhibir la activación de la vía mTOR en células CD4+ de pacientes con VIH. La vía mTOR es esencial en la regulación del crecimiento celular y la síntesis de proteínas. La inhibición de mTOR podría ser beneficiosa al reducir la replicación viral y la polarización hacia Th17, un subconjunto de células T que es particularmente susceptible a la infección por VIH.

Efectos inmunometabólicos en hiperglicemia

En resumen, independiente de las vías involucradas, la evidencia es consistente en señalar que la metformina tiene un efecto modulador sobre la diferenciación efectora de T CD4+, inhibiendo la respuesta Th17 y Th1, favoreciendo una Th2 y T reguladora, lo que parece estar vinculado a una reducción

en la actividad de la vía glicolítica, lo que se resume en la Ilustración 5. Esta evidencia ha sido generada principalmente en modelo ratón.

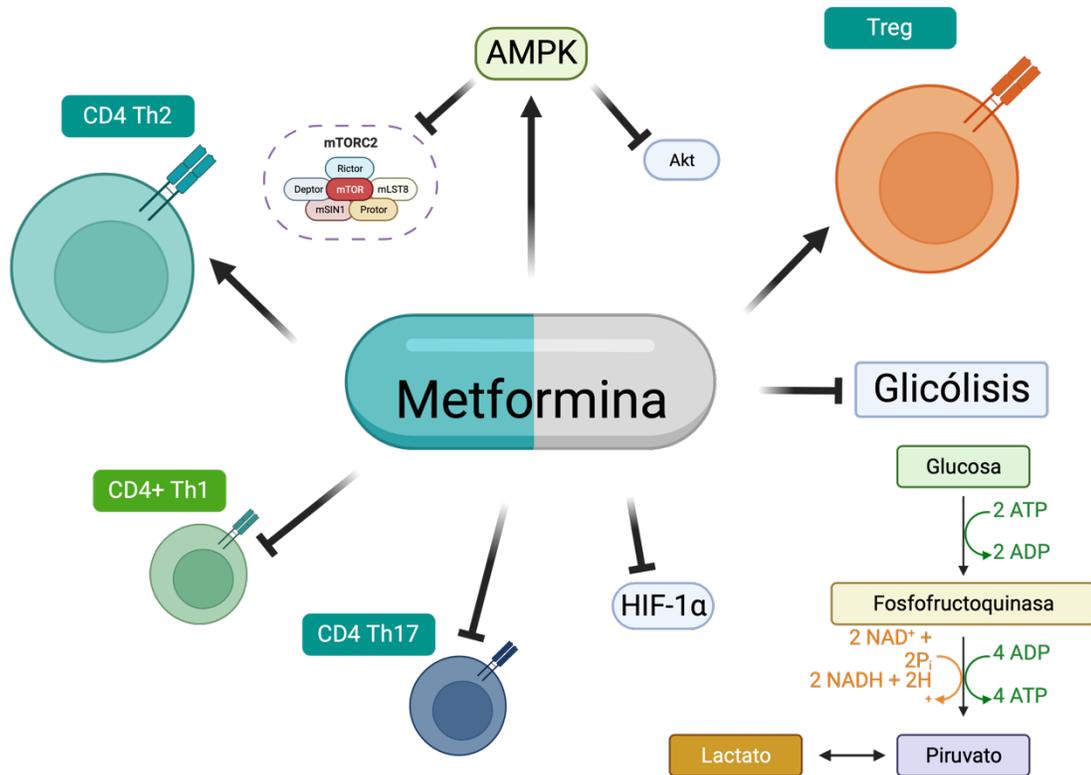


Ilustración 5: Efectos de la metformina sobre linfocitos T CD4+. Elaboración propia.

A pesar de la creciente evidencia que respalda el potencial beneficioso de la metformina en la inmunidad, es fundamental abordar el vacío de conocimiento en relación con su efecto en seres humanos bajo condiciones de alta glucosa, que son típicas en individuos que usan la metformina como tratamiento para la diabetes mellitus. La mayoría de los estudios se han centrado en modelos de ratón y han

empleado concentraciones de glucosa en el rango de 100 a 200 mg/dL, lo que no refleja la situación clínica real de estos pacientes.

La implicancia más evidente de esta limitación es que, aunque se han identificado prometedores mecanismos inmunometabólicos en estudios preclínicos, la aplicación directa de estos hallazgos a la práctica médica en pacientes humanos puede no ser tan directa. La variabilidad en los niveles de glucosa en sangre y la complejidad de la respuesta inmunológica en humanos hacen que sea necesario llevar a cabo investigaciones específicas en pacientes diabéticos que utilizan metformina.

Además, la metformina se ha convertido en un pilar en el tratamiento de la diabetes tipo 2, que afecta a una parte significativa de la población. Por lo tanto, entender cómo esta medicación afecta la respuesta inmunológica en situaciones de hiperglicemia es de gran importancia. Los pacientes con diabetes tipo 2 tienen un mayor riesgo de infecciones y complicaciones asociadas, por lo que la optimización de su respuesta inmunológica es un objetivo relevante.

En última instancia, abordar este vacío de conocimiento podría tener importantes implicancias clínicas. Si se demuestra que la metformina mantiene sus efectos beneficiosos en la inmunidad incluso en condiciones de alta glucosa, esto podría respaldar aún más su uso como terapia complementaria en pacientes con diabetes tipo 2. Sin embargo, es crucial realizar estudios que evalúen el efecto de la metformina en las distintas poblaciones células inmunes, particularmente en aquellas que tienen un rol tan relevante, como es el caso del linfocito T CD4+.

PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Se ha mejorado la comprensión del inmunometabolismo, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Se ha abierto la posibilidad para inducir cambios inmunometabólicos de utilidad en el tratamiento de diversas enfermedades.

Los linfocitos T CD4+ tienen un rol central tanto a nivel efector como modulador (regulador) de la respuesta inmune. El efecto de metformina sobre el inmunometabolismo de linfocitos T CD4+ ha sido escasamente estudiado y se desconoce su efecto en condiciones de alta glucosa, particularmente en relación a la vía glicolítica y marcadores de activación. En particular, dado que en su fase de activación los linfocitos T CD4+ dependen mayormente de la vía glicolítica, se hace necesario conocer los efectos de la metformina tanto a nivel de la vía metabólica como de los marcadores de activación.

A partir de lo anterior, la pregunta de investigación que se plantea es:

¿Cuál es el efecto de metformina sobre la modulación de la vía glicolítica y marcadores de activación en linfocitos T CD4+ activados en alta glucosa?

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La metformina inhibe la vía glicolítica y modula la respuesta efectora de linfocitos T CD4+ activados en condiciones de alta glucosa.

El objetivo general es evaluar el efecto de metformina sobre la modulación de la vía glicolítica y respuesta efectora de linfocitos T CD4+ activados en condiciones alta glucosa.

Los objetivos específicos corresponden a:

- Determinar el efecto de metformina sobre la captación de glucosa y producción de lactato en linfocitos T CD4+ activados en alta glucosa
- Valorar el efecto de metformina sobre la actividad de fosfofructoquinasa en linfocitos T CD4+ activados en alta glucosa.
- Evaluar el efecto de metformina sobre la proliferación, ciclo celular y la expresión de los marcadores de activación en linfocitos T CD4+ activados en alta glucosa.
- Evaluar el efecto de metformina sobre la producción de citoquinas en linfocitos T CD4+ activados en alta glucosa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta tesis se ajusta a los principios éticos para la investigación con seres humanos señalada en la Declaración de Helsinki (General Assembly of the World Medical Association, 2014) y la Ley 20.584 de derechos y deberes de los pacientes (Nacional, 2012). Todos los participantes accedieron previo proceso de consentimiento informado, con la firma del documento (Anexo 1).

Muestra de individuos

Se incluyeron seis adultos de edades comprendidas entre los 21 y 57 años, compuestos por tres hombres y tres mujeres. Se establecieron criterios de exclusión que contemplaban individuos con cualquier enfermedad, alteración o condición metabólica, endocrina, hematológica o inmunológica; así como aquellos que padecieran obesidad o desnutrición. También se excluyeron a aquellos que hubieran utilizado medicamentos que afectaran la glicemia en los últimos 6 meses, así como a quienes tuvieran antecedentes de dificultades en la obtención de muestras de sangre mediante punción venosa.

El reclutamiento de los participantes se llevó a cabo mediante el proceso de consentimiento informado, y la obtención de las muestras de sangre se programó para el mismo día, aproximadamente al mediodía.

Obtención de linfocitos T CD4+

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de los 6 participantes mediante punción venosa, siguiendo el procedimiento previamente descrito. Para obtener la

fracción de células mononucleares, las células se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad a 400 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente. Esto se realizó utilizando Lymphoprep (Axis Shield, Reino Unido), previa mezcla de la muestra de sangre con PBS en una proporción de 1:1. La mezcla se añadió cuidadosamente sobre 10 mL de Lymphoprep en un tubo Falcon de 50 mL. Luego, se extrajo el anillo de células mononucleares que se encontraba entre la fase de plasma y la de Lymphoprep. Las células obtenidas se lavaron con PBS a 300 x g durante 10 minutos, y las células vivas se contaron utilizando la tinción con azul de Tripano para determinar la viabilidad celular.

Para el aislamiento de los linfocitos T CD4⁺ de la sangre periférica, necesarios para los ensayos funcionales, las células mononucleares de sangre periférica previamente obtenidas se separaron utilizando perlas magnéticas de acuerdo con el kit de aislamiento de linfocitos T Memory CD3⁺ humano (Miltenyi Biotec, Alemania), siguiendo el protocolo del fabricante. En resumen, las células mononucleares se resuspendieron en MACS buffer en una proporción de 80 µL por cada 10 millones de células, a las cuales se añadieron perlas magnéticas anti-CD3 en una proporción de 10 µL por cada 10 millones de células. La mezcla se incubó a 4°C durante 20 minutos en la oscuridad, luego se lavaron añadiendo 2 mL de MACS buffer, centrifugando a 300 x g y retirando el sobrenadante. Al mismo tiempo, se posicionaron las columnas LS (Miltenyi Biotec, Alemania) en el imán y se hidrataron con 1 mL de MACS buffer tres veces. Las células mononucleares se resuspendieron en MACS buffer en una proporción de 50 µL por cada 10 millones de células y se depositaron en las columnas colocadas en el imán. Luego se lavó la columna con 3

mL de MACS buffer tres veces, se retiró la columna y se posicionó en un tubo Falcon de 15 mL. Se añadieron 5 mL de MACS buffer sobre el receptor de la columna y se empujó el émbolo con fuerza.

Las células CD3⁺ obtenidas se lavaron con PBS a 300 x g durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se marcaron con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 durante 20 minutos a 4°C en la oscuridad. Posteriormente, se lavaron con PBS a 300 x g durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 500 µL de PBS. Estas células se llevaron al sorter BD FACSAria III (BD Biosciences, Estados Unidos), donde se separaron las porciones de CD4⁺ y CD8⁺. Luego, se lavaron con PBS a 300 x g durante 10 minutos y se resuspendieron en medio RPMI 1640 (Gibco, Estados Unidos) para ser incubadas durante 12 horas a 37°C en condiciones de CO₂ al 5%. Posteriormente, se lavaron con PBS a 300 x g durante 10 minutos, se contaron utilizando la tinción con azul de Tripano para determinar la viabilidad celular y se llevaron a las condiciones de cultivo descritas a continuación.

Condiciones de cultivo

Se establecieron un total de 8 condiciones de cultivo que combinaron distintas concentraciones de metformina y glucosa.

Para la activación celular, se empleó suero RPMI 1640 (Gibco, Estados Unidos) suplementado con un 10% de suero bovino fetal, 500 UI/mL de IL-2 y perlas anti-CD3/CD28 (Life Technologies, Estados Unidos) en una proporción de 1:4. La

incubación se llevó a cabo a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂. Se sembraron 100,000 células por pocillo en placas de 96 pocillos.

En cuanto a la exposición celular, se manejaron las siguientes condiciones para cada variable: metformina (0 mM, 0.1 mM, 1 mM y 4 mM) y glucosa en el medio (5.5 mM y 25 mM). La metformina se diluyó en RPMI 1640 (Gibco, Estados Unidos) como vehículo. A partir de la combinación de estas variables, se generaron un total de 8 condiciones experimentales. Posteriormente, se realizaron mediciones a las 96 horas para cada uno de los objetivos establecidos.

Objetivo 1: Determinar el efecto de metformina sobre la captación de glucosa y producción de lactato en linfocitos T CD4+ activados en alta glucosa.

Se empleó el marcador fluorescente 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)-2-desoxiglucosa (2-NBDG), que se había preparado previamente a una concentración stock de 20 mM. Esta solución se diluyó en PBS para alcanzar una concentración de 20 µM.

En el procedimiento, se retiró un pocillo para cada una de las condiciones/muestras. Las células se lavaron con PBS a 300 x g durante 10 minutos y se resuspendieron en 100 µL de PBS. A continuación, se incubaron durante 30 minutos a 37°C en un ambiente con un 5% de CO₂ en la oscuridad. Luego, se agregaron 100 µL de PBS que contenía 2-NBDG a 20 µM, lo que resultó en una concentración final de 10 µM. Se volvió a incubar durante 45 minutos a 37°C con un

5% de CO₂ en la oscuridad. Posteriormente, se inactivó la reacción mediante la adición de 2 mL de PBS enfriado en hielo.

Las muestras se lavaron con PBS a 300 x g durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 500 µL de PBS. Estas muestras se procesaron utilizando el equipo LSR Fortessa (BD Biosciences, Estados Unidos), y los archivos resultantes se analizaron con el software FlowJo (Tree Star, Estados Unidos).

Para medir la producción de lactato, se empleó el Kit de Lactato (COD 12736; Biosystems, España). Este ensayo se basa en la actividad de la lactato deshidrogenasa para convertir el lactato en la muestra en un producto que interactúa con una sonda, generando un cambio de color (λ máx = 600 nm) proporcional a la concentración de lactato. Este kit es capaz de detectar L-lactato en un rango de 0.05 mM a 20 mM, que abarca la mayoría de las concentraciones en muestras biológicas, considerando que el D-lactato se encuentra en concentraciones de 1-5% en comparación con el L-lactato.

Se preparó una curva estándar siguiendo las indicaciones del fabricante, utilizando el calibrador humano AX125 (Biosystems, España). Luego, se preparó el mix de reacción según las instrucciones del fabricante para obtener 100 µL de mezcla por cada medición. Esto se logró mezclando 80 µL de reactivo A con 20 µL de reactivo B.

Para cada una de las condiciones/muestras, se retiraron 20 μL , que se colocaron en pocillos en placas de 96 pocillos con 180 μL de PBS para obtener una dilución de 1:10. Luego, se añadieron 100 μL del mix de reacción previamente descrito y se incubaron durante 5 minutos a 37°C en la oscuridad. Posteriormente, se realizaron las mediciones utilizando un lector de placas Synergy 2 (BioTek Instruments, Alemania) a una longitud de onda de 600 nm, utilizando el software Gen5 (BioTek Instruments, Alemania). A partir de las curvas previamente obtenidas con coeficientes de determinación (R^2) superiores a 0.9, se calcularon las concentraciones de lactato para cada medición. Los valores de concentración de lactato se normalizaron en función del número de células en cada medición, utilizando cuentas de perlas (CountBright™, Life Technologies, Estados Unidos).

Para determinar el consumo de glucosa, se utilizó el Kit de Glucosa (COD 12503; Biosystems, España). Este ensayo se basa en la reacción de Trinder para producir un cambio de color (λ máx = 500 nm) proporcional al nivel de glucosa. El kit es capaz de detectar glucosa en un rango que va desde 0.23 mg/dL hasta 500 mg/dL.

Se preparó una curva estándar siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando el calibrador humano AX125 (Biosystems, España). Para cada una de las condiciones/muestras, se retiraron 20 μL , que se colocaron en pocillos en placas de 96 pocillos con 180 μL de PBS para obtener una dilución de 1:10. Luego, se añadieron 100 μL del reactivo del kit y se realizaron las mediciones utilizando un lector de placas Synergy 2 (BioTek Instruments, Alemania) a una longitud de onda

de 500 nm, utilizando el software Gen5 (BioTek Instruments, Alemania). A partir de las curvas previamente obtenidas con coeficientes de determinación (R²) superiores a 0.9, se calcularon las concentraciones de lactato para cada medición. Los valores de concentración de lactato se normalizaron en función del número de células en cada medición, utilizando cuentas de perlas (CountBright™, Life Technologies, Estados Unidos).

Objetivo 2: Valorar el efecto de metformina sobre la actividad de fosfofructoquinasa en linfocitos T CD4+ activados en alta glucosa.

Se utilizó el Kit II de Ensayo colorimétrico de actividad de la fosfofructoquinasa (Catalog MAK093; Sigma-Aldrich, USA). Este es un ensayo enzimático acoplado, donde la fructosa-6-fosfato y el ATP son convertidos a fructosa-1,6-difosfato y ADP por la fosfofructoquinasa, luego el ADP es convertido por el mix enzimático del ensayo a AMP y NADH, finalmente el NADH reduce una sonda incolora que produce un color (λ max = 450 nm) proporcional a la actividad de la fosfofructoquinasa

Se preparó la curva estándar según indicaciones del fabricante a partir de un estándar de 10mM de NADH para obtener 6 puntos en duplicado de 0, 2, 4, 6, 8 y 10nM en la solución buffer del ensayo. Luego se preparó el mix de reacción según las instrucciones del fabricante de manera de obtener 50uL por cada medición según se detalla a continuación: 42uL de buffer del ensayo, 2uL del desarrollador de fosfofructoquinasa, 2uL de ATP, 2uL de mix de ensayo y 2uL de sustrato.

Para cada una de las condiciones/muestras se retiró 1 pocillo. Las células se lavaron con PBS a 300 x g durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se homogeneizaron en 200uL del buffer del ensayo en frío. Luego se centrifugaron a 13.000 x g por 10min a 4°C para remover material insoluble. Luego se tomarán 10uL, los que se depositarán en pocillos en placas de 96 pocillos. Luego se agregaron 50uL del mix de reacción previamente descrito, se analizó en el lector de placa Synergy 2 (BioTek Instruments, Alemania), donde se realizó agitación intensa por 2 minutos a 37°C, y luego se realizaron mediciones de forma continua a OD 450nm durante 30 minutos.

Para el cálculo de la actividad de fosfofructoquinasa, restando previamente el valor del estándar de NADH a 0nM de la curva previamente descrito en su medición inicial a los 5min, se utilizó la siguiente fórmula: $PFK = B \times SVF / RT * V$. Donde B es la cantidad de NADH generado desde la medición inicial hasta la final, SVF es el factor de disolución de la muestra, RT es el tiempo de reacción y V es el volumen añadido al pocillo. El valor final se expresa en mU/mL, donde una unidad de fosfofructoquinasa es la cantidad de enzima que es capaz de generar 1uM de NADH por segundo a un pH de 7.4 a 37°C. Los valores de actividad de fosfofructoquinasa se normalizaron según el número de células en cada medición a partir del uso de perlas de conteo (CountBright™, Life Technologies, Estados Unidos).

Objetivo 3: Evaluar el efecto de metformina sobre la proliferación, ciclo celular y la expresión de los marcadores de activación en linfocitos T CD4+ activados en alta glucosa.

Para evaluar la proliferación celular, se empleó el kit CellTrace™ Violet (Life Technologies, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante antes de llevar a cabo la activación y las condiciones de cultivo. Después de la separación de los linfocitos T CD4+, las células se lavaron con PBS a 300 x g durante 10 minutos y se resuspendieron en 1 mL de PBS a 37°C. Luego, se agregaron 1 mL de CellTrace Violet a una concentración de 20 µM a 37°C. El marcaje se realizó durante 20 minutos a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂, y posteriormente se detuvo la reacción enfriando las células con la adición de 2 mL de medio RPMI suplementado con un 10% de FBS.

Después de esta etapa, las células se lavaron con PBS a 300 x g durante 10 minutos y se resuspendieron en los respectivos medios de cultivo que contenían las 8 condiciones de estudio previamente descritas.

Para evaluar la expresión de marcadores de activación y viabilidad, las células se marcaron con el siguiente panel de anticuerpos: anti-CD25 (Pecy7), anti-CD69 (FITC), anti-CD109 (PE), anti-CD4 (Ax780) y LiveDead (APC). Para cada una de las condiciones/muestras, se retiró un pocillo de células, se lavaron con PBS a 300 x g durante 10 minutos y se resuspendieron en un cocktail de marcadores que contenía 0.5 µL de cada fluoróforo por medición, con la excepción de LiveDead, para el cual se utilizaron 0.1 µL por medición. El marcaje se llevó a cabo durante 20

minutos a 4°C en la oscuridad. Luego, las células se lavaron con PBS a 300 x g durante 10 minutos y se resuspendieron en 100 µL de PBS para el análisis posterior mediante citometría de flujo.

