

Terapia CAR-T y citometría espectral: El nuevo horizonte del monitoreo inmune

El tratamiento del cáncer ha evolucionado significativamente en las últimas décadas gracias al desarrollo de múltiples estrategias terapéuticas. Tradicionalmente, la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia han constituido los pilares fundamentales del manejo oncológico. Más recientemente, los avances en biología molecular e inmunología han impulsado el desarrollo de inmunoterapias (como anticuerpos monoclonales, células dendríticas, vacunas antitumorales e inmunoterapia celular) (1), capaces de actuar de manera más específica sobre las células tumorales.

Estas innovaciones han permitido mejorar la supervivencia y la calidad de vida de muchos pacientes, especialmente de aquellos con enfermedades hematológicas y tumores refractarios a los tratamientos convencionales.



Figura 1. Evolución de las estrategias terapéuticas contra el cáncer. Elaboración propia.

Dentro de esta nueva era de la medicina de precisión, las terapias con células CAR-T (Chimeric Antigen Receptor T Cells) representan uno de los avances más disruptivos en oncología. Mediante la modificación genética de los linfocitos T del propio paciente para reconocer y eliminar células tumorales específicas, esta estrategia ha transformado el tratamiento de neoplasias hematológicas como la leucemia linfoblástica aguda de células B, los linfomas B agresivos y el mieloma múltiple.

Han transcurrido varias décadas antes de que la terapia con células CAR-T pudiera utilizarse con éxito en ensayos clínicos. La primera generación de estas células tenía como objetivo permitir que expresaran en su superficie un receptor quimérico de antígeno (CAR), capaz de reconocer de forma selectiva una proteína específica presente en las células cancerosas.

Posteriormente, la segunda y la tercera generación fueron diseñadas para mejorar su actividad y prolongar su supervivencia en el organismo. La cuarta generación incorporó la capacidad de secretar citocinas que estimulan el sistema inmunitario y potencian la respuesta antitumoral.

Actualmente, la quinta generación de células CAR-T, aún en desarrollo, contempla la incorporación de técnicas de edición genética, como CRISPR, para mejorar su precisión y especificidad, así como otras estrategias biológicas que permitan a estas células responder a múltiples señales del microambiente tumoral (2).

Este proceso de fabricación de las células CAR-T se realiza, en la mayoría de los casos, de forma autóloga, utilizando los linfocitos T del propio paciente, y consta de seis etapas clave:

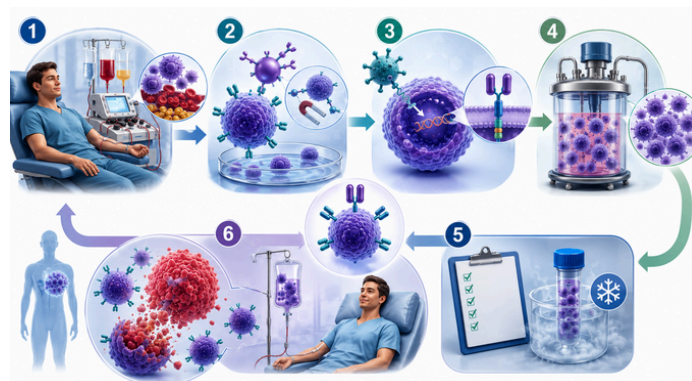


Figura 2. Proceso de fabricación de las células CAR-T. Elaboración propia.



1. Leucoféresis (recolección de células)

Mediante una máquina de aféresis se separan los glóbulos blancos (incluidos los linfocitos T) del resto de la sangre. Los demás componentes sanguíneos, como los glóbulos rojos, las plaquetas y el plasma, se devuelven al paciente durante el mismo procedimiento. La cosecha celular obtenida se congela y se envía a un laboratorio especializado en terapia celular.

2. Selección y activación celular

Una vez en la planta de manufactura, las células se descongelan y se purifican para aislar específicamente los linfocitos T, utilizando marcadores como CD3, CD4 y CD8. Debido a que los linfocitos T de los pacientes con cáncer suelen encontrarse "agotados" o inactivos funcionalmente, se estimulan in vitro mediante anticuerpos específicos, frecuentemente unidos

a perlas magnéticas, con el fin de inducir su proliferación y prepararlos para recibir el nuevo material genético.

3. Transducción genética (el "rediseño")

Etapa central de la bioingeniería. Para que el linfocito T sea capaz de reconocer el tumor, se introduce en su interior el gen que codifica el receptor quimérico de antígeno (CAR).

- En la mayoría de los casos, este proceso se realiza mediante un vector viral modificado (lentivirus o retrovirus) que ha sido inactivado para evitar que cause enfermedad.
- El virus actúa como un "caballo de Troya": ingresa al linfocito T e inserta el gen del CAR en el ADN celular. A partir de ese momento, la célula comienza a sintetizar y expresar este nuevo receptor artificial en la superficie celular.