Para determinar las fases de la interfase del ciclo celular, se utilizó el método de ioduro de propidio. En cada una de las condiciones/muestras, se retiró un pocillo de células, se lavaron con PBS a 300 x g durante 10 minutos y se eliminó todo el sobrenadante. Luego, se añadieron 500 µL de alcohol al 70% mientras se vortexeaba a máxima intensidad para evitar la formación de aglomeraciones celulares. Las muestras se mantuvieron en la oscuridad a 4°C durante 30 minutos y luego se lavaron con PBS a 300 x g durante 10 minutos en dos ocasiones. Posteriormente, se preparó una solución de 50 µL de ioduro de propidio (Life Technologies, Estados Unidos) en 1700 µL de buffer (Life Technologies, Estados Unidos). Las células se resuspendieron en 100 µL de esta solución para su análisis mediante citometría de flujo.

Las muestras se procesaron utilizando el equipo LSR Fortessa (BD Biosciences, Estados Unidos), y los archivos resultantes se analizaron con el software FlowJo (Tree Star, Estados Unidos). En el caso de la proliferación, se utilizó la plataforma de proliferación de FlowJo, que permitió calcular el número de células no divididas y cuatro índices de proliferación, detallados a continuación: índice de división (número total de divisiones / número de células al inicio del cultivo), índice de proliferación (número total de divisiones / células que entraron en división), índice de expansión (número total de células / células al inicio del cultivo)

e índice de replicación (número total de células divididas / células que entraron en división).

En cuanto al análisis del ciclo celular, se generaron histogramas para las mediciones a 488 nm, lo que permitió identificar las fases G1, S y G2 de acuerdo con el protocolo estándar.

Objetivo 4: Evaluar el efecto de metformina sobre la producción de citoquinas en linfocitos T CD4+ activados en alta glucosa.

Se empleó el BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Chemokine Kit para evaluar las citoquinas IL-17, IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6 y IL-10. En cada una de las condiciones/muestras, se retiraron 50 μ L en duplicado y se colocaron en tubos de citometría, junto con 2 μ L de cada perla de captura y 10 μ L de reactivo de detección, que formarían un complejo sándwich para la detección de las citoquinas. Simultáneamente, se preparó una curva estándar mediante una dilución en serie decreciente que abarcaba concentraciones desde 2500 pg/mL hasta un control negativo de 0 pg/mL. Se añadieron 50 μ L de cada dilución a los tubos de citometría. Posteriormente, los tubos se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente en la oscuridad.

Tras la incubación, se procedió a lavar los tubos a 1500 rpm durante 5 minutos, eliminando el sobrenadante. Finalmente, la muestra se resuspendió en 200 μ L de PBS para su análisis mediante citometría.

Las muestras se procesaron utilizando el equipo LSR Fortessa (BD Biosciences, Estados Unidos), y los archivos resultantes se analizaron con el software FCAP Array (BD Biosciences, Estados Unidos) para determinar la concentración de cada analito, expresada en pg/mL.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Prism 10 (GraphPad Software, Estados Unidos). Se generó estadística descriptiva para cada una de las condiciones descritas y se presentaron a través de gráficos de dispersión que incluyen puntos individuales y barras de error que representan la media aritmética y el error estándar. Todos estos datos se agruparon según las concentraciones de glucosa (5,5 mM y 25 mM).

Para el análisis estadístico inferencial, se utilizó el ANOVA de dos vías para medidas repetidas. Se llevaron a cabo comparaciones múltiples entre las concentraciones de metformina (0 mM, 0,1 mM, 1 mM y 5 mM) para los grupos de glucosa (5,5 mM y 25 mM) por separado con el test LSD (*Least significant difference*) de Fisher. Además, se realizaron comparaciones entre grupos de glucosa para cada una de las concentraciones de metformina.

En todos los casos, se consideró que existía significancia estadística cuando $p < 0,05$. Los valores p se presentan de la siguiente manera para indicar el nivel de significación: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$).

RESULTADOS

Objetivo específico 1: Determinar el efecto de metformina sobre la captación de glucosa y producción de lactato en linfocitos T CD4+ activados en alta glucosa

El efecto de la metformina sobre la captación de glucosa por parte de los linfocitos T CD4+ activados se analizó midiendo el porcentaje de linfocitos que captaron 2-NBDG, posterior a 4 días de cultivo en condiciones de alta y norma glucosa (Figura 1). Es posible apreciar que en la condición de glucosa 5,5mM, solo la condición de metformina 5mM induce un aumento significativo ($p < 0.01$) en la captación de glucosa respecto a la condición control sin metformina. Algo similar ocurre en la condición de glucosa 25mM, donde la condición de metformina 5mM induce un aumento significativo ($p < 0.001$) respecto al resto de las concentraciones de metformina (Figura 1).

No se observaron diferencias entre las condiciones de glucosa 5,5mM y 25mM para las distintas concentraciones de metformina.

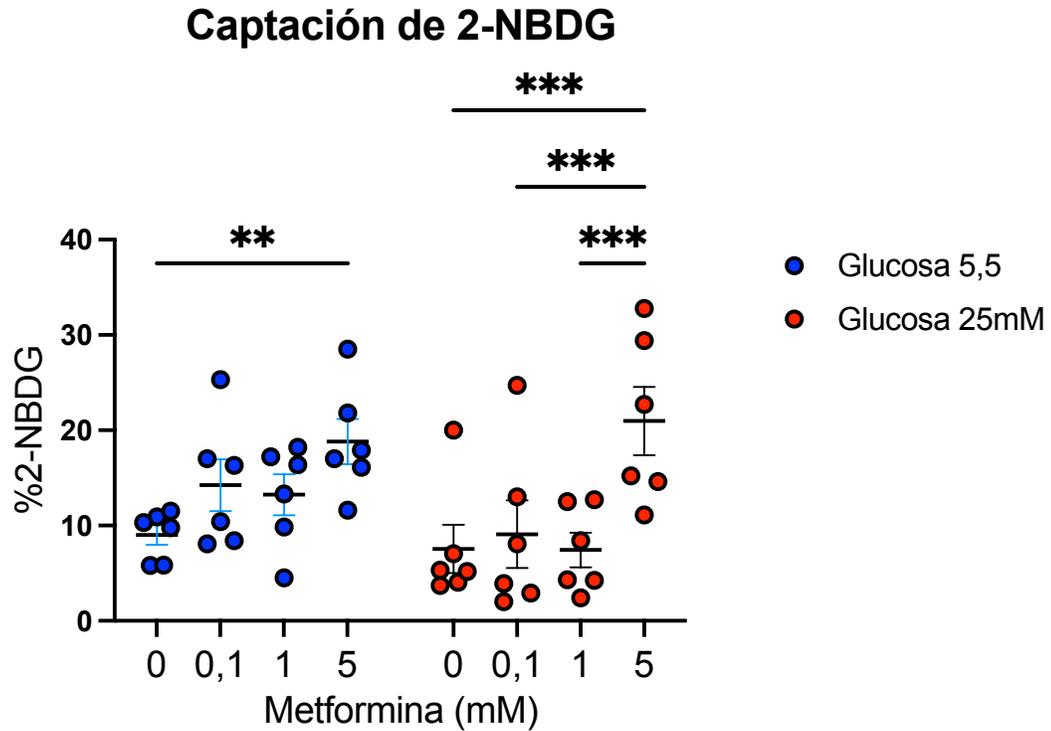


Figura 1: Captación de 2-NBDG por linfocitos T CD4+ según concentraciones de glucosa y metformina.

Comparación estadística de los porcentajes de linfocitos T CD4+ que captaron 2-NBDG entre los grupos de glucosa (5,5mM y 25mM) y metformina (0mM, 0,1mM, 1mM y 5mM) luego de 4 días de cultivo posterior a la activación. La comparación se realizó mediante test ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples obtenidas a por separado con la prueba LSD (*Least significant difference*) de Fisher. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$).

Una vez establecido que a altas concentraciones de metformina, el linfocito T reduce significativamente su porcentaje de captación de glucosa, analizamos si este fenómeno estaba asociado una disminución de los niveles de glucosa en el medio, indicando un mayor consumo de ésta por parte de la célula T. En la Figura 2 se muestran el consumo normalizado de glucosa por número de células. Es posible apreciar que en la condición de glucosa 5,5mM, no hay diferencias en el consumo de glucosa entre las distintas concentraciones de metformina. En tanto que en la condición de glucosa 25mM, la condición de metformina 5mM induce un aumento significativo ($p < 0.001$) respecto al resto de las concentraciones de metformina (Figura 2).

Se observaron diferencias entre las condiciones de glucosa 5,5mM y 25mM para la concentración de metformina 5mM ($p < 0,01$), donde la condición glucosa 25mM induce un aumento significativo en el consumo de glucosa.

Consumo de glucosa

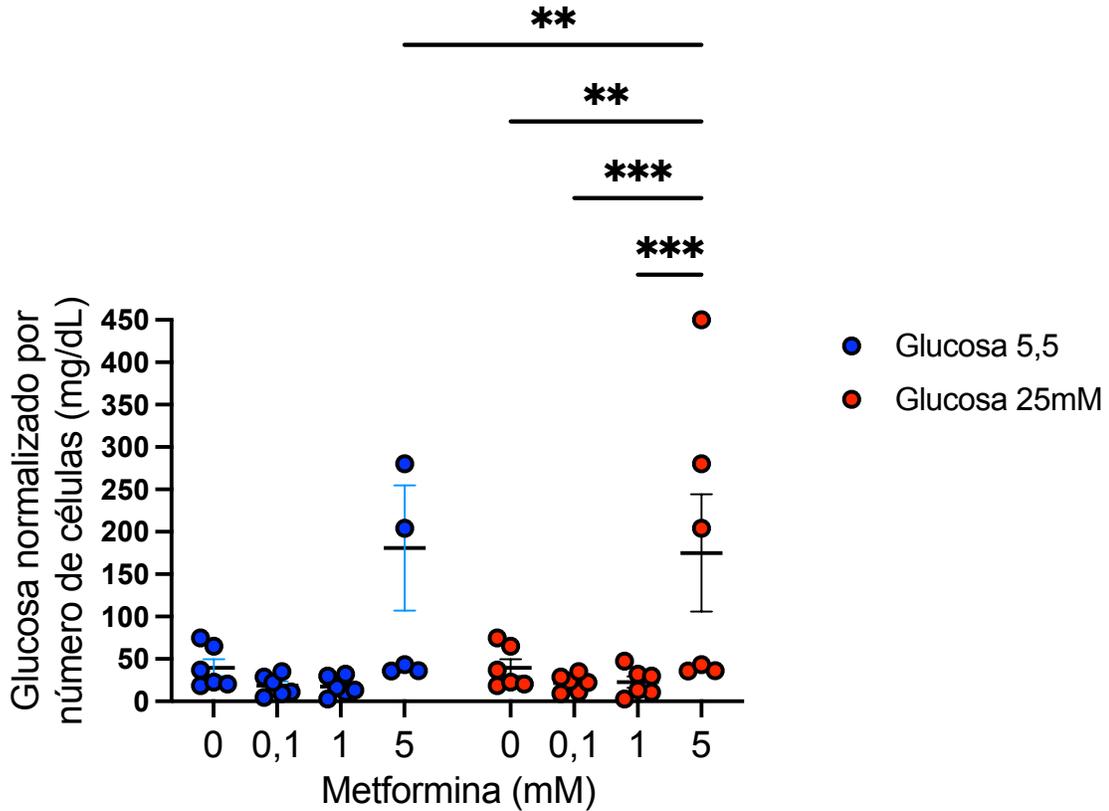


Figura 2: Consumo normalizado de glucosa por linfocitos T CD4+ según concentraciones de glucosa y metformina.

Comparación estadística del consumo de glucosa normalizado por el número de linfocitos T CD4+ entre los grupos de glucosa (5,5mM y 25mM) y metformina (0mM, 0,1mM, 1mM y 5mM) luego de 4 días de cultivo posterior a la activación. La comparación se realizó mediante test ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples obtenidas a por separado con la prueba LSD (*Least significant difference*) de Fisher. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$).

Debido al aumento del consumo de glucosa en el medio por parte de los linfocitos T CD4+ en presencia de alta glucosa y altos niveles de metformina, se procedió a analizar los niveles de lactato en el medio, en las mismas condiciones de cultivo. En la Figura 3 se muestran la producción normalizada de lactato por número de células. Es posible apreciar que en la condición de glucosa 5,5mM, la concentración de metformina 5mM induce un aumento significativo ($p < 0.01$) respecto al resto de las concentraciones. Lo mismo ocurre en la condición de glucosa 25mM, la condición de metformina 5mM induce un aumento significativo ($p < 0.0001$) respecto al resto de las concentraciones de metformina (Figura 3).

Se observaron diferencias entre las condiciones de glucosa 5,5mM y 25mM para la concentración de metformina 5mM ($p < 0,05$), donde la condición glucosa 25mM induce un aumento significativo en la producción de lactato.

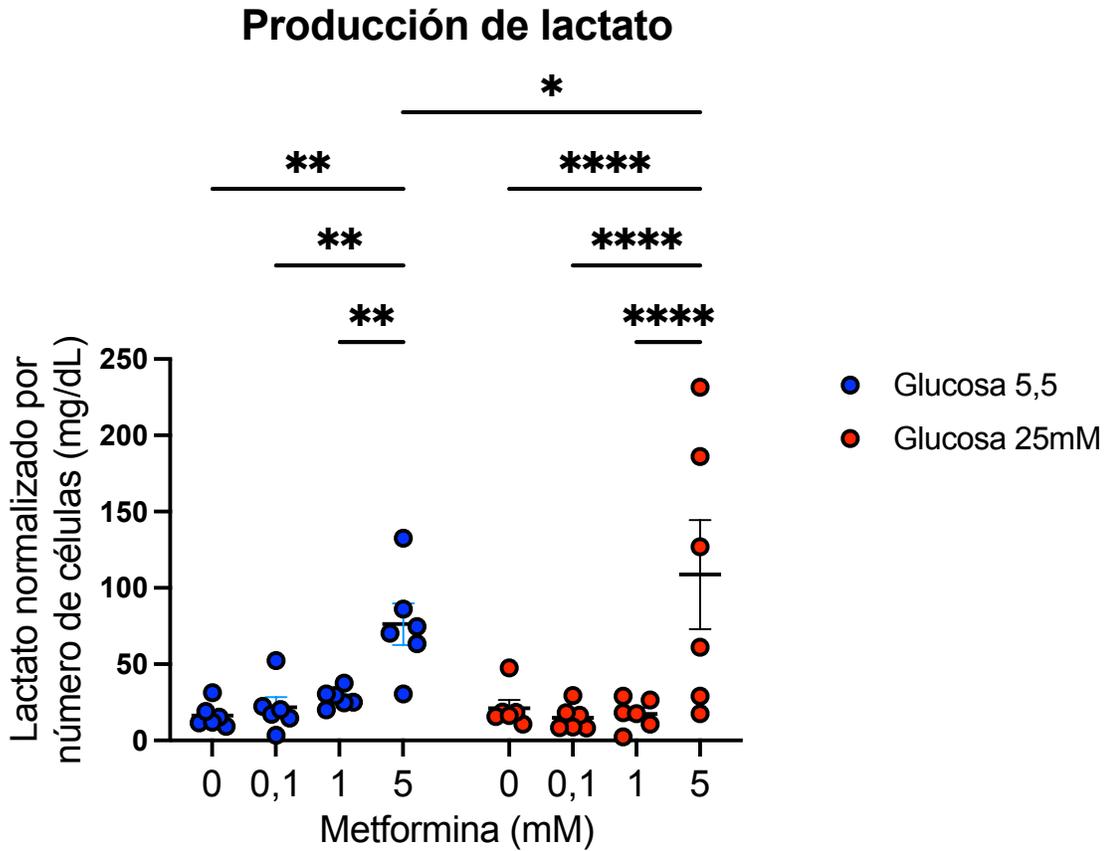


Figura 3: Producción normalizada de lactato por linfocitos T CD4+ según concentraciones de glucosa y metformina.

Comparación estadística de la producción de lactato normalizado por el número de linfocitos T CD4+ entre los grupos de glucosa (5,5mM y 25mM) y metformina (0mM, 0,1mM, 1mM y 5mM) luego de 4 días de cultivo posterior a la activación. La comparación se realizó mediante test ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples obtenidas a por separado con la prueba LSD (*Least significant difference*) de Fisher. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$).

Objetivo específico 2: Valorar el efecto de metformina sobre la actividad de fosfofructoquinasa en linfocitos T CD4+ activados en alta glucosa.

Dentro de las enzimas que participan en la vía glicolítica, la fosfofructoquinasa juega un papel primordial. En nuestro primer objetivo evidenciamos una mayor captación y consumo de glucosa, y una mayor producción de lactato por parte de los linfocitos T CD4+ en presencia de alta glucosa y altos niveles de metformina. Es por esto que procedimos a evaluar si este fenómeno se asociaba con un aumento en la actividad de la fosfofructoquinasa. En la Figura 4 se muestran la actividad normalizada de fosfofructoquinasa por número de células. Es posible apreciar que en la condición de glucosa 5,5mM, no hay diferencias en la actividad de fosfofructoquinasa entre las distintas concentraciones de metformina. En tanto que en la condición de glucosa 25mM, la condición de metformina 5mM induce un aumento significativo ($p < 0.01$) respecto al resto de las concentraciones de metformina (Figura 4).

Se observaron diferencias entre las condiciones de glucosa 5,5mM y 25mM para la concentración de metformina 5mM ($p < 0.05$), donde la condición glucosa 25mM induce un aumento significativo en la actividad de fosfofructoquinasa.

Actividad de fosfofructoquinasa

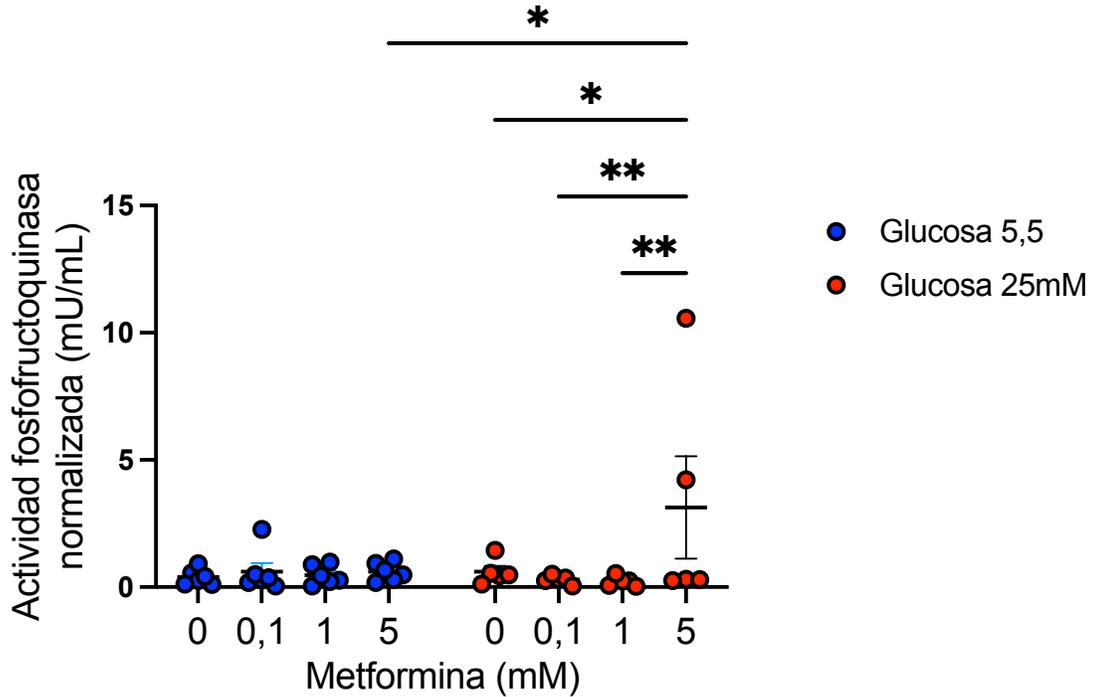


Figura 4: Actividad normalizada de fosfofructoquinasa de linfocitos T CD4+ según concentraciones de glucosa y metformina.

Comparación estadística de la actividad de la enzima fosfofructoquinasa normalizada por el número de linfocitos T CD4+ entre los grupos de glucosa (5,5mM y 25mM) y metformina (0mM, 0,1mM, 1mM y 5mM) luego de 4 días de cultivo posterior a la activación. La comparación se realizó mediante test ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples obtenidas a por separado con la prueba LSD (*Least significant difference*) de Fisher. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$).

Objetivo específico 3: Evaluar el efecto de metformina sobre la proliferación, ciclo celular y la expresión de los marcadores de activación en linfocitos T CD4+ activados en alta glucosa.

La actividad glicolítica en los linfocitos T CD4+ ha sido ampliamente asociada a su función efectora. Es por esto que evaluamos si el aumento de la vía glicolítica se asociaba con un aumento de la respuesta proliferativa y los marcadores de activación en el linfocito T activado. En la Figura 5 se muestra el recuento celular normalizado al cabo de 4 días de cultivo. Es posible apreciar que en la condición de glucosa 5,5mM, la condición de metformina 5mM induce una disminución significativa ($p < 0,05$) respecto a metformina 0mM y 0,1mM. En tanto que en la condición de glucosa 25mM, la condición de metformina 5mM induce una disminución significativa ($p < 0.0001$) respecto al resto de las concentraciones de metformina. Sin embargo destaca que respecto al control sin metformina, la concentración de 0,1mM induce un aumento significativo ($p < 0,05$) del recuento celular en glucosa 25mM (Figura 5).

Se observaron diferencias entre las condiciones de glucosa 5,5mM y 25mM para la concentración de metformina 0mM, 0,1mM y 1mM ($p < 0.01$), donde glucosa 25mM induce un aumento significativo del recuento celular.

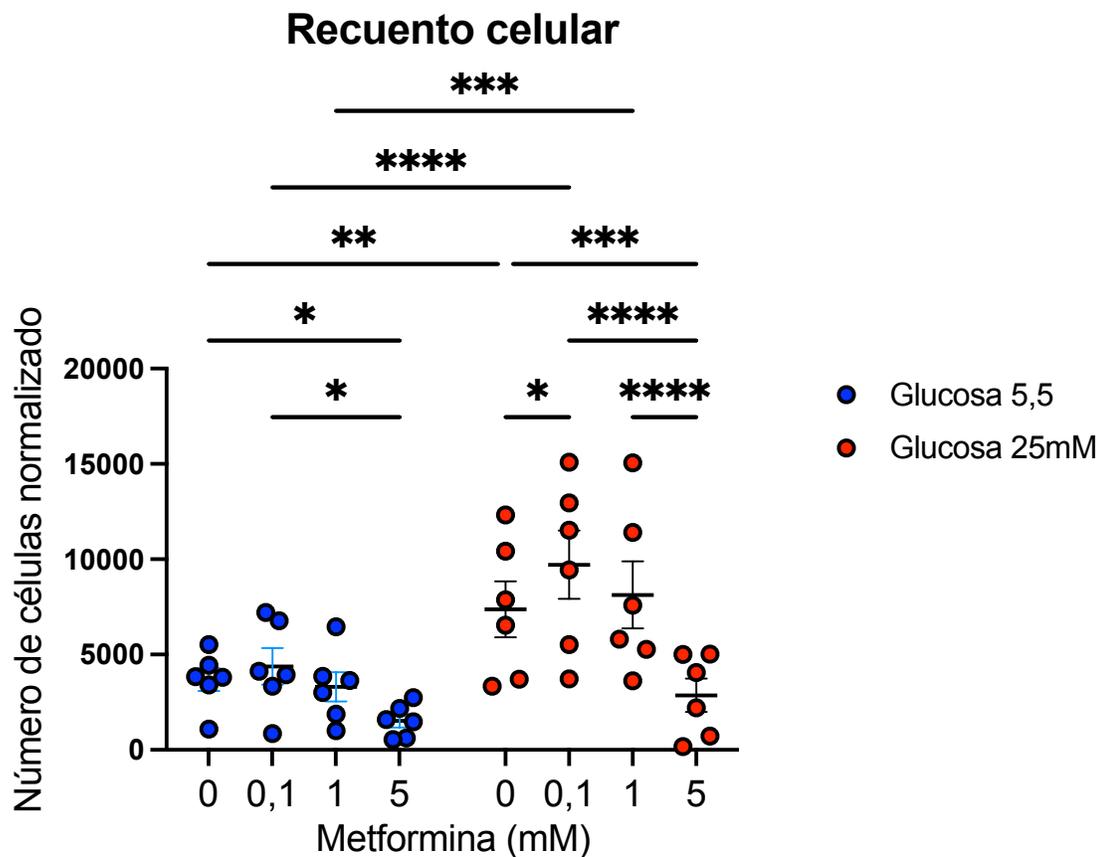


Figura 5: Recuento celular normalizado de linfocitos T CD4+ según concentraciones de glucosa y metformina.

Comparación estadística del número de linfocitos T CD4+ entre los grupos de glucosa (5,5mM y 25mM) y metformina (0mM, 0,1mM, 1mM y 5mM) luego de 4 días de cultivo posterior a la activación. La comparación se realizó mediante test ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples obtenidas a por separado con la prueba LSD (*Least significant difference*) de Fisher. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$).

Una vez evaluado el recuento total de células T CD4+ posterior al cultivo con las distintas condiciones, determinamos que el efecto de alta concentración de metformina fue capaz de reducir el recuento celular en ambas condiciones de glucosa, por lo tanto, procedimos a evaluar si este resultado se debía a una alteración en la proliferación celular. En la Figura 6 se muestra el número de células no divididas en el cuarto día de cultivo. Es posible apreciar que en la condición de glucosa 5,5mM, la condición de metformina 5mM induce un aumento significativo ($p < 0,01$) respecto al resto de concentraciones. En tanto que en la condición de glucosa 25mM, la condición de metformina 5mM induce un aumento significativo ($p < 0,05$) respecto a metformina 0mM y 0,1mM (Figura 6).

Se observaron diferencias entre las condiciones de glucosa 5,5mM y 25mM para la concentración de metformina 5mM ($p < 0,05$), donde glucosa 25mM induce una disminución significativa del número de células no divididas.

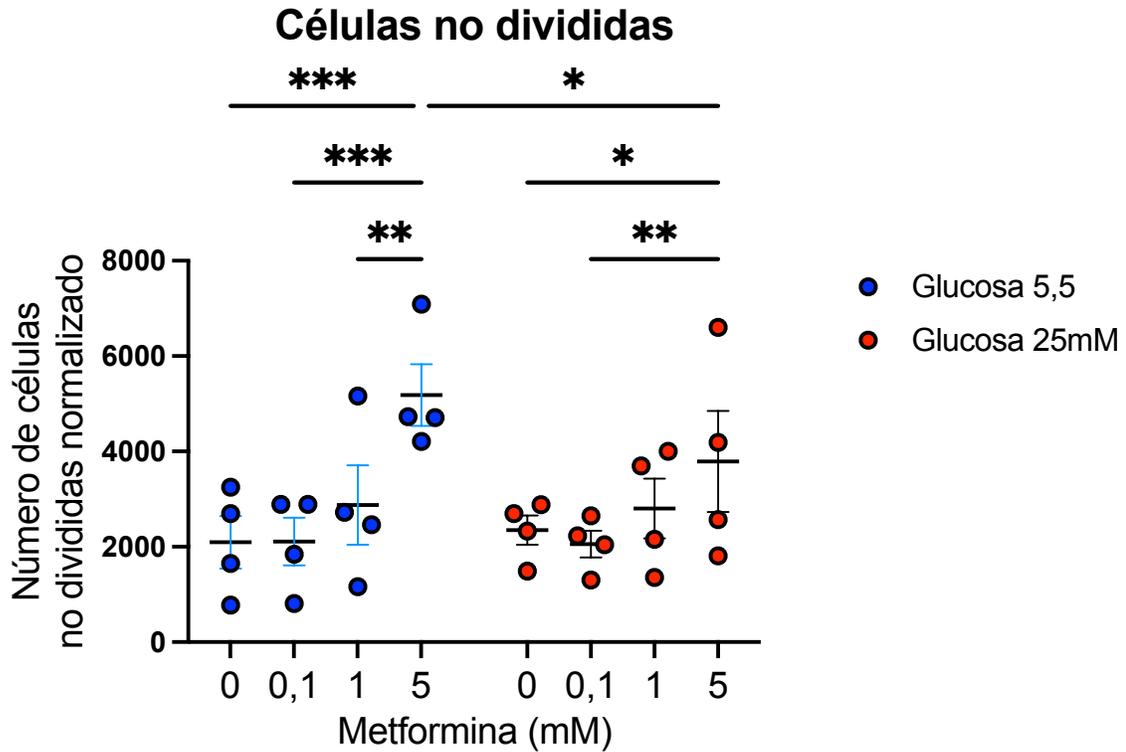


Figura 6: Número normalizado de linfocitos T CD4+ no divididos según concentraciones de glucosa y metformina.

Comparación estadística del número de linfocitos T CD4+ no divididos entre los grupos de glucosa (5,5mM y 25mM) y metformina (0mM, 0,1mM, 1mM y 5mM) luego de 4 días de cultivo posterior a la activación. La comparación se realizó mediante test ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples obtenidas a por separado con la prueba LSD (*Least significant difference*) de Fisher. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$).

En las Figura 7 a 10 se muestra los índices de la plataforma de proliferación de FlowJo. En términos generales es posible apreciar que en ambas condiciones de glucosa, la condición de metformina 5mM induce una disminución significativa del índice de proliferación (Figura 7), índice de división (Figura 8), índice de replicación (Figura 9) y el índice de expansión (Figura 10), respecto al resto de concentraciones.

Se observaron diferencias entre las condiciones de glucosa 5,5mM y 25mM para la mayoría de las concentraciones de metformina ($p < 0.01$), donde glucosa 25mM induce un aumento significativo de los distintos índices de la plataforma de proliferación de FlowJo.

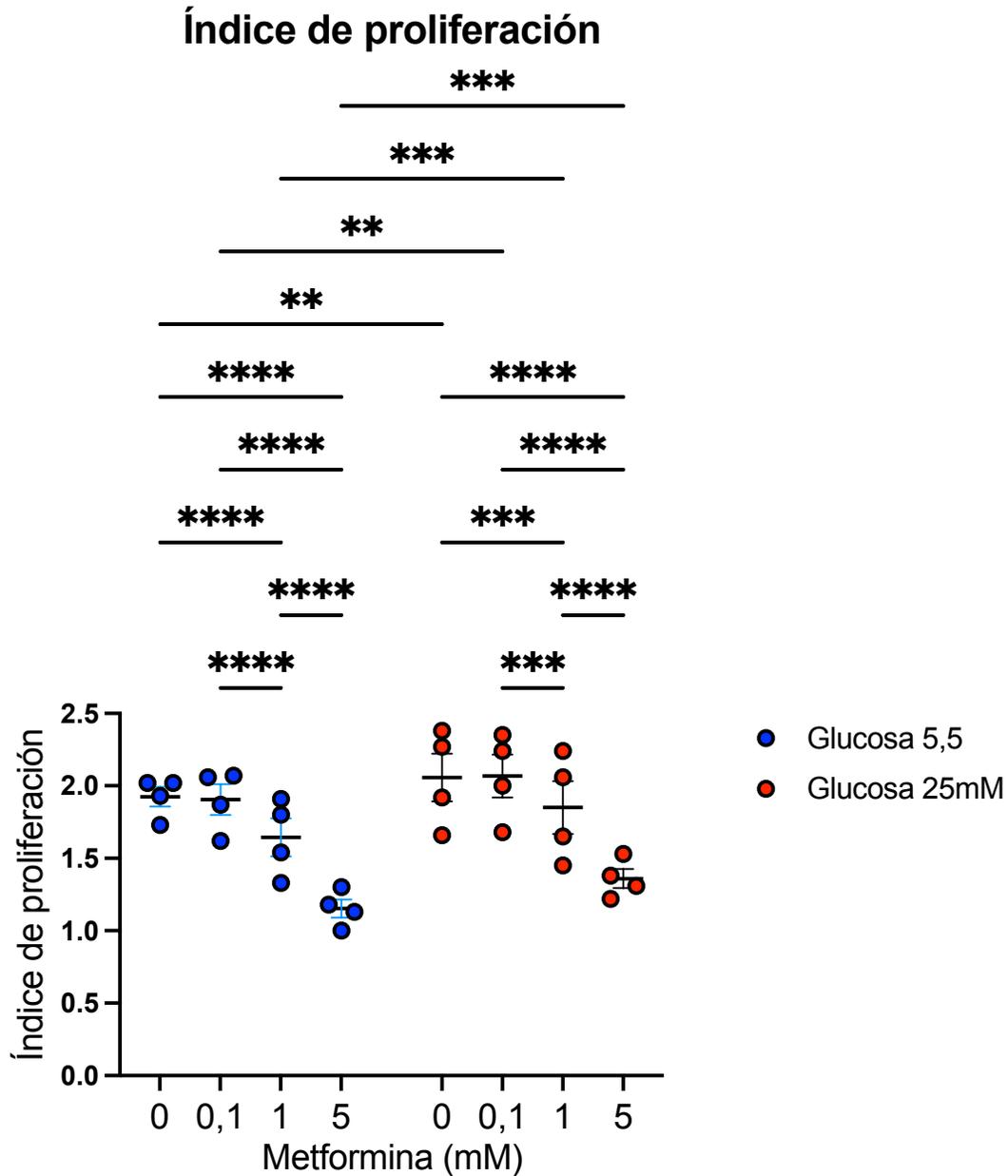


Figura 7: Índice de proliferación de linfocitos T CD4+ no divididos según concentraciones de glucosa y metformina.

Comparación estadística del índice de proliferación de linfocitos T CD4+ entre los grupos de glucosa (5,5mM y 25mM) y metformina (0mM, 0,1mM, 1mM y 5mM) luego de 4 días de cultivo posterior a la activación. La comparación se realizó mediante test ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples obtenidas a por separado con la prueba LSD (*Least significant difference*) de Fisher. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$).

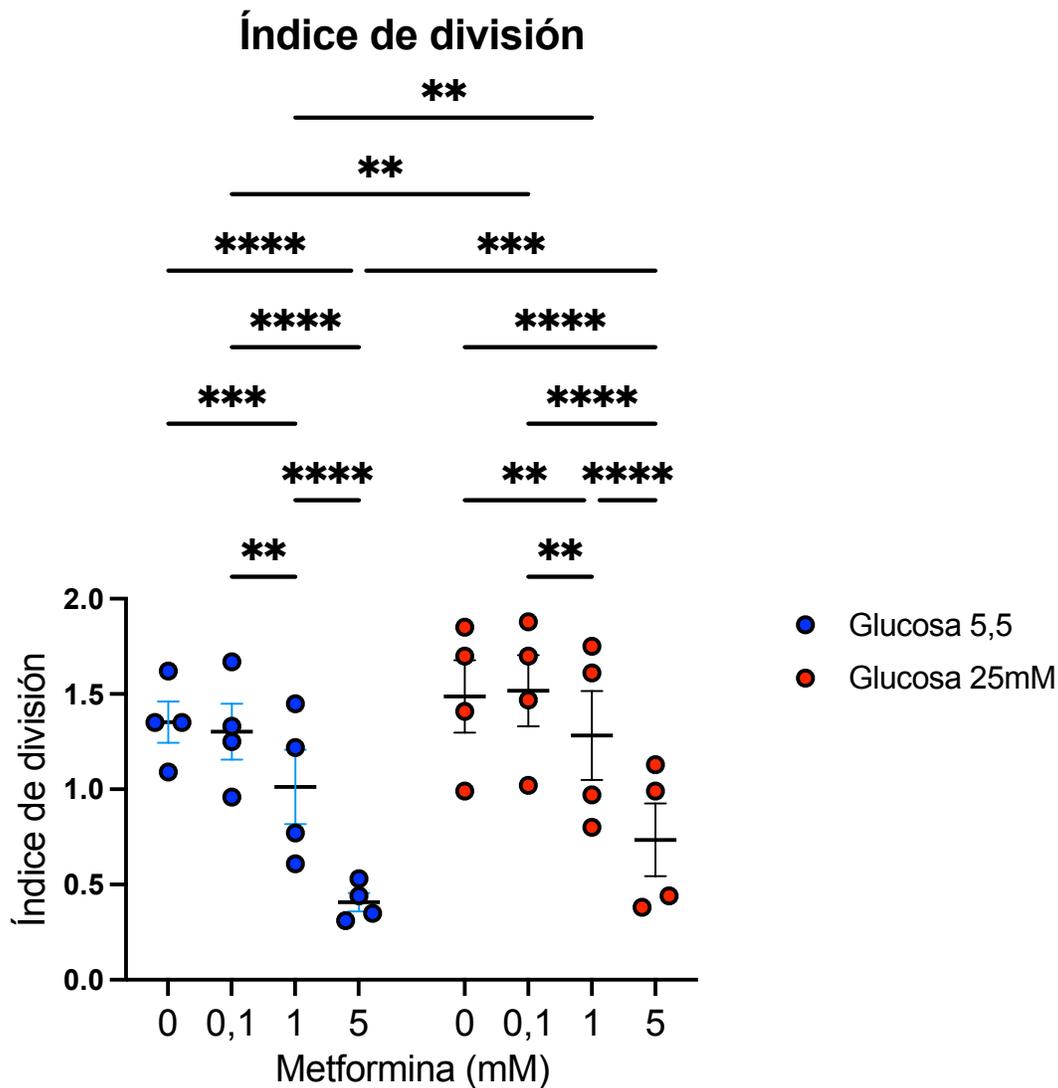


Figura 8: Índice de división de linfocitos T CD4+ no divididos según concentraciones de glucosa y metformina.

Comparación estadística del índice de división de linfocitos T CD4+ entre los grupos de glucosa (5,5mM y 25mM) y metformina (0mM, 0,1mM, 1mM y 5mM) luego de 4 días de cultivo posterior a la activación. La comparación se realizó mediante test ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples obtenidas a por separado con la prueba LSD (*Least significant difference*) de Fisher. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$).

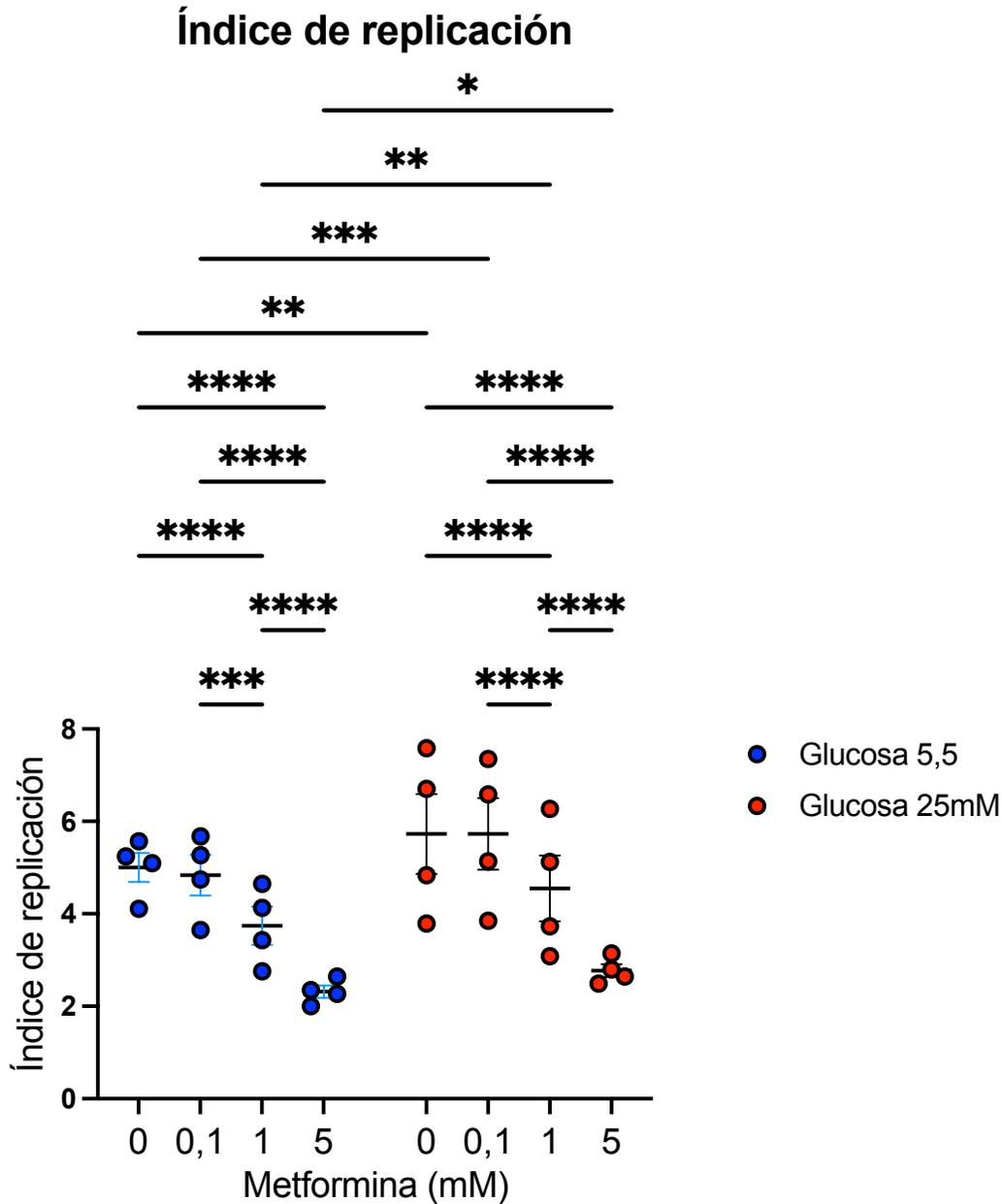


Figura 9: Índice de replicación de linfocitos T CD4+ no divididos según concentraciones de glucosa y metformina.

Comparación estadística del índice de replicación de linfocitos T CD4+ entre los grupos de glucosa (5,5mM y 25mM) y metformina (0mM, 0,1mM, 1mM y 5mM) luego de 4 días de cultivo posterior a la activación. La comparación se realizó mediante test ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples obtenidas a por separado con la prueba LSD (*Least significant difference*) de Fisher. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$).

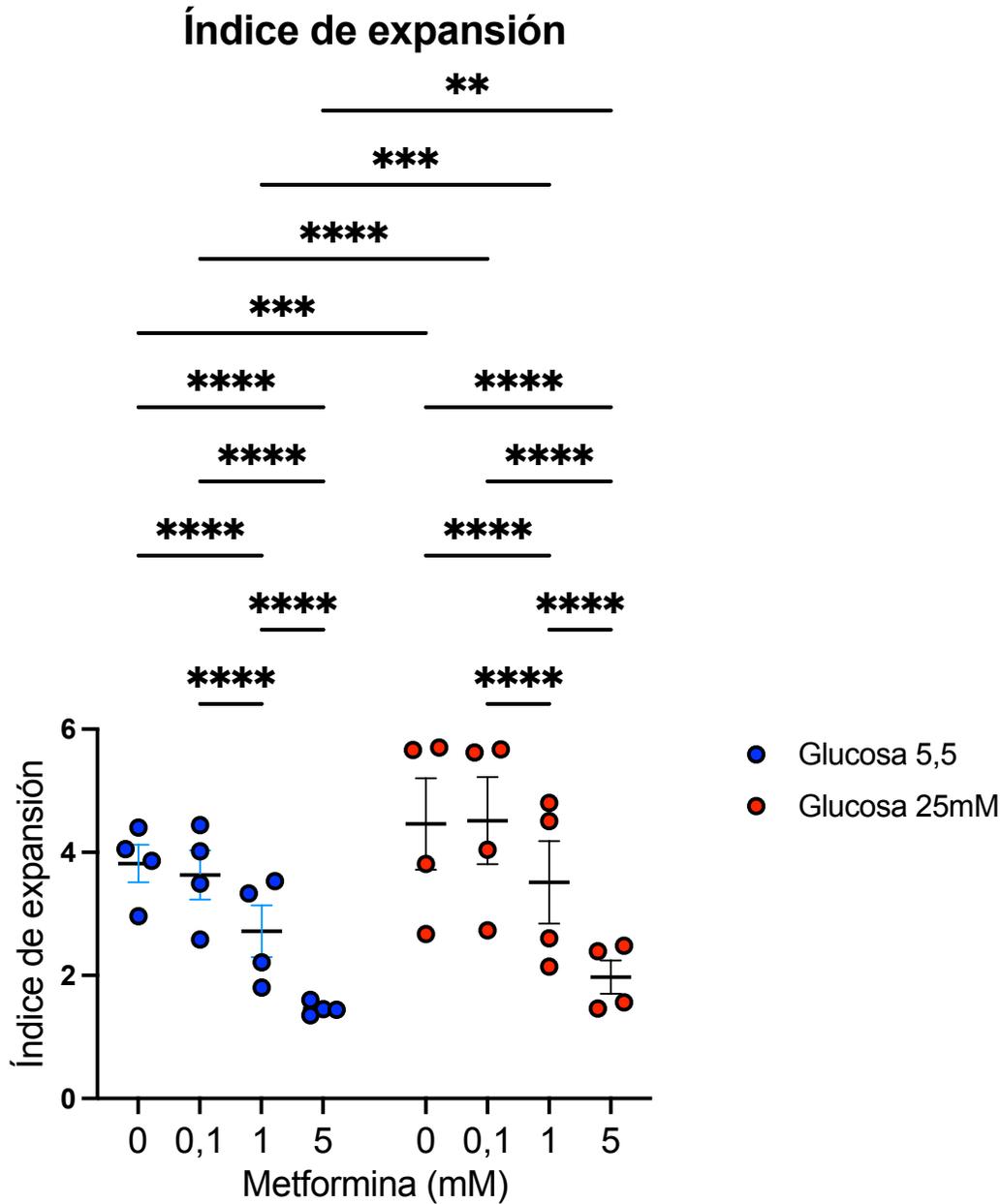


Figura 10: Índice de expansión de linfocitos T CD4+ no divididos según concentraciones de glucosa y metformina.

Comparación estadística del índice de replicación de linfocitos T CD4+ entre los grupos de glucosa (5,5mM y 25mM) y metformina (0mM, 0,1mM, 1mM y 5mM) luego de 4 días de cultivo posterior a la activación. La comparación se realizó mediante test ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples obtenidas a por separado con la prueba LSD (*Least significant difference*) de Fisher. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$).

Luego de analizar los parámetros de recuento y proliferación celular, evaluamos si la metformina presentaba algún efecto sobre la activación celular. Primero analizamos el marcador CD69, el cual es un marcador temprano de activación celular. En la Figura 11 se muestra el porcentaje de linfocitos T CD4+CD69+. Es posible apreciar que en ambas concentraciones de glucosa, la concentración de metformina 5mM induce un aumento significativo ($p < 0,001$) respecto al resto de las concentraciones.

Se observaron diferencias entre las condiciones de glucosa 5,5mM y 25mM para la concentración de metformina 5mM ($p < 0.05$), donde glucosa 25mM induce un aumento significativo del porcentaje de CD69+.

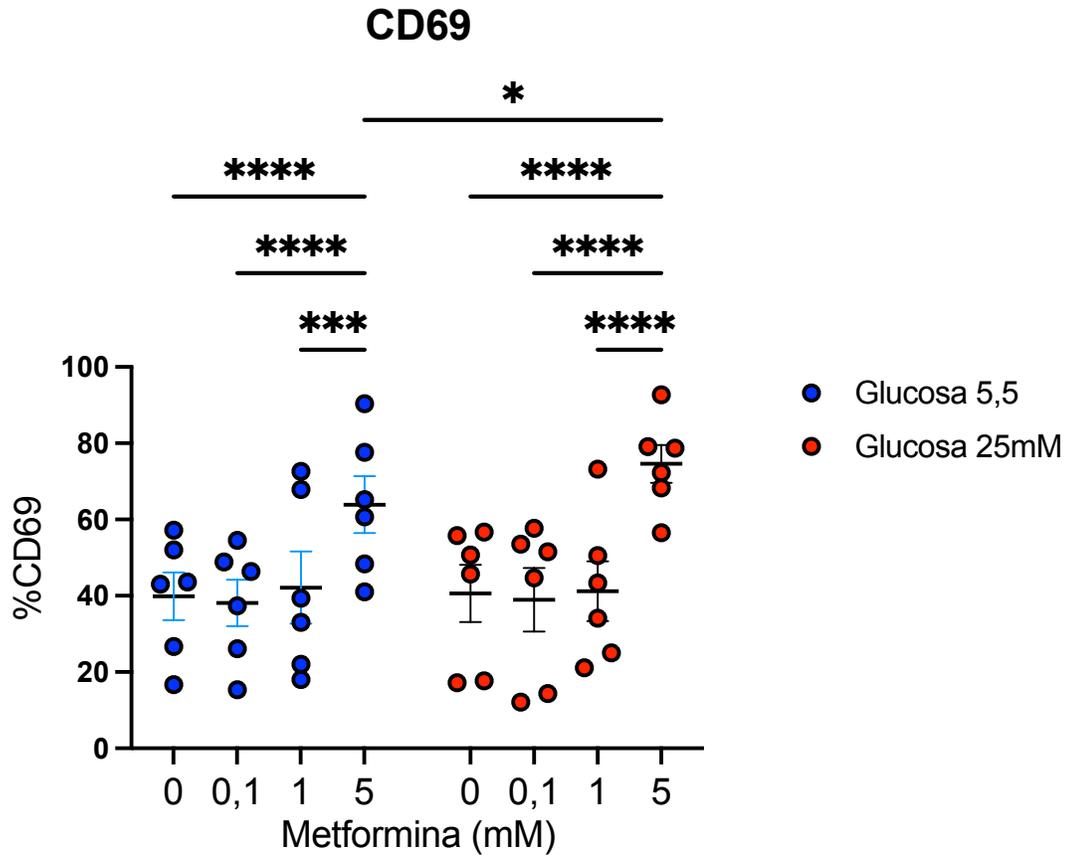


Figura 11: Porcentaje de linfocitos T CD4+ CD69+ según concentraciones de glucosa y metformina.

Comparación estadística del porcentaje de linfocitos T CD4+ CD69+ entre los grupos de glucosa (5,5mM y 25mM) y metformina (0mM, 0,1mM, 1mM y 5mM) luego de 4 días de cultivo posterior a la activación. La comparación se realizó mediante test ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples obtenidas a por separado con la prueba LSD (*Least significant difference*) de Fisher. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$).

Luego se analizó la expresión del CD25, el cual corresponde a es la cadena alfa del receptor de IL-2, citoquina principal asociada al proceso proliferativo del linfocito. La Figura 12 muestra el porcentaje de expresión del CD25 en linfocitos T CD4+. Es posible apreciar que este marcador se encuentra altamente expresado en linfocitos activados en ambas concentraciones de glucosa, sin embargo, la concentración de metformina 5mM fue capaz de inducir una disminución significativa ($p < 0,001$) respecto al resto de las concentraciones.

No se observaron diferencias entre las condiciones de glucosa 5,5mM y 25mM para las distintas concentraciones de metformina.

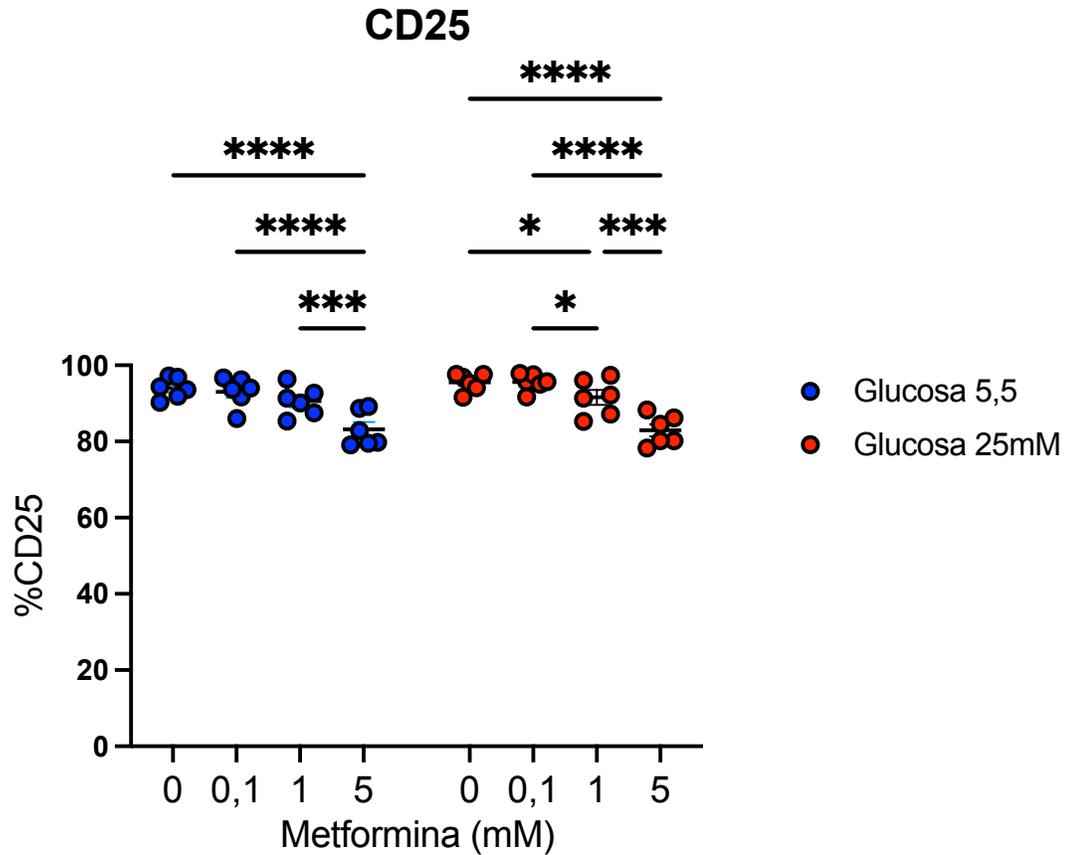


Figura 12: Porcentaje de linfocitos T CD4+ CD25+ según concentraciones de glucosa y metformina.

Comparación estadística del porcentaje de linfocitos T CD4+ CD25+ entre los grupos de glucosa (5,5mM y 25mM) y metformina (0mM, 0,1mM, 1mM y 5mM) luego de 4 días de cultivo posterior a la activación. La comparación se realizó mediante test ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples obtenidas a por separado con la prueba LSD (*Least significant difference*) de Fisher. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$).

Los resultados han indicado que linfocitos T CD4+ activados en presencia de alta concentración de metformina se mantienen activados y metabólicamente activos, sin embargo, pese a este estado activado, las células no son capaces de proliferar, reduciendo el recuento celular al final del cultivo. Es por esto que se procedió a analizar si este efecto se debía a que la metformina era capaz de afectar el ciclo celular. En las Figuras 13 a 15 se muestra el porcentaje de linfocitos T CD4+ en las distintas fases de la interfase del ciclo celular. Es posible apreciar que en ambas concentraciones de glucosa, la concentración de metformina 5mM induce una disminución significativa ($p < 0,01$) del porcentaje en fase G1 respecto al resto de las concentraciones (Figura 13), asociado a un aumento significativo ($p < 0,01$) del porcentaje en fase S (Figura 14) y G2 (Figura 15).

No se observaron diferencias de la distribución porcentual de fases G1, S y G2 entre las condiciones de glucosa 5,5mM y 25mM para las distintas concentraciones de metformina.

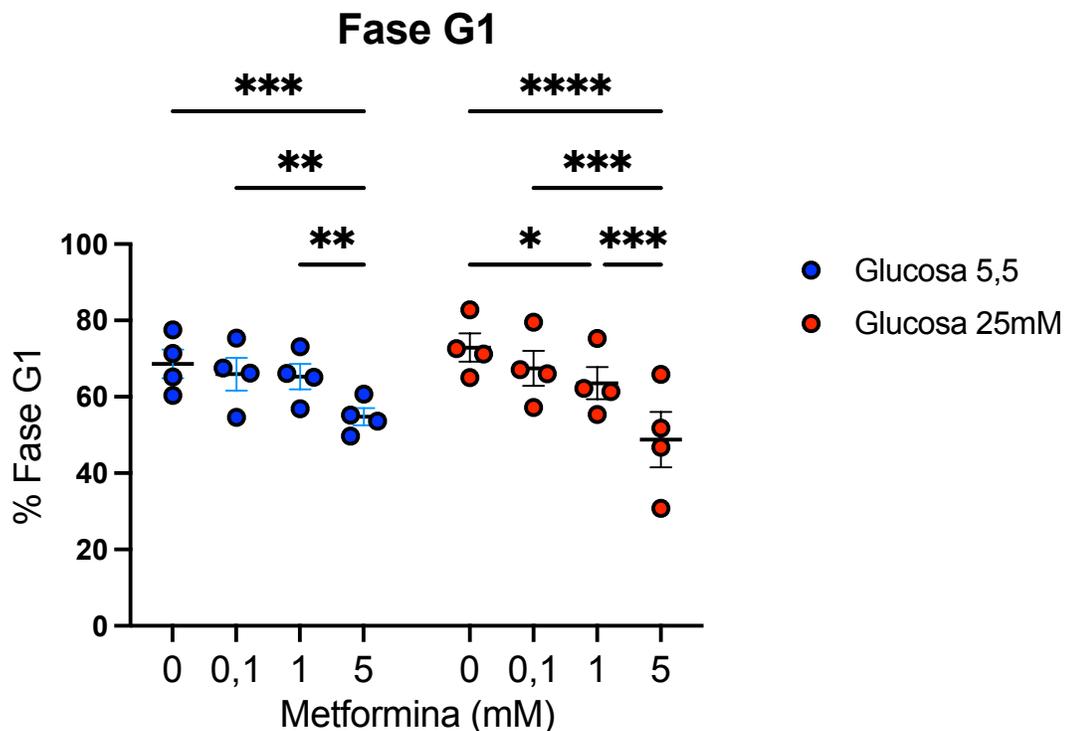


Figura 13: Porcentaje de linfocitos T CD4+ en fase G1 según concentraciones de glucosa y metformina.

Comparación estadística del porcentaje de linfocitos T CD4+ en fase G1 entre los grupos de glucosa (5,5mM y 25mM) y metformina (0mM, 0,1mM, 1mM y 5mM) luego de 4 días de cultivo posterior a la activación. La comparación se realizó mediante test ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples obtenidas a por separado con la prueba LSD (*Least significant difference*) de Fisher. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$).

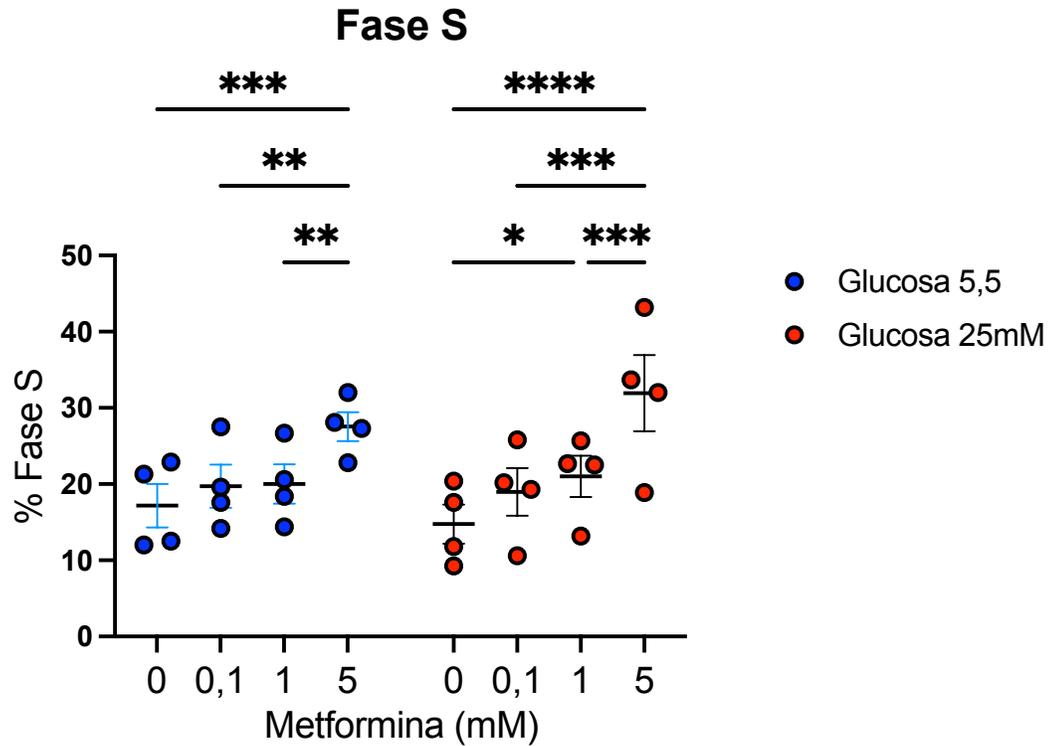


Figura 14: Porcentaje de linfocitos T CD4+ en fase S según concentraciones de glucosa y metformina.

Comparación estadística del porcentaje de linfocitos T CD4+ en fase S entre los grupos de glucosa (5,5mM y 25mM) y metformina (0mM, 0,1mM, 1mM y 5mM) luego de 4 días de cultivo posterior a la activación. La comparación se realizó mediante test ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples obtenidas a por separado con la prueba LSD (*Least significant difference*) de Fisher. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$).

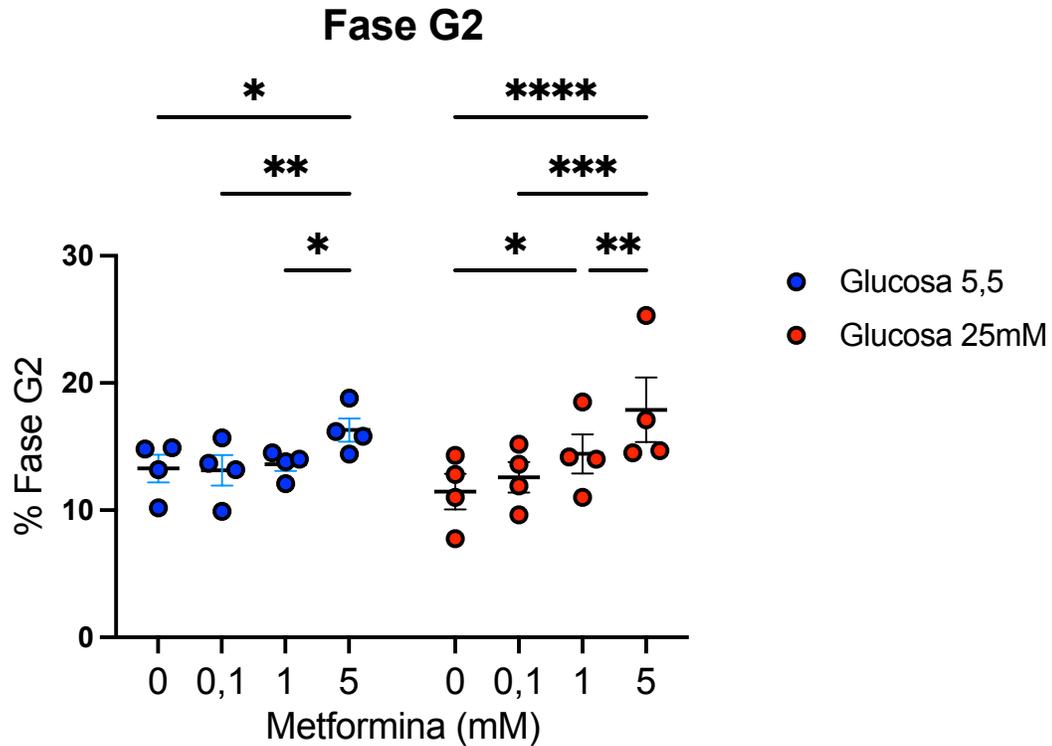


Figura 15: Porcentaje de linfocitos T CD4+ en fase G2 según concentraciones de glucosa y metformina.

Comparación estadística del porcentaje de linfocitos T CD4+ en fase G2 entre los grupos de glucosa (5,5mM y 25mM) y metformina (0mM, 0,1mM, 1mM y 5mM) luego de 4 días de cultivo posterior a la activación. La comparación se realizó mediante test ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples obtenidas a por separado con la prueba LSD (*Least significant difference*) de Fisher. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$).

Objetivo específico 4: Evaluar el efecto de metformina sobre la producción de citoquinas en linfocitos T CD4+ activados en alta glucosa.

Finalmente, se procedió a analizar la última respuesta efectora característica de linfocitos CD4+ activados, la secreción de citoquinas de linaje T *helper* Th1, Th2 y Th17. En la Figura 16 se muestran las concentraciones de IL-17. Es posible apreciar que en glucosa 5,5mM, la concentración de metformina 0,1 mM y 5mM inducen una disminución significativa ($p < 0,05$) respecto a la condición sin metformina (Figura 16). En tanto que en glucosa 25mM no se observaron diferencias significativas (Figura 16). Tampoco se observaron diferencias entre las condiciones de glucosa 5,5mM y 25mM para las distintas concentraciones de metformina (Figura 16).

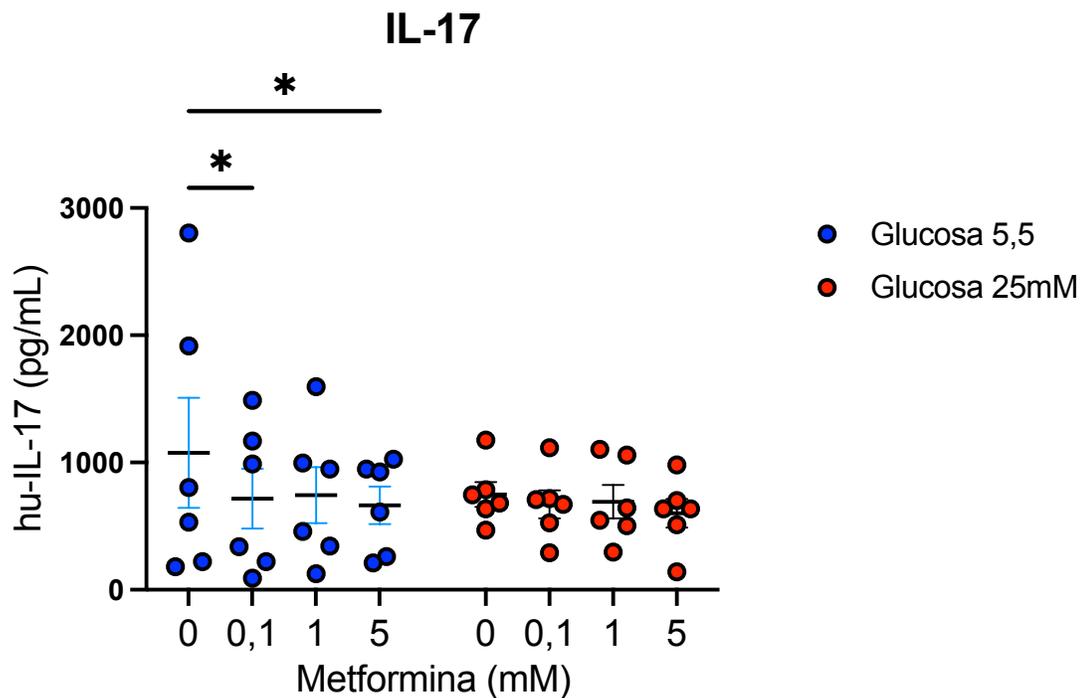


Figura 16: Concentración de IL-17 producida por linfocitos T CD4+ según concentraciones de glucosa y metformina.

Comparación estadística de la concentración de IL-17 producida por linfocitos T CD4+ entre los grupos de glucosa (5,5mM y 25mM) y metformina (0mM, 0,1mM, 1mM y 5mM) luego de 4 días de cultivo posterior a la activación. La comparación se realizó mediante test ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples obtenidas a por separado con la prueba LSD (*Least significant difference*) de Fisher. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$).

En la Figura 17 se muestran las concentraciones de la principal citoquina pro-inflamatoria asociada a la respuesta Th1, el IFN- γ . Es posible apreciar que en glucosa 25mM, la concentración de metformina 0,1 mM y 5mM inducen una disminución significativa ($p < 0,05$) respecto a la condición sin metformina. En tanto que en glucosa 5,5mM no se observaron diferencias significativas (Figura 17).

Se observaron diferencias entre las condiciones de glucosa 5,5mM y 25mM para metformina 5mM, donde glucosa 25mM induce una disminución significativa ($p < 0,05$) de IFN- γ (Figura 17).

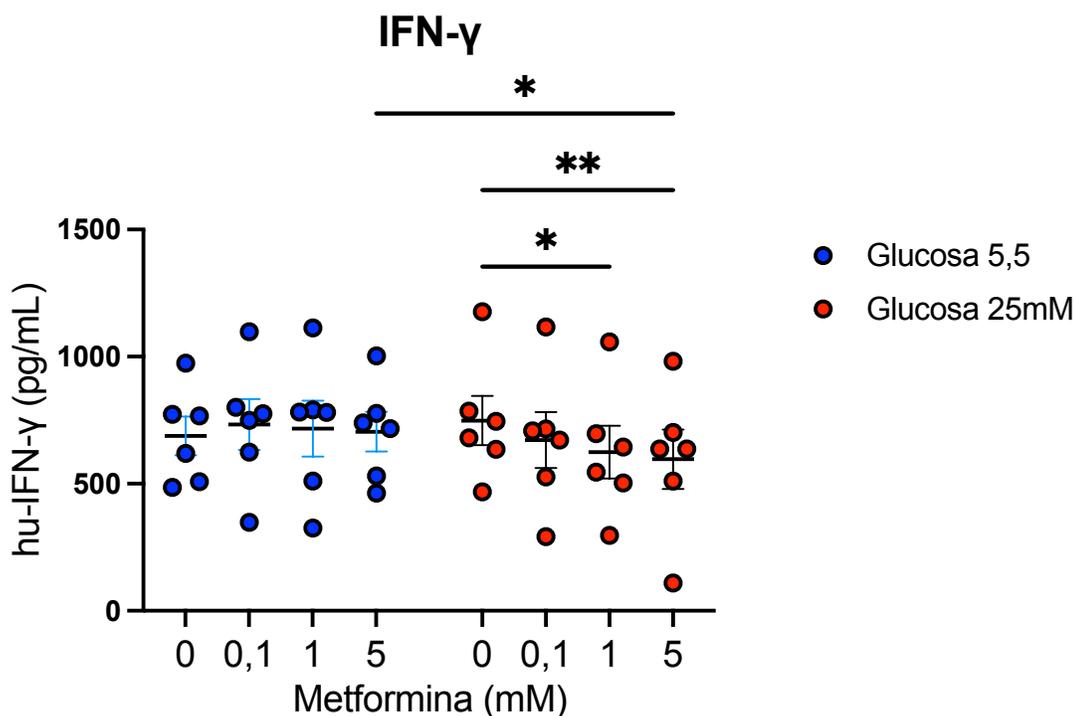


Figura 17: Concentración de IFN- γ producida por linfocitos T CD4+ según concentraciones de glucosa y metformina.

Comparación estadística de la concentración de IFN- γ producida por linfocitos T CD4+ entre los grupos de glucosa (5,5mM y 25mM) y metformina (0mM, 0,1mM, 1mM y 5mM) luego de 4 días de cultivo posterior a la activación. La comparación se realizó mediante test ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples obtenidas a por separado con la prueba LSD (*Least significant difference*) de Fisher. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$).

En la Figura 18 se muestran las concentraciones de TNF- α . No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de metformina y glucosa (Figura 18).

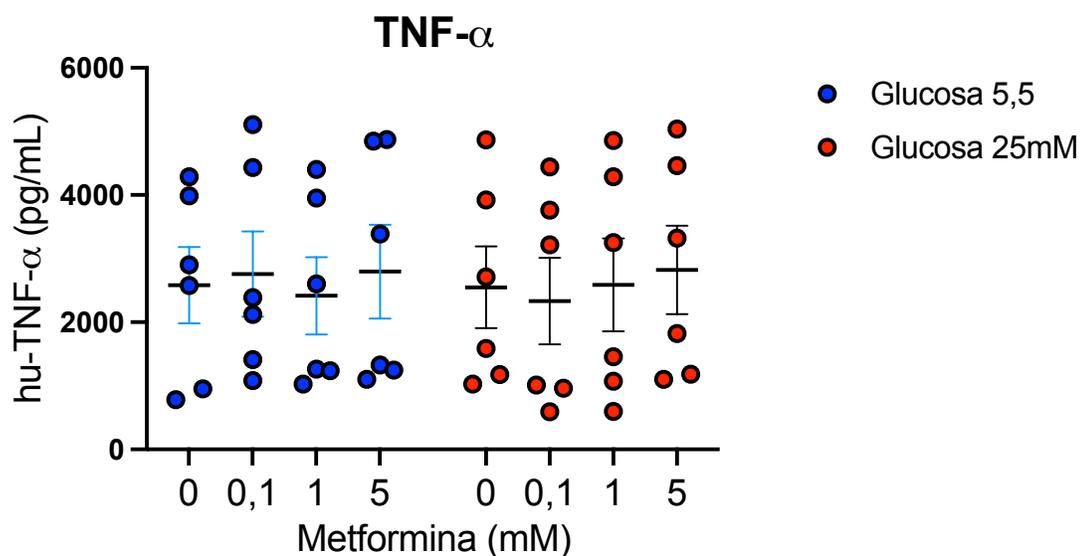


Figura 18: Concentración de TNF- α producida por linfocitos T CD4+ según concentraciones de glucosa y metformina.

Comparación estadística de la concentración de TNF- α producida por linfocitos T CD4+ entre los grupos de glucosa (5,5mM y 25mM) y metformina (0mM, 0,1mM, 1mM y 5mM) luego de 4 días de cultivo posterior a la activación. La comparación se realizó mediante test ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples obtenidas a por separado con la prueba LSD (*Least significant difference*) de Fisher. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$).

En la Figura 19 se muestran las concentraciones de IL-10. Es posible apreciar que en glucosa 5,5mM, la concentración de metformina 5mM induce una disminución significativa ($p < 0,01$) respecto a la condición metformina 0mM y 0,1mM. En tanto que en glucosa 25mM no se observaron diferencias significativas (Figura 19).

Se observaron diferencias entre las condiciones de glucosa 5,5mM y 25mM para las concentraciones de metformina 0mM y 0,1mM, donde glucosa 25mM induce una disminución significativa ($p < 0,0001$) de IL-10.

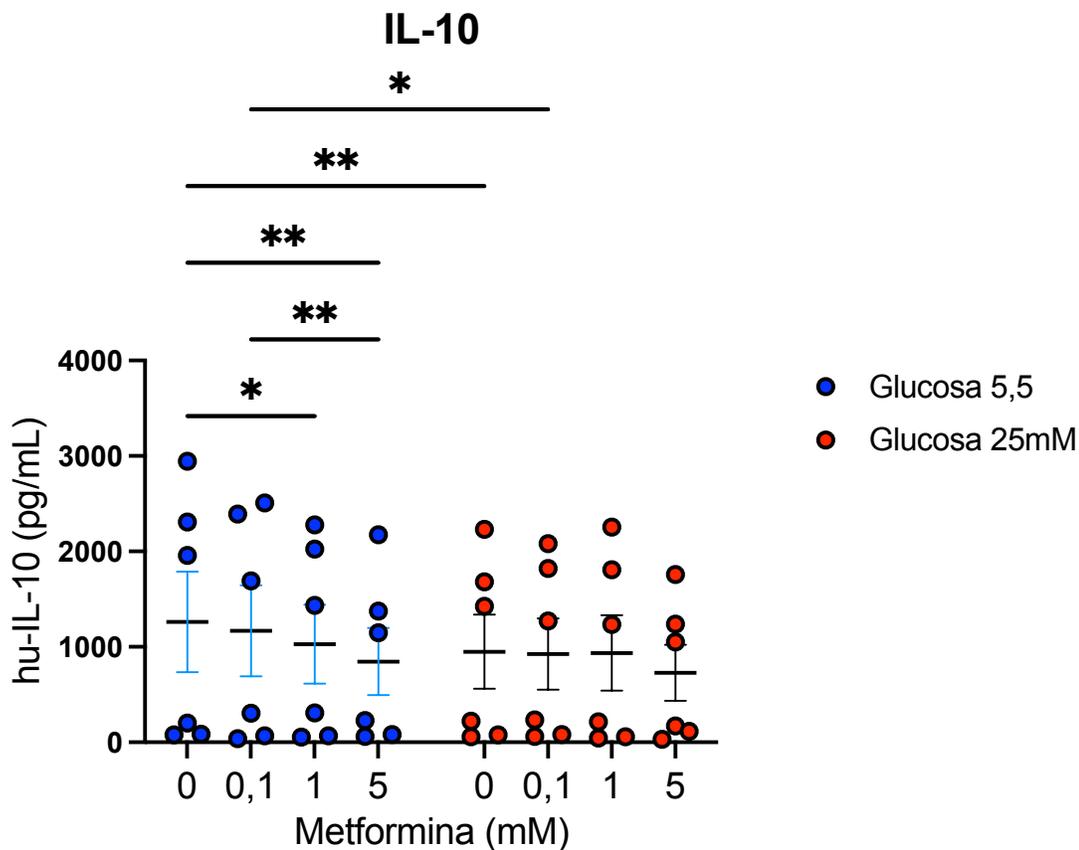


Figura 19: Concentración de IL-10 producida por linfocitos T CD4+ según concentraciones de glucosa y metformina.

Comparación estadística de la concentración de IL-10 producida por linfocitos T CD4+ entre los grupos de glucosa (5,5mM y 25mM) y metformina (0mM, 0,1mM, 1mM y 5mM) luego de 4 días de cultivo posterior a la activación. La comparación se realizó mediante test ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples obtenidas a por separado con la prueba LSD (*Least significant difference*) de Fisher. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$).

En la Figura 20 se muestran las concentraciones de IL-6. Es posible apreciar que en ambas concentraciones de glucosa, la concentración de metformina 0,1mM y 1mM induce una disminución significativa ($p < 0,05$) respecto a la condición sin metformina. Luego en metformina 5mM se aprecia un aumento de IL-6, pero que no logra ser estadísticamente significativo (Figura 20).

No se observaron diferencias entre las condiciones de glucosa 5,5mM y 25mM para las distintas concentraciones de metformina.

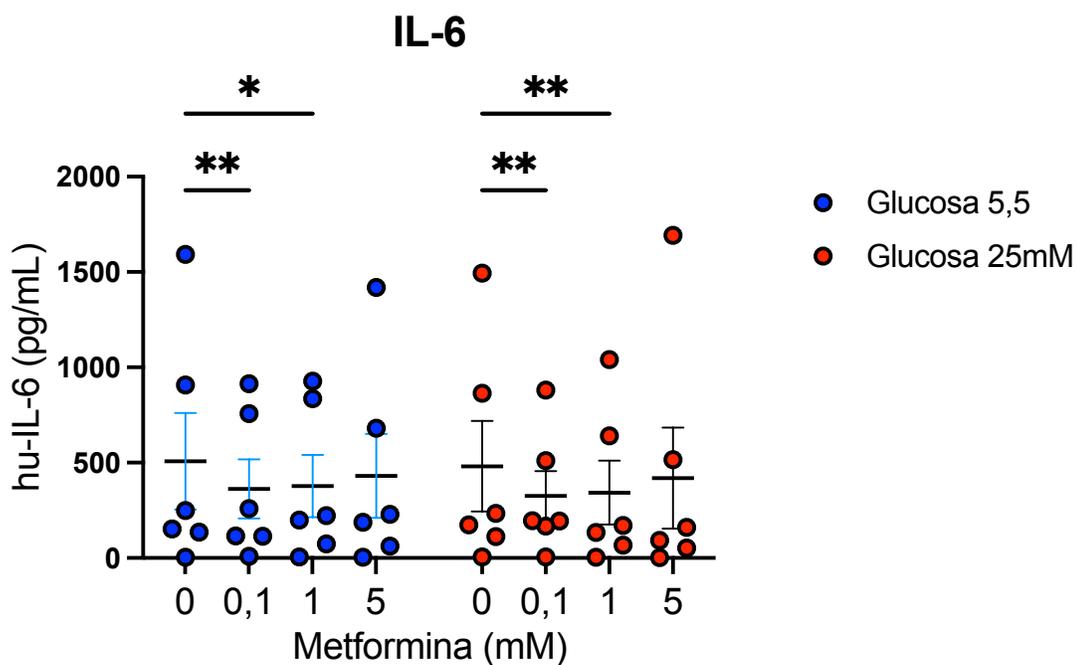


Figura 20: Concentración de IL-6 producida por linfocitos T CD4+ según concentraciones de glucosa y metformina.

Comparación estadística de la concentración de IL-6 producida por linfocitos T CD4+ entre los grupos de glucosa (5,5mM y 25mM) y metformina (0mM, 0,1mM, 1mM y 5mM) luego de 4 días de cultivo posterior a la activación. La comparación se realizó mediante test ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples obtenidas a por separado con la prueba LSD (*Least significant difference*) de Fisher. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$).

En la Figura 21 se muestran las concentraciones de IL-4. Es posible apreciar que en ambas concentraciones de glucosa, la concentración de metformina 5mM induce un aumento significativo ($p < 0,05$) respecto al resto de las concentraciones (Figura 21).

Se observaron diferencias entre las condiciones de glucosa 5,5mM y 25mM para metformina 5mM, donde glucosa 25mM induce una disminución significativa ($p < 0,05$) de IL-4.

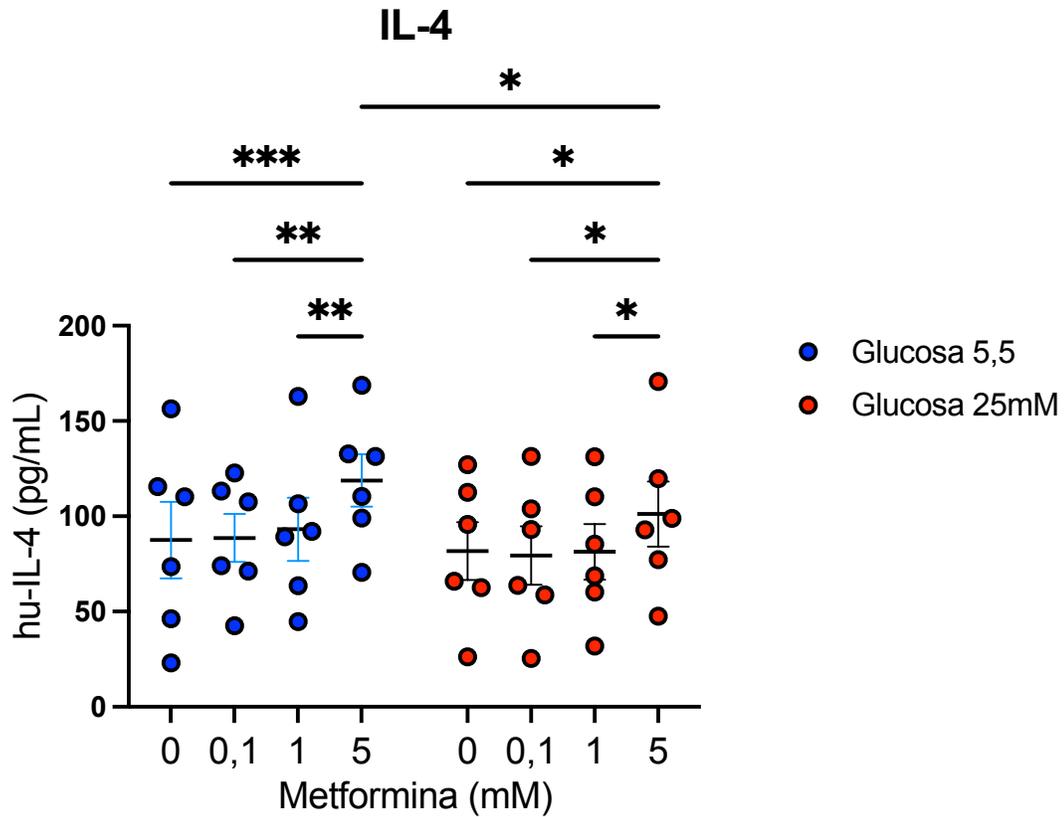


Figura 21: Concentración de IL-4 producida por linfocitos T CD4+ según concentraciones de glucosa y metformina.

Comparación estadística de la concentración de IL-4 producida por linfocitos T CD4+ entre los grupos de glucosa (5,5mM y 25mM) y metformina (0mM, 0,1mM, 1mM y 5mM) luego de 4 días de cultivo posterior a la activación. La comparación se realizó mediante test ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples obtenidas a por separado con la prueba LSD (*Least significant difference*) de Fisher. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$).

En la Figura 22 se muestran las concentraciones de IL-2. Es posible apreciar que en glucosa 25mM, la concentración de metformina 5mM induce una disminución significativa ($p < 0,05$) respecto a metformina 1mM (Figura 22). En glucosa 5,5mM no hay diferencias significativas entre las concentraciones de metformina (Figura 22). Tampoco se observaron diferencias entre las condiciones de glucosa 5,5mM y 25mM para las distintas concentraciones de metformina (Figura 22).

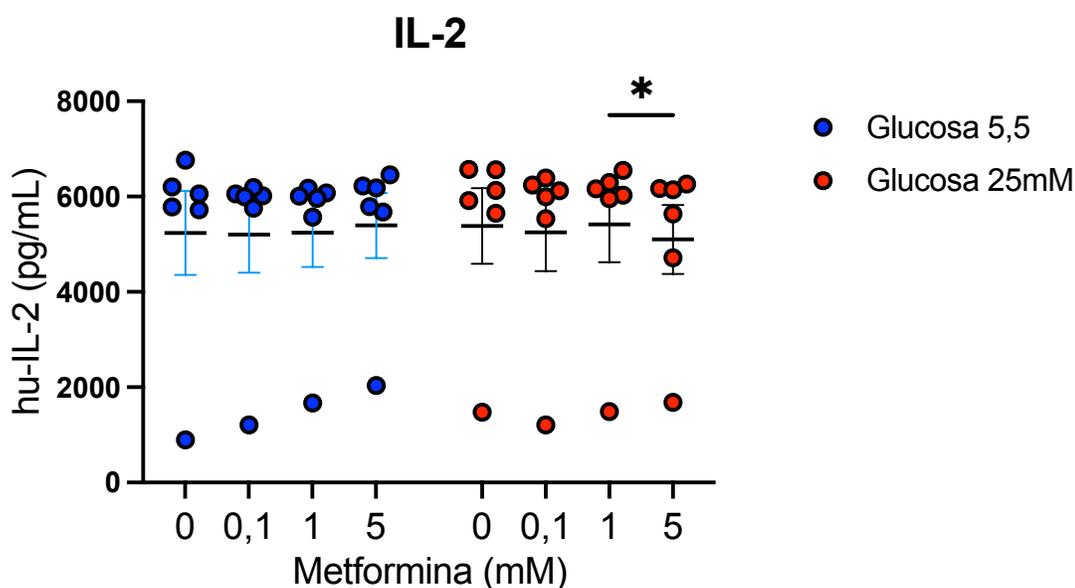


Figura 22: Concentración de IL-2 producida por linfocitos T CD4+ según concentraciones de glucosa y metformina.

Comparación estadística de la concentración de IL-2 producida por linfocitos T CD4+ entre los grupos de glucosa (5,5mM y 25mM) y metformina (0mM, 0,1mM, 1mM y 5mM) luego de 4 días de cultivo posterior a la activación. La comparación se realizó mediante test ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples obtenidas a por separado con la prueba LSD (*Least significant difference*) de Fisher. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$).

DISCUSIÓN

Los resultados de la presente tesis aportan evidencia de que la metformina ejerce efectos moduladores en la vía glicolítica y la activación de linfocitos T CD4+ humanos. Estos efectos son particularmente notables al comparar las condiciones de alta glucosa (25 mM o 450 mg/dL) con concentraciones de glucosa que se consideran fisiológicas o normoglucosa (5,5 mM o 100 mg/dL). Es relevante destacar que los efectos de la metformina no son uniformes y muestran variaciones significativas en cada donante, especialmente bajo diferentes concentraciones de glucosa y metformina. Este hallazgo subraya la complejidad de la respuesta inmunometabólica de los linfocitos T CD4+ humanos y resalta la importancia de considerar la variabilidad interindividual al evaluar el impacto de la metformina en la respuesta inmunológica.

Respecto al primer objetivo de esta tesis, los resultados difieren de lo informado por Zhao et al., (2021), ya que sugieren que la metformina tiene un efecto estimulador en la actividad glicolítica de los linfocitos T CD4+ humanos. Estos hallazgos son más consistentes con los resultados previamente reportados por Yin et al., (2015), que al igual que Zhao et al., (2021) trabajaron con un modelo ratón. En tanto que nuestros resultados son también consistentes con Tan et al., (2020), lo que resulta de mayor relevancia, dado que ellos también investigaron los efectos de la metformina en linfocitos humanos. Es importante destacar que la discrepancia entre estos hallazgos y los de Zhao et al., (2021) podría deberse a que ellos no solo trabajaron con un modelo ratón, sino que además consideraba patología tiroidea

(tiroiditis subaguda), mientras que en esta tesis se trabajó con población humana sin patologías endocrinas.

En particular, es relevante señalar que la evaluación de la actividad glicolítica en esta tesis se realizó de manera más detallada que en la mayoría de la literatura. Mientras que muchos estudios previos utilizan ensayos *Seahorse* para evaluar la actividad glicolítica, enfocándose en parámetros como la capacidad de acidificación del medio y el consumo de oxígeno, esta tesis adoptó un enfoque más completo. Se examinaron tres puntos clave en la vía glicolítica: la entrada (captación y consumo de glucosa), el proceso (actividad de la fosfofructoquinasa), y la salida (producción de lactato). Esta estrategia proporciona una visión más completa de cómo la metformina puede influir en diferentes etapas de la vía glicolítica y, por lo tanto, en la actividad metabólica de los linfocitos T CD4+ humanos. Estos resultados ponen de relieve la importancia de considerar las metodologías utilizadas en los estudios y cómo estas pueden influir en las conclusiones alcanzadas. Además, subrayan la necesidad de investigaciones adicionales para comprender completamente los efectos de la metformina en la actividad glicolítica de las células inmunológicas, especialmente en el contexto de diferentes condiciones de glucosa y de la variabilidad interindividual.

En el caso de la entrada de glucosa durante la activación del linfocito T, el aumento de este proceso se debe a una mayor translocación del transportador GLUT1 (Almeida et al., 2021; Dumitru et al., 2018). Sin embargo, se ha descrito que la metformina estimula la translocación del transportador GLUT4 (Lee et al., 2012),

lo que podría estar explicando el aumento en la captación y consumo de glucosa evidenciado en esta tesis, a diferencia de lo que ocurre durante la activación canónica del linfocito T. En relación al efecto de la concentración de glucosa, es importante señalar que aunque se encontró una diferencia significativa en el consumo de glucosa entre el grupo de alta concentración versus normoglucosa con el uso de metformina a 5 mM, este resultado puede deberse a la alta sensibilidad que presentó uno de los donantes y no necesariamente reflejar una situación representativa de toda la muestra. Esta variabilidad interindividual es común en estudios biomédicos y enfatiza la importancia de considerar la heterogeneidad en las respuestas a los tratamientos. En resumen, los hallazgos de esta tesis sugieren que la metformina podría influir en la translocación de transportadores de glucosa, como GLUT4, durante la activación de los linfocitos T, lo que podría explicar los cambios en la captación y consumo de glucosa observados. Además, se destaca nuevamente la importancia de reconocer la variabilidad interindividual en las respuestas a la metformina y cómo esto puede afectar las conclusiones de los estudios.

En segundo término, en esta tesis evaluamos la actividad de la fosfofructoquinasa porque una enzima determinante de la tasa de actividad glicolítica (Mor et al., 2011) y por lo tanto nos puede dar una buena aproximación a la actividad de la vía glicolítica en su totalidad. Los resultados obtenidos revelan diferencias notables en la actividad de la fosfofructoquinasa con el uso de metformina a 5 mM, específicamente en el grupo de alta concentración de glucosa. Sin embargo, es importante destacar que estas diferencias parecen estar asociadas

con una mayor sensibilidad de dos de los donantes. Esto enfatiza aún más que el efecto de la metformina es altamente dependiente tanto de la concentración de glucosa como de las características individuales de cada persona. Un aspecto crítico a considerar es que, aunque la metformina parece estimular la tasa glicolítica en condiciones de alta glucosa, es un fármaco hipoglicemiante que se utiliza precisamente para reducir los niveles elevados de glucosa en sangre en pacientes con diabetes tipo 2. Por lo tanto, en condiciones *in vivo*, en un paciente con hiperglicemia, los efectos de la metformina sobre la tasa glicolítica pueden ser mixtos. Esto sugiere que los efectos de la metformina pueden depender en gran medida del contexto metabólico del paciente y subraya la necesidad de un abordaje individualizado en la terapia con este medicamento.

En relación a la secreción de productos derivado de la glicólisis, nuevamente vemos que metformina 5mM es la que produce un mayor aumento de los niveles de lactato y que estos niveles son mayores en alta glucosa. Esto resulta esperable si consideramos lo descrito previamente: un mayor consumo de glucosa y una mayor actividad de la fosfofructoquinasa. Además, este resultado es consistente con la tasa de acidificación descrita en la literatura (Tan et al., 2020; Yin et al., 2015). La producción de lactato es una consecuencia directa de la glicólisis, y un aumento en la producción de lactato se considera una indicación de una mayor actividad glicolítica. Por lo tanto, estos hallazgos respaldan la idea de que la metformina estimula la vía glicolítica en linfocitos T CD4+ humanos, especialmente bajo condiciones de alta glucosa. Sin embargo, es relevante señalar que estos resultados también plantean la posibilidad de que la metformina tenga la capacidad de

estimular la actividad de la lactato deshidrogenasa en detrimento de la piruvato quinasa, lo que podría influir en la producción de lactato (Qi et al., 2018). Este aspecto específico podría requerir una mayor investigación para comprender completamente los mecanismos subyacentes a los efectos de la metformina en la producción de lactato en linfocitos T CD4+ humanos.

En su conjunto, la evaluación de entrada, proceso y salida de la vía glicolítica muestra resultados consistente en cuando al efecto estimulador de la metformina sobre la tasa glicolítica. Considerando que la actividad glicolítica es un indicador de la activación del linfocito (Almeida et al., 2021; Dumitru et al., 2018). Por lo tanto, estos hallazgos sugieren que, en un primer aspecto, la metformina tiene la capacidad de estimular la activación de los linfocitos T CD4+ y que este efecto es más evidente en condiciones de alta concentración de glucosa (25 mM). La activación de los linfocitos T es un proceso crucial en la respuesta inmunológica, ya que desencadena una serie de eventos que permiten a estas células responder eficazmente a estímulos como infecciones virales o bacterianas. La activación se caracteriza por un aumento en la demanda de energía y una mayor necesidad de biomoléculas, lo que a menudo se traduce en una mayor actividad glicolítica para satisfacer estas demandas metabólicas. Por lo tanto, el estímulo de la actividad glicolítica por parte de la metformina podría ser un mecanismo importante para mejorar la capacidad de los linfocitos T CD4+ para responder a desafíos inmunológicos. Además, la observación de que este efecto es más pronunciado en condiciones de alta glucosa es relevante, ya que la hiperglicemia es una característica común en pacientes con diabetes tipo 2, quienes a menudo reciben

tratamiento con metformina. Esto sugiere que la metformina podría tener un impacto particularmente beneficioso en la respuesta inmunológica de estos pacientes, al estimular la activación de los linfocitos T en condiciones de hiperglicemia.

Los resultados relacionados con la proliferación y los marcadores de activación en presencia de metformina plantean una perspectiva interesante y compleja. En cuanto a la actividad proliferativa de los linfocitos T CD4+, evaluada utilizando CellTrace® Violet y la plataforma de proliferación Flowjo, los hallazgos son consistentes en demostrar que la metformina inhibe esta proliferación. Este efecto también se ha observado previamente en un modelo de insulinitis en ratones (Duan et al., 2019), donde se encontró que la respuesta era dosis dependiente dentro del intervalo de 0-10 mM de metformina. Los resultados de esta tesis agregan evidencia al mostrar que este efecto inhibitorio de la proliferación también se produce en linfocitos T CD4+ humanos y, lo que es interesante, que es menos pronunciado en condiciones de alta glucosa (25mM) en comparación con normoglucosa (5,5 mM). Esto podría interpretarse como una reducción del efecto antiproliferativo de la metformina en linfocitos T CD4+ en condiciones de alta glucosa.

La relación entre la metformina y la proliferación de linfocitos T es un aspecto relevante a considerar. La inhibición de la proliferación de linfocitos T podría ser beneficiosa en ciertos contextos, como en el caso de enfermedades autoinmunitarias donde se busca suprimir la respuesta inmunológica excesiva. (Cornaby et al., 2020; Duan et al., 2019; Y. Guo et al., 2021; S. K. Lee et al., 2020;

Liu et al., 2021; Park et al., 2016; Planas et al., 2021a; Takahara et al., 2022; Wilson et al., 2021) Sin embargo, es importante señalar que la proliferación de linfocitos T es esencial para una respuesta inmunológica efectiva en otros contextos, como en la defensa contra infecciones, particularmente en condiciones de sepsis. (Cheng et al., 2016) Por lo tanto, los efectos de la metformina en la proliferación de linfocitos T deben sopesarse cuidadosamente en función del contexto clínico y las necesidades del paciente.

La observación de que la inhibición de la proliferación de linfocitos T por la metformina es menor en condiciones de alta glucosa agrega una capa adicional de complejidad a esta relación. Esto sugiere que la hiperglicemia podría modular los efectos de la metformina en la proliferación de linfocitos T, lo que podría ser relevante en pacientes con diabetes tipo 2 u otras condiciones de hiperglicemia. Este hallazgo plantea preguntas interesantes sobre cómo la concentración de glucosa en sangre podría influir en la respuesta inmunológica y en la eficacia de la metformina en diferentes contextos clínicos. En resumen, los resultados de esta investigación indican que la metformina inhibe la proliferación de linfocitos T CD4+ humanos, lo que es consistente con hallazgos previos en modelos de ratón. Sin embargo, es importante considerar la complejidad de esta relación y cómo la concentración de glucosa en sangre puede modular estos efectos, lo que puede tener implicaciones clínicas significativas en diferentes situaciones.

A partir de los resultados obtenidos hasta este punto, evaluamos si este efecto anti-proliferativo se debía a efectos sobre el ciclo celular. Para el caso del

linfocito T CD4+, no encontramos evidencia en literatura que reporte que la metformina arreste el ciclo celular. Sin embargo, en varias líneas celulares de cáncer se ha descrito que la metformina logra arrear el ciclo celular en distintos puntos (Li et al., 2020; Y. Wang et al., 2018; Zhou et al., 2019). En el caso de linfocitos T CD4+ humanos obtenido de nuestros resultados, encontramos que el arresto se produciría en las fases S/G2, no existiendo diferencias entre condiciones de alta y normo glucosa. Acá es relevante notar que el linfocito T CD4+ activado y las células cancerígenas comparten la cualidad de ser células altamente proliferativas, por lo que tal como ocurre con cáncer de mama (Zimmermann et al., 2016) o vejiga (Wu et al., 2019). Esta similitud podría sugerir que el efecto anti-proliferativo de la metformina podría estar relacionado con su capacidad para influir en la regulación de las ciclinas, que son proteínas clave encargadas de controlar la progresión o el arresto del ciclo celular en diversos puntos. La regulación del ciclo celular es un proceso altamente complejo y altamente regulado que implica una serie de proteínas, incluidas las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclina. Las ciclinas son proteínas que se acumulan en diferentes fases del ciclo celular y se asocian con cinasas dependientes de ciclina para controlar la progresión del ciclo. (Wang, 2022) Si la metformina afecta la expresión o la actividad de estas proteínas de manera selectiva, podría explicar el arresto del ciclo celular observado en linfocitos T CD4+ humanos.

Por otra parte, los dos marcadores de activación evaluados muestran resultados que a primera vista resultan contradictorios. La metformina aumenta notoriamente los niveles de CD69, pero reduce los de CD25. Sin embargo, estos

resultados ya han sido descritos previamente en la literatura para un modelo ratón de sobrepeso a influenza (Alwarawrah et al., 2020). En dicho estudio, este resultado se interpretó como que el descenso de CD25 es indicador de efectos anti-proliferativos, mientras que el efecto de CD69 se asoció a un aumento de linfocitos T de memoria residentes. Para el caso de nuestros resultados, los efectos sobre CD25 y CD69 son consistentes con los resultados previos. Coincidimos en que la reducción de CD25 es muestra del efecto anti-proliferativo de la metformina sobre el linfocito T CD4+. En tanto que, el aumento de CD69, al estar relacionado con linfocitos T de memoria residentes, indicaría que la metformina produce una modificación del perfil de linfocito. Si ese fuera el caso, resulta interesante evidencia reciente que muestra que los linfocitos T de memoria residentes presentarían un metabolismo más adaptativo a las condiciones de un medioambiente inflamatorio, lo que facilita que sean capaces de desarrollar una respuesta más rápida y eficaz una vez que son activados si se les compara con linfocitos T circulantes (Konjar et al., 2022). Es importante destacar que, si bien estos resultados son consistentes con hallazgos previos y sugieren una interpretación coherente de los efectos de la metformina en los linfocitos T CD4+, se requiere una mayor investigación para comprender completamente los mecanismos subyacentes y su relevancia clínica en diferentes contextos inmunológicos. Además, como se menciona, no se evaluó la actividad oxidativa mitocondrial en esta tesis, lo que podría proporcionar una visión más completa de los cambios metabólicos inducidos por la metformina en los linfocitos T CD4+. En resumen, los resultados sugieren que la metformina puede inducir una modificación en el perfil de los linfocitos T CD4+ hacia células de memoria residentes, lo que podría estar relacionado con su capacidad de mejorar

la respuesta inmunológica en condiciones inflamatorias. Sin embargo, se necesita más investigación para comprender completamente estos efectos y su relevancia clínica.

Los resultados previos indicarían que la metformina induce una respuesta inmunometabólica caracterizada por una menor cantidad de linfocitos, pero que estos podrían ser más adaptables al medio y eficientes en su respuesta. Para complementar este resultado evaluamos la producción de citoquinas, acá nuevamente encontramos resultados que son totalmente coincidentes con evidencia previa: la metformina estimula una respuesta T reguladora y Th2, e inhibe la respuesta Th17 y Th1 (Cheng et al., 2016; Duan et al., 2019; Park et al., 2016). Los efectos de la metformina en la producción de citoquinas, que incluyen una modulación hacia un perfil más antiinflamatorio y regulador, son consistentes con un posible beneficio en la respuesta inmunológica. Sin embargo, es relevante destacar la observación de que en condiciones de alta glucosa se observa una disminución en la producción de ciertas citoquinas, como IFN- γ e IL-4, en comparación con la normoglucosa. Esto sugiere que la hiperglicemia podría ejercer una influencia en la respuesta inmunomoduladora inducida por la metformina. Es importante recordar que la metformina es conocida principalmente por su capacidad para reducir los niveles de glucosa en sangre y mejorar la sensibilidad a la insulina en pacientes con diabetes tipo 2. Por lo tanto, sus efectos más preponderantes se esperan en condiciones de normoglucosa, donde se utiliza principalmente como un agente hipoglicemiante. Sin embargo, la observación de que la metformina aún puede ejercer efectos inmunomoduladores en condiciones de alta glucosa es

interesante y podría tener implicaciones en pacientes con diabetes tipo 2 que experimentan fluctuaciones en sus niveles de glucosa. Esto sugiere que, además de su efecto principal en la regulación del metabolismo de la glucosa, la metformina podría ofrecer beneficios adicionales en la modulación de la respuesta inmunológica en pacientes con diabetes tipo 2, particularmente en momentos en que los niveles de glucosa sean más elevados.

Algunas limitaciones de esta tesis deben ser mencionadas. En primero lugar, en concordancia con la mayoría de la literatura (Duan et al., 2019a; Park et al., 2016; Tan et al., 2020b; Zhao et al., 2021b), es relevante notar que los efectos significativos se produjeron con metformina a concentraciones de 5mM, las que superan largamente las concentraciones séricas en personas en tratamiento con este fármaco, que se mueven en torno a 5uM (Sutkowska et al., 2021). Sin embargo, al ser las condiciones de cultivo distintas al *in vivo*, resulta difícil descartar o confirmar que los efectos de estas concentraciones de 5mM en el cultivo se correspondan con las que tienen *in vivo* a 5uM. En segundo lugar, el linfocito T CD4+ en sus distintas subpoblaciones tiene diversos roles e interacciones con otras células inmunes, por lo que esta tesis solo muestra efectos directos de la metformina sobre el linfocito T CD4+, pero no cubre efectos que pudiesen estar mediados por otras células. En tercer lugar, solo trabajamos con 2 concentraciones de glucosa que representan una condición de tendencia fisiológica (5,5mM o 100mg/dL) versus una condición patológica (25mM o 450mg/dL) que es la esperable encontrar en un paciente diabético con mal control glicémico. Sin embargo, al no evaluar concentraciones intermedias, no podemos señalar que haya linealidad o dosis-

respuesta en las diferencias encontradas entre ambas concentraciones. Por último, la muestra evaluada es relativamente pequeña, aunque la mayoría de las pruebas muestran resultados con escasa dispersión, algunas pruebas mostraron 1 o 2 donantes con una sensibilidad muy aumentada para los efectos de la metformina.

A pesar de lo anterior, los resultados de esta tesis aportan evidencia en el campo del inmunometabolismo usando linfocitos T CD4+ humanos evaluados en condiciones de alta glucosa, lo que no había sido evaluada directamente en estudio previos. Las variaciones observadas en la respuesta a la metformina en función de la concentración de glucosa pueden tener importantes implicancias clínicas. Por ejemplo, en pacientes con diabetes tipo 2, los niveles de glucosa pueden variar ampliamente y, por lo tanto, los efectos de la metformina podrían ser diferentes de un individuo a otro. Esto subraya la necesidad de una atención médica personalizada y la importancia de considerar los niveles de glucosa del paciente al tomar decisiones terapéuticas relacionadas con la metformina.

En resumen, los resultados de esta tesis contribuyen al entendimiento de cómo la metformina afecta la vía glicolítica y la activación de linfocitos T CD4+ humanos, pero también destacan la complejidad de esta relación, que está influenciada por la concentración de glucosa y la variabilidad interindividual. Estos hallazgos tienen implicancias tanto en la investigación básica de inmunología como en la práctica clínica, donde la metformina se utiliza ampliamente en el tratamiento de la diabetes tipo 2 y puede tener un impacto en la respuesta inmunológica de los pacientes.

A partir de estos resultados, surgen algunas proyecciones para futuras líneas de investigación:

1. Mecanismos de control del ciclo celular en linfocitos T CD4+: Dado que se observó un efecto de la metformina en el arresto del ciclo celular en las fases S/G2 de los linfocitos T CD4+, una línea de investigación prometedora sería profundizar en los mecanismos subyacentes a este efecto. Esto podría implicar la identificación de las proteínas y las vías de señalización específicas que regulan el ciclo celular en respuesta a la metformina. Investigar si la metformina actúa sobre las ciclinas, las cinasas dependientes de ciclina u otros reguladores del ciclo celular proporcionaría información valiosa sobre cómo se modula el ciclo celular en células inmunológicas.

2. Regulación de transportadores GLUT y enzimas glicolíticas: Otra línea de investigación importante sería explorar en detalle cómo la metformina influye en los transportadores de glucosa tipo GLUT y en las enzimas clave de la vía glicolítica, como la hexoquinasa (HK), la piruvato quinasa (PK) y la lactato deshidrogenasa (LDH). Esto podría incluir estudios sobre la expresión génica, la actividad enzimática y la localización subcelular de estos componentes en respuesta a la metformina. Investigar si estos efectos son mediados por vías de señalización específicas sería fundamental para comprender cómo la metformina regula estos aspectos metabólicos y su influencia en la respuesta inmunológica.

3. Cinética de la expresión de marcadores de activación: La cinética temporal de la expresión de los marcadores de activación en respuesta a la metformina es un área de interés. Realizar experimentos a lo largo del tiempo permitiría determinar cuándo y cómo se expresan estos marcadores durante la activación de los linfocitos T CD4+ en presencia de metformina. Esto podría ayudar a elucidar los momentos críticos en los que la metformina ejerce su influencia sobre la activación de estos linfocitos y proporcionar una visión más completa de los mecanismos involucrados.

4. Actividad funcional en contextos clínicos relevantes: Explorar cómo el pretratamiento con metformina o la exposición sincrónica a la metformina afectan la respuesta de los linfocitos T CD4+ en situaciones clínicas relevantes es crucial. Esto podría implicar la evaluación de la respuesta inmunológica de los linfocitos T CD4+ pretratados con metformina frente a infecciones específicas, células cancerígenas o modelos de autoinmunidad. Determinar si la metformina modula de manera significativa la función inmunológica en estos contextos clínicos podría tener implicaciones importantes para el desarrollo de terapias inmunomoduladoras basadas en la metformina.

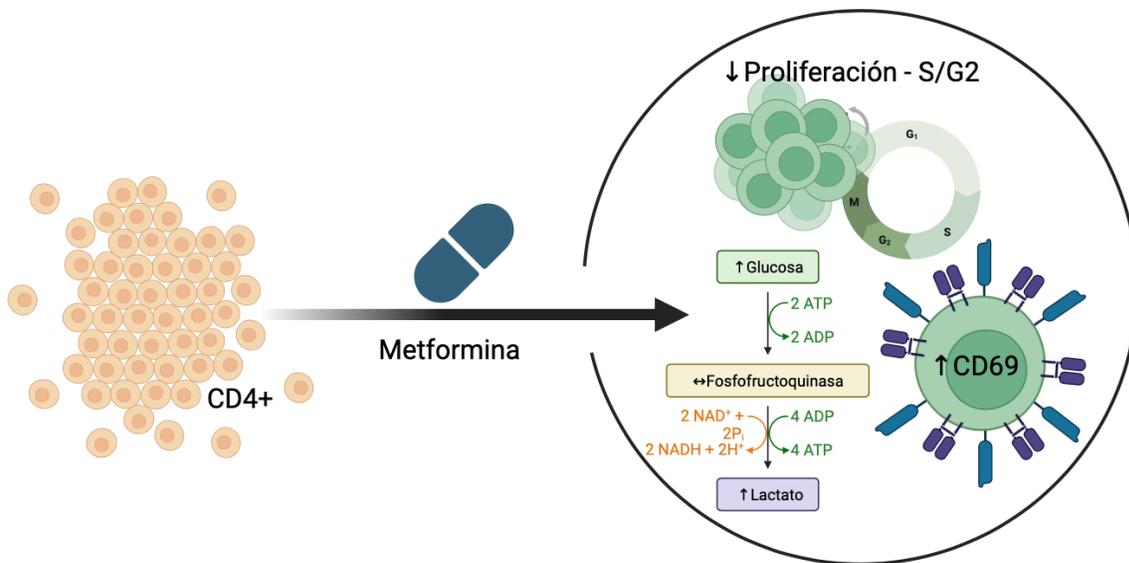
En resumen, estas líneas de investigación futuras ofrecen oportunidades para profundizar en los mecanismos subyacentes a los efectos de la metformina en los linfocitos T CD4+ y para comprender mejor su relevancia clínica en diferentes contextos inmunológicos y metabólicos. Estos estudios podrían arrojar luz sobre cómo la metformina puede ser utilizada de manera efectiva como un agente inmunomodulador y proporcionar información valiosa para la mejora de la práctica

clínica y el desarrollo de terapias basadas en esta molécula en el futuro, especialmente considerando la creciente prevalencia de diabetes mellitus (hiperglicemia) a nivel nacional y mundial.

CONCLUSIÓN

La metformina inhibe la proliferación mediante mecanismos asociados a un arresto del ciclo celular con un aumento de las fases S/G2 a expensas de G1 en linfocitos T CD4+ activados.

Pese al arresto, los linfocitos T CD4+ activados se mantienen en un estado metabólica, funcional y fenotípicamente activado. Lo que se manifiesta en un aumento de la captación de glucosa, producción de lactato, actividad de PFK y el marcador CD69.



BIBLIOGRAFÍA

Almeida, L., Dhillon-LaBrooy, A., Carriche, G., Berod, L., & Sparwasser, T. (2021). CD4⁺ T-cell differentiation and function: Unifying glycolysis, fatty acid oxidation, polyamines NAD mitochondria. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *148*(1), 16–32. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.03.033>

Alwarawrah, Y., Nichols, A. G., Green, W. D., Eisner, W., Kiernan, K., Warren, J., Hale, L. P., Beck, M. A., & MacIver, N. J. (2020a). Targeting T-cell oxidative metabolism to improve influenza survival in a mouse model of obesity. *International Journal of Obesity (2005)*, *44*(12), 2419–2429. <https://doi.org/10.1038/s41366-020-00692-3>

Alwarawrah, Y., Nichols, A. G., Green, W. D., Eisner, W., Kiernan, K., Warren, J., Hale, L. P., Beck, M. A., & MacIver, N. J. (2020b). Targeting T-cell oxidative metabolism to improve influenza survival in a mouse model of obesity. *International Journal of Obesity (2005)*, *44*(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/s41366-020-00692-3>

An, J. H., Cho, D. H., Lee, G. Y., Kang, M. S., Kim, S. J., & Han, S. N. (2021). Effects of Vitamin D Supplementation on CD4⁺ T Cell Subsets and mTOR Signaling Pathway in High-Fat-Diet-Induced Obese Mice. *Nutrients*, *13*(3), 796. <https://doi.org/10.3390/nu13030796>

Auger, C., Sivayoganathan, T., Abdullahi, A., Parousis, A., Pang, B. W., & Jeschke, M. G. (2018). Metformin adapts its cellular effects to bioenergetic status in a model of metabolic dysfunction. *Scientific Reports*, *8*(1), 5646. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24017-7>

Balyan, R., Gautam, N., & Gascoigne, N. R. J. (2020). The Ups and Downs of Metabolism during the Lifespan of a T Cell. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(21), 7972. <https://doi.org/10.3390/ijms21217972>

Biondo, L. A., Teixeira, A. A. S., de O S Ferreira, K. C., & Neto, J. C. R. (2020). Pharmacological Strategies for Insulin Sensitivity in Obesity and Cancer: Thiazolidinediones and Metformin. *Current Pharmaceutical Design*, *26*(9), 932–945. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200122124116>

Böhme, J., Martinez, N., Li, S., Lee, A., Marzuki, M., Tizazu, A. M., Ackart, D., Frenkel, J. H., Todd, A., Lachmandas, E., Lum, J., Shihui, F., Ng, T. P., Lee, B., Larbi, A., Netea, M. G., Basaraba, R., van Crevel, R., Newell, E., ... Singhal, A. (2020). Metformin enhances anti-mycobacterial responses by educating CD8⁺ T-cell immunometabolic circuits. *Nature Communications*, *11*(1), 5225. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19095-z>

Bulygin, A. S., Khantakova, J. N., Shkaruba, N. S., Shiku, H., & Sennikov, S. S. (2022). The role of metabolism on regulatory T cell development and its impact in tumor and transplantation immunity. *Frontiers in Immunology*, *13*, 1016670. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1016670>

Cai, F., Jin, S., & Chen, G. (2021). The Effect of Lipid Metabolism on CD4⁺ T Cells. *Mediators of Inflammation*, *2021*, 6634532. <https://doi.org/10.1155/2021/6634532>

Chatzileontiadou, D. S. M., Sloane, H., Nguyen, A. T., Gras, S., & Grant, E. J. (2020). The Many Faces of CD4⁺ T Cells: Immunological and Structural Characteristics. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(1), 73. <https://doi.org/10.3390/ijms22010073>

Chen, X., Chen, H., Zhang, Z., Fu, Y., Han, X., Zhang, Y., Xu, J., Ding, H., Cui, H., Dong, T., Shang, H., & Jiang, Y. (2019). Elevated CD54 Expression Renders CD4⁺ T Cells Susceptible to Natural

Killer Cell-Mediated Killing. *The Journal of Infectious Diseases*, 220(12), Article 12. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz413>

Cheng, S.-C., Scicluna, B. P., Arts, R. J. W., Gresnigt, M. S., Lachmandas, E., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Kox, M., Manjeri, G. R., Wagenaars, J. A. L., Cremer, O. L., Leentjens, J., van der Meer, A. J., van de Veerdonk, F. L., Bonten, M. J., Schultz, M. J., Willems, P. H. G. M., Pickkers, P., Joosten, L. A. B., van der Poll, T., & Netea, M. G. (2016a). Broad defects in the energy metabolism of leukocytes underlie immunoparalysis in sepsis. *Nature Immunology*, 17(4), 406–413. <https://doi.org/10.1038/ni.3398>

Cheng, S.-C., Scicluna, B. P., Arts, R. J. W., Gresnigt, M. S., Lachmandas, E., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Kox, M., Manjeri, G. R., Wagenaars, J. A. L., Cremer, O. L., Leentjens, J., van der Meer, A. J., van de Veerdonk, F. L., Bonten, M. J., Schultz, M. J., Willems, P. H. G. M., Pickkers, P., Joosten, L. A. B., van der Poll, T., & Netea, M. G. (2016b). Broad defects in the energy metabolism of leukocytes underlie immunoparalysis in sepsis. *Nature Immunology*, 17(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/ni.3398>

Copsel, S. N., Malek, T. R., & Levy, R. B. (2020). Medical Treatment Can Unintentionally Alter the Regulatory T-Cell Compartment in Patients with Widespread Pathophysiologic Conditions. *The American Journal of Pathology*, 190(10), 2000–2012. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.07.012>

Cornaby, C., Elshikha, A. S., Teng, X., Choi, S.-C., Scindia, Y., Davidson, A., & Morel, L. (2020). Efficacy of the Combination of Metformin and CTLA4Ig in the (NZB × NZW)F1 Mouse Model of Lupus Nephritis. *ImmunoHorizons*, 4(6), 319–331. <https://doi.org/10.4049/immunohorizons.2000033>

Cory, T. J., Emmons, R. S., Yarbrow, J. R., Davis, K. L., & Pence, B. D. (2021). Metformin Suppresses Monocyte Immunometabolic Activation by SARS-CoV-2 Spike Protein Subunit 1. *Frontiers in Immunology*, 12, 733921. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.733921>

Dahmani, Z., Addou-Klouche, L., Gizard, F., Dahou, S., Messaoud, A., Chahinez Djebri, N., Benaissti, M. I., Mostefaoui, M., Terbeche, H., Nouari, W., Miliani, M., Lefranc, G., Fernandez, A., Lamb, N. J., & Aribi, M. (2020). Metformin partially reverses the inhibitory effect of co-culture with ER-/PR-/HER2+ breast cancer cells on biomarkers of monocyte antitumor activity. *PloS One*, 15(10), e0240982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240982>

Duan, W., Ding, Y., Yu, X., Ma, D., Yang, B., Li, Y., Huang, L., Chen, Z., Zheng, J., & Yang, C. (2019a). Metformin mitigates autoimmune insulinitis by inhibiting Th1 and Th17 responses while promoting Treg production. *American Journal of Translational Research*, 11(4), 2393–2402.

Duan, W., Ding, Y., Yu, X., Ma, D., Yang, B., Li, Y., Huang, L., Chen, Z., Zheng, J., & Yang, C. (2019b). Metformin mitigates autoimmune insulinitis by inhibiting Th1 and Th17 responses while promoting Treg production. *American Journal of Translational Research*, 11(4), Article 4.

Dumitru, C., Kabat, A. M., & Maloy, K. J. (2018). Metabolic Adaptations of CD4+ T Cells in Inflammatory Disease. *Frontiers in Immunology*, 9, 540. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00540>

Farias-Jofré, M. (2021). Suplementación prenatal con vitamina D, un asunto aún no resuelto. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, 86(2), 134–136. <https://doi.org/10.4067/S0717-75262021000200134>

General Assembly of the World Medical Association. (2014). World Medical Association

Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. *The Journal of the American College of Dentists*, 81(3), 14–18.

Gong, C., Yu, X., Zhang, W., Han, L., Wang, R., Wang, Y., Gao, S., & Yuan, Y. (2021). Regulating the immunosuppressive tumor microenvironment to enhance breast cancer immunotherapy using pH-responsive hybrid membrane-coated nanoparticles. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00805-8>

Gualdoni, G. A., Mayer, K. A., Göschl, L., Boucheron, N., Ellmeier, W., & Zlabinger, G. J. (2016). The AMP analog AICAR modulates the Treg/Th17 axis through enhancement of fatty acid oxidation. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 30(11), 3800–3809. <https://doi.org/10.1096/fj.201600522R>

Guo, H., Wang, Q., Ghneim, K., Wang, L., Rampanelli, E., Holley-Guthrie, E., Cheng, L., Garrido, C., Margolis, D. M., Eller, L. A., Robb, M. L., Sekaly, R.-P., Chen, X., Su, L., & Ting, J. P.-Y. (2021). Multi-omics analyses reveal that HIV-1 alters CD4+ T cell immunometabolism to fuel virus replication. *Nature Immunology*, 22(4), 423–433. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00898-1>

Guo, Y., Shi, J., Wang, Q., Hong, L., Chen, M., Liu, S., Yuan, X., & Jiang, S. (2021). Metformin alleviates allergic airway inflammation and increases Treg cells in obese asthma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25(4), 2279–2284. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16269>

Hashemi, P., & Pezeshki, S. (2021). Repurposing metformin for covid-19 complications in patients with type 2 diabetes and insulin resistance. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 43(3), 265–270. <https://doi.org/10.1080/08923973.2021.1925294>

Iwata, S., & Tanaka, Y. (2021). Therapeutic perspectives on the metabolism of lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Expert Review of Clinical Immunology*, 17(10), 1121–1130. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2021.1964957>

Kamyshnyi, O., Matskevych, V., Lenchuk, T., Strilbytska, O., Storey, K., & Lushchak, O. (2021). Metformin to decrease COVID-19 severity and mortality: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 144, 112230. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112230>

Konjar, Š., Ferreira, C., Carvalho, F. S., Figueiredo-Campos, P., Fanczal, J., Ribeiro, S., Morais, V. A., & Veldhoen, M. (2022). Intestinal tissue-resident T cell activation depends on metabolite availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(34), e2202144119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2202144119>

Lai, X., Liu, X., Cai, X., & Zou, F. (2022). Vitamin D supplementation induces CatG-mediated CD4+ T cell inactivation and restores pancreatic β -cell function in mice with type 1 diabetes. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 322(1), E74–E84. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00066.2021>

Lee, J. O., Lee, S. K., Kim, J. H., Kim, N., You, G. Y., Moon, J. W., Kim, S. J., Park, S. H., & Kim, H. S. (2012). Metformin Regulates Glucose Transporter 4 (GLUT4) Translocation through AMP-activated Protein Kinase (AMPK)-mediated Cbl/CAP Signaling in 3T3-L1 Preadipocyte Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(53), 44121–44129. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.361386>

Lee, S. K., Park, M.-J., Jhun, J. Y., Beak, J.-A., Choi, J. W., Rye, J.-Y., Jang, J. W., Bae, S. H., Yoon, S. K., Choi, H. J., You, Y. K., Cho, M.-L., & Choi, J. Y. (2020). Combination Treatment With

Metformin and Tacrolimus Improves Systemic Immune Cellular Homeostasis by Modulating Treg and Th17 Imbalance. *Frontiers in Immunology*, *11*, 581728. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.581728>

Leiva, A.-M., Martínez, M.-A., Petermann, F., Garrido-Méndez, A., Poblete-Valderrama, F., Díaz-Martínez, X., Celis-Morales, C., Leiva, A.-M., Martínez, M.-A., Petermann, F., Garrido-Méndez, A., Poblete-Valderrama, F., Díaz-Martínez, X., & Celis-Morales, C. (2018). Factores asociados al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 en Chile. *Nutrición Hospitalaria*, *35*(2), 400–407. <https://doi.org/10.20960/nh.1434>

Li, B., Zhou, P., Xu, K., Chen, T., Jiao, J., Wei, H., Yang, X., Xu, W., Wan, W., & Xiao, J. (2020). Metformin induces cell cycle arrest, apoptosis and autophagy through ROS/JNK signaling pathway in human osteosarcoma. *International Journal of Biological Sciences*, *16*(1), 74–84. <https://doi.org/10.7150/ijbs.33787>

Liu, X., Sun, Z., & Wang, H. (2021). Metformin alleviates experimental colitis in mice by up-regulating TGF- β signaling. *Biotechnic & Histochemistry: Official Publication of the Biological Stain Commission*, *96*(2), 146–152. <https://doi.org/10.1080/10520295.2020.1776896>

Miskolci, V., Tweed, K. E., Lasarev, M. R., Britt, E. C., Walsh, A. J., Zimmerman, L. J., McDougal, C. E., Cronan, M. R., Fan, J., Sauer, J.-D., Skala, M. C., & Huttenlocher, A. (2022). In vivo fluorescence lifetime imaging of macrophage intracellular metabolism during wound responses in zebrafish. *ELife*, *11*, e66080. <https://doi.org/10.7554/eLife.66080>

Mor, I., Cheung, E. C., & Vousden, K. H. (2011). Control of Glycolysis through Regulation of PFK1: Old Friends and Recent Additions. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *76*, 211–216. <https://doi.org/10.1101/sqb.2011.76.010868>

Nacional, B. del C. (2012, April 24). *Biblioteca del Congreso Nacional | Ley Chile*. www.bcn.cl/leychile. <https://www.bcn.cl/leychile>

Norata, G. D., Caligiuri, G., Chavakis, T., Matarese, G., Netea, M. G., Nicoletti, A., O'Neill, L. A. J., & Marelli-Berg, F. M. (2015). The Cellular and Molecular Basis of Translational Immunometabolism. *Immunity*, *43*(3), 421–434. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.08.023>

Omarjee, L., Perrot, F., Meilhac, O., Mahe, G., Bousquet, G., & Janin, A. (2020). Immunometabolism at the cornerstone of inflammaging, immunosenescence, and autoimmunity in COVID-19. *Aging*, *12*(24), 26263–26278. <https://doi.org/10.18632/aging.202422>

O'Neill, L. A. J., Kishton, R. J., & Rathmell, J. (2016). A guide to immunometabolism for immunologists. *Nature Reviews. Immunology*, *16*(9), 553–565. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.70>

Palmer, C. S., Cherry, C. L., Sada-Ovalle, I., Singh, A., & Crowe, S. M. (2016). Glucose Metabolism in T Cells and Monocytes: New Perspectives in HIV Pathogenesis. *EBioMedicine*, *6*, 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.02.012>

Pålsson-McDermott, E. M., & O'Neill, L. A. J. (2020). Targeting immunometabolism as an anti-inflammatory strategy. *Cell Research*, *30*(4), 300–314. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0291-z>

Park, M.-J., Lee, S.-Y., Moon, S.-J., Son, H.-J., Lee, S.-H., Kim, E.-K., Byun, J.-K., Shin, D. Y., Park, S.-H., Yang, C.-W., & Cho, M.-L. (2016). Metformin attenuates graft-versus-host disease via restricting mammalian target of rapamycin/signal transducer and activator of transcription 3 and

promoting adenosine monophosphate-activated protein kinase-autophagy for the balance between T helper 17 and Tregs. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 173, 115–130. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.03.006>

Pearce, E. L., & Pearce, E. J. (2013). Metabolic Pathways in Immune Cell Activation and Quiescence. *Immunity*, 38(4), 633–643. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.005>

Planas, D., Pagliuzza, A., Ponte, R., Fert, A., Marchand, L. R., Massanella, M., Gosselin, A., Mehraj, V., Dupuy, F. P., Isnard, S., Goulet, J.-P., Lesage, S., Cohen, E. A., Ghali, M. P., Angel, J. B., Chomont, N., Routy, J.-P., & Ancuta, P. (2021a). LILAC pilot study: Effects of metformin on mTOR activation and HIV reservoir persistence during antiretroviral therapy. *EBioMedicine*, 65, 103270. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103270>

Putilin, D. A., Evchenko, S. Y., Fedoniuk, L. Y., Tokarskyy, O. S., Kamyshny, O. M., Migenko, L. M., Andreychyn, S. M., Hanberher, I. I., & Bezruk, T. O. (2020). The Influence of Metformin to the Transcriptional Activity of the mTOR and FOX3 Genes in Parapancreatic Adipose Tissue of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Journal of Medicine and Life*, 13(1), 50–55. <https://doi.org/10.25122/jml-2020-0029>

Qi, H., Nielsen, P. M., Schroeder, M., Bertelsen, L. B., Palm, F., & Laustsen, C. (2018). Acute renal metabolic effect of metformin assessed with hyperpolarised MRI in rats. *Diabetologia*, 61(2), 445–454. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4445-6>

Restrepo, B. I. (2016). Metformin: Candidate host-directed therapy for tuberculosis in diabetes and non-diabetes patients. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 101S, S69–S72. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.09.008>

Russell, S. L., Lamprecht, D. A., Mandizvo, T., Jones, T. T., Naidoo, V., Addicott, K. W., Moodley, C., Ngcobo, B., Crossman, D. K., Wells, G., & Steyn, A. J. C. (2019). Compromised Metabolic Reprogramming Is an Early Indicator of CD8⁺ T Cell Dysfunction during Chronic Mycobacterium tuberculosis Infection. *Cell Reports*, 29(11), 3564–3579.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.034>

Shikuma, C. M., Chew, G. M., Kohorn, L., Souza, S. A., Chow, D., SahBandar, I. N., Park, E.-Y., Hanks, N., Gangcuangco, L. M. A., Gerschenson, M., & Ndhlovu, L. C. (2020a). Short Communication: Metformin Reduces CD4 T Cell Exhaustion in HIV-Infected Adults on Suppressive Antiretroviral Therapy. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 36(4), 303–305. <https://doi.org/10.1089/AID.2019.0078>

Stathopoulou, C., Nikoleri, D., & Bertsias, G. (2019). Immunometabolism: An overview and therapeutic prospects in autoimmune diseases. *Immunotherapy*, 11(9), 813–829. <https://doi.org/10.2217/imt-2019-0002>

Sumikawa, M. H., Iwata, S., Zhang, M., Miyata, H., Ueno, M., Todoroki, Y., Nagayasu, A., Kanda, R., Sonomoto, K., Torimoto, K., Lee, S., Nakayamada, S., Yamamoto, K., Okada, Y., & Tanaka, Y. (2021). An enhanced mitochondrial function through glutamine metabolism in plasmablast differentiation in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford, England)*, keab824. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keab824>

Sutkowska, E., Fortuna, P., Wisniewski, J., Sutkowska, K., Hodurek, P., Gamian, A., & Kaluza, B. (2021). Low metformin dose and its therapeutic serum concentration in prediabetes. *Scientific*

Reports, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91174-7>

Takahara, M., Takaki, A., Hiraoka, S., Takei, K., Yasutomi, E., Igawa, S., Yamamoto, S., Oka, S., Ohmori, M., Yamasaki, Y., Inokuchi, T., Kinugasa, H., Harada, K., Uono, H., & Okada, H. (2022). Metformin ameliorates chronic colitis in a mouse model by regulating interferon- γ -producing lamina propria CD4⁺ T cells through AMPK activation. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 36(2), e22139. <https://doi.org/10.1096/fj.202100831RR>

Tan, S. Y., Kelkar, Y., Hadjipanayis, A., Shipstone, A., Wynn, T. A., & Hall, J. P. (2020a). Metformin and 2-Deoxyglucose Collaboratively Suppress Human CD4⁺ T Cell Effector Functions and Activation-Induced Metabolic Reprogramming. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 205(4), 957–967. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000137>

Titov, A. A., Baker, H. V., Brusko, T. M., Sobel, E. S., & Morel, L. (2019). Metformin Inhibits the Type 1 IFN Response in Human CD4⁺ T Cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 203(2), 338–348. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801651>

Uehara, T., Eikawa, S., Nishida, M., Kunisada, Y., Yoshida, A., Fujiwara, T., Kunisada, T., Ozaki, T., & Uono, H. (2019). Metformin induces CD11b⁺-cell-mediated growth inhibition of an osteosarcoma: Implications for metabolic reprogramming of myeloid cells and anti-tumor effects. *International Immunology*, 31(4), 187–198. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxy079>

Verdura, S., Cuyàs, E., Martin-Castillo, B., & Menendez, J. A. (2019). Metformin as an archetype immuno-metabolic adjuvant for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*, 8(10), e1633235. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1633235>

Wang, Y., Xu, W., Yan, Z., Zhao, W., Mi, J., Li, J., & Yan, H. (2018). Metformin induces autophagy and G0/G1 phase cell cycle arrest in myeloma by targeting the AMPK/mTORC1 and mTORC2 pathways. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 37, 63. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0731-5>

Wang, Y.-W., He, S.-J., Feng, X., Cheng, J., Luo, Y.-T., Tian, L., & Huang, Q. (2017). Metformin: A review of its potential indications. *Drug Design, Development and Therapy*, 11, 2421–2429. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S141675>

Wang, Z. (2022). Cell Cycle Progression and Synchronization: An Overview. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2579, 3–23. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2736-5_1

Wilson, C. S., Stocks, B. T., Hoopes, E. M., Rhoads, J. P., McNew, K. L., Major, A. S., & Moore, D. J. (2021). Metabolic preconditioning in CD4⁺ T cells restores inducible immune tolerance in lupus-prone mice. *JCI Insight*, 6(19), e143245. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.143245>

Wu, Y., Zheng, Q., Li, Y., Wang, G., Gao, S., Zhang, X., Yan, X., Zhang, X., Xie, J., Wang, Y., Sun, X., Meng, X., Yin, B., & Wang, B. (2019). Metformin targets a YAP1-TEAD4 complex via AMPK α to regulate CCNE1/2 in bladder cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 38(1), 376. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1346-1>

Xian, H., Liu, Y., Rundberg Nilsson, A., Gatchalian, R., Crother, T. R., Tourtellotte, W. G., Zhang, Y., Aleman-Muench, G. R., Lewis, G., Chen, W., Kang, S., Luevanos, M., Trudler, D., Lipton, S. A., Soroosh, P., Teijaro, J., de la Torre, J. C., Arditi, M., Karin, M., & Sanchez-Lopez, E. (2021). Metformin inhibition of mitochondrial ATP and DNA synthesis abrogates NLRP3 inflammasome

activation and pulmonary inflammation. *Immunity*, 54(7), 1463-1477.e11. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.05.004>

Xiong, W., Sun, K.-Y., Zhu, Y., Zhang, X., Zhou, Y.-H., & Zou, X. (2021). Metformin alleviates inflammation through suppressing FASN-dependent palmitoylation of Akt. *Cell Death & Disease*, 12(10), 934. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04235-0>

Yang, H.-Y., Wu, C.-Y., Powell, J. D., & Lu, K.-L. (2020). Manipulation of Metabolic Pathways and Its Consequences for Anti-Tumor Immunity: A Clinical Perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), E4030. <https://doi.org/10.3390/ijms21114030>

Yin, Y., Choi, S.-C., Xu, Z., Perry, D. J., Seay, H., Croker, B. P., Sobel, E. S., Brusko, T. M., & Morel, L. (2015). Normalization of CD4+ T Cell Metabolism Reverses Lupus. *Science Translational Medicine*, 7(274), 274ra18. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa0835>

Zhao, L., Wu, Q., Wang, X., Wang, S., Shi, X., Shan, Z., & Teng, W. (2021a). Reversal of Abnormal CD4+ T Cell Metabolism Alleviates Thyroiditis by Deactivating the mTOR/HIF1a/Glycolysis Pathway. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 659738. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.659738>

Zhou, X., Kuang, Y., Liang, S., & Wang, L. (2019). Metformin inhibits cell proliferation in SKM-1 cells via AMPK-mediated cell cycle arrest. *Journal of Pharmacological Sciences*, 141(4), 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2019.10.003>

Zhu, X., & Zhu, J. (2020). CD4 T Helper Cell Subsets and Related Human Immunological Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), Article 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21218011>

Zimmermann, M., Arachchige-Don, A. P. S., Donaldson, M. S., Patriarchi, T., & Horne, M. C. (2016). Cyclin G2 promotes cell cycle arrest in breast cancer cells responding to fulvestrant and metformin and correlates with patient survival. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 15(23), 3278–3295. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1243189>

ANEXOS

1-A Consentimiento Informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Proyecto: Evaluación del efecto de vitamina D y metformina sobre la vía glicolítica de linfocitos T CD4+ activados en condiciones de normo y alta glucosa.

Investigadores responsables:

Ricardo Cartes Velásquez, Médico del Hospital Regional Dr. Guillermo Gran Benavente de Concepción y alumno del magíster de Bioquímica Clínica e inmunología, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción.

Tutora: Estefanía Nova Lamperti, Docente del Magíster de Bioquímica clínica e Inmunología, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción.

El propósito de este documento es invitarlo(a) a participar en un proyecto de investigación y entregarle toda la información necesaria para que Ud. pueda decidir libre y voluntariamente si desea participar en la investigación que se le ha explicado verbalmente, y que a continuación se describe en forma resumida.

Objetivo del proyecto: Evaluar el efecto de vitamina D y metformina sobre la vía glicolítica de linfocitos T CD4+ activados en condiciones de normo y alta glucosa.

Para lograr dicho objetivo, a los individuos que hayan aceptado participar voluntariamente en este proyecto, se les tomará una muestra de 10cc de sangre periférica mediante punción venosa. Es el mismo procedimiento que cuando se toma un examen de sangre para diagnóstico o control de alguna enfermedad. A partir de su muestra de sangre, se separará una porción de células del sistema inmune llamadas linfocitos T CD4+. Estos linfocitos se tratarán con distintas combinaciones de vitamina D y metformina (fármaco utilizado en el control de la diabetes) y con distintas concentraciones de glucosa (azúcar). Luego se evaluará un proceso celular llamado glicólisis, que es una de las formas en que las células pueden obtener energía a partir de los carbohidratos.

El beneficio de este proyecto corresponde al avance en el conocimiento sobre el efecto de fármacos comunes que se podrían llegar a utilizar para modificar cómo las células del sistema inmune (las defensas del cuerpo) obtienen energía y cómo responden frente a infecciones, cáncer y otras enfermedades. Los riesgos de participar en este estudio corresponden a la molestia provocada por la extracción de la sangre, esta muestra de sangre será tomada una sola vez.

Para cumplir el objetivo es necesario que la muestra sea tomada durante la mañana, no es necesario que esté en ayuno ni tenga algún régimen de alimentación especial. Previa a la toma de sangre, deberá completar una encuesta con información médica. En caso que usted tome medicamentos, debe tomarlos como lo hace habitualmente. Cabe mencionar, que la participación en el estudio está exenta de compensación económica. La participación del individuo en el proyecto no le generará costo alguno, ya que todos los costos asociados a la participación serán cubiertos por el proyecto.

Es importante señalar que todos los datos personales obtenidos son confidenciales y la información obtenida será utilizada exclusivamente para fines científicos. Esta información será custodiada por los investigadores responsables, Ricardo Cartes, quienes mantendrán los registros de datos en archivos pertenecientes al proyecto de investigación, y el anonimato será resguardado entregando un número correlativo a su nombre.

Los resultados estarán disponibles para usted, y para ello debe comunicarse con los investigadores responsables.

A su vez hay que indicar que su participación es completamente libre y voluntaria. Si no desea participar del presente proyecto de investigación su negativa no traerá ninguna consecuencia para usted. De la misma manera si lo estima conveniente usted puede dejar de participar en el estudio en cualquier momento de éste, incluso después de haber completado la encuesta de información médica y la toma de la muestra de la sangre.

Adicionalmente, el investigador responsable Ricardo Cartes Velásquez, correo electrónico rcartes@udec.cl, número de contacto 977575655, le manifiesta su voluntad en orden a aclarar cualquier duda que surja sobre su participación en la actividad realizada. Además, usted puede contactarse con el Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad de la Dirección de Investigación y Creación Artística de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Concepción, a través de su presidenta, Dra. María Andrea Rodríguez Tastets, cuyo teléfono de contacto es 412204302 y/o con la tutora de este proyecto, Dra. Estefanía Nova Lamperti, correo electrónico enova@udec.cl, número de contacto es 412722745.

1-C Tratamiento de desechos biológicos

Los procedimientos de tratamiento para el desecho de material biológico se realizarán de acuerdo a la normativa de MATPEL y la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción.



CLASIFICACIÓN Y MANEJO DE RESIDUOS BIOLÓGICOS



Tipo de Residuo	Definición	Almacenamiento y Retiro	Contenedor o bolsa
Residuos biológicos (tipo 1)	Corresponden SOLO a tejidos humanos, restos de tejidos humanos, materiales contaminados con fluidos humanos (sangre, orina) y restos de animales contaminados con bacterias o virus patógenos.	Deben ser almacenados a temperaturas inferiores a 4°C hasta ser retirados por la unidad RESPEL o empresa externa*.	Bolsa de autoclave amarilla 
Residuos cortopunzantes biológicos (tipo 2)	Corresponden a materiales cortopunzantes (agujas, lancetas, hojas de bisturí, escalpelos) que se han utilizado con fluidos y tejidos humanos o en disecciones de animales contaminados con bacterias o virus patógenos.	Deben ser almacenados a temperaturas inferiores a 4°C hasta ser retirados por la unidad RESPEL o empresa externa*.	Caja cortopunzante amarilla 
Residuos bio-inertes (tipo 3)	Corresponden a animales o restos de animales de experimentación que NO están contaminados con bacterias o virus patógenos u otras sustancias peligrosas.	Deben ser almacenados en bolsas para residuos inertes color negro, resistente al volumen y peso del residuo, a temperaturas inferiores a 4°C hasta ser retiradas por la unidad RESPEL para su disposición final. En caso de que el residuo corresponda a una muestra preservada, se debe separar de la fracción líquida (ej. formalina, alcohol), la que debe ser almacenada como residuo químico.	Bolsa para residuos inertes color negro 
Residuos cortopunzantes inertes (tipo 4)	Corresponden a materiales cortopunzantes (agujas, lancetas, hojas de bisturí, escalpelos) que NO han estado en contacto con tejidos humanos, restos de tejidos humanos, fluidos humanos (sangre, orina), ni restos de animales contaminados con bacterias o virus patógenos.	Deben ser almacenados en contenedores plásticos de 4 u 8 kg, etiquetados como "Cortopunzante inerte", hasta ser retirados por la unidad RESPEL para su disposición final	Contenedor plástico 4 u 8 kg 
Residuos microbiológicos (tipo 5)	Corresponden a materiales de cultivo que han estado en contacto con bacterias no patógenas y que han sido inactivados por esterilización con autoclave o por desinfección en un baño con solución de hipoclorito de sodio.	Deben ser entregados a la unidad RESPEL, SOLO después de ser inertizados mediante autoclave o desinfectados en un baño con solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 hora. En caso contrario, no se procederá con el retiro. La unidad RESPEL entregará bolsas de autoclave solo cuando éste sea el método utilizado de inactivación.	Bolsa de autoclave transparente o blanca (solo para autoclave) 

(*) El retiro desde la Facultad de Medicina, Facultad de Odontología, DISE y Centro RAI, será una vez a la semana a través de empresa externa Stericycle y la unidad RESPEL. El resto de las facultades que generen este tipo de residuos deberá gestionar retiro mensual a través de la unidad RESPEL.

Instructivo elaborado en colaboración con la Facultad de Ciencias Biológicas.

Revisado 15-01-2016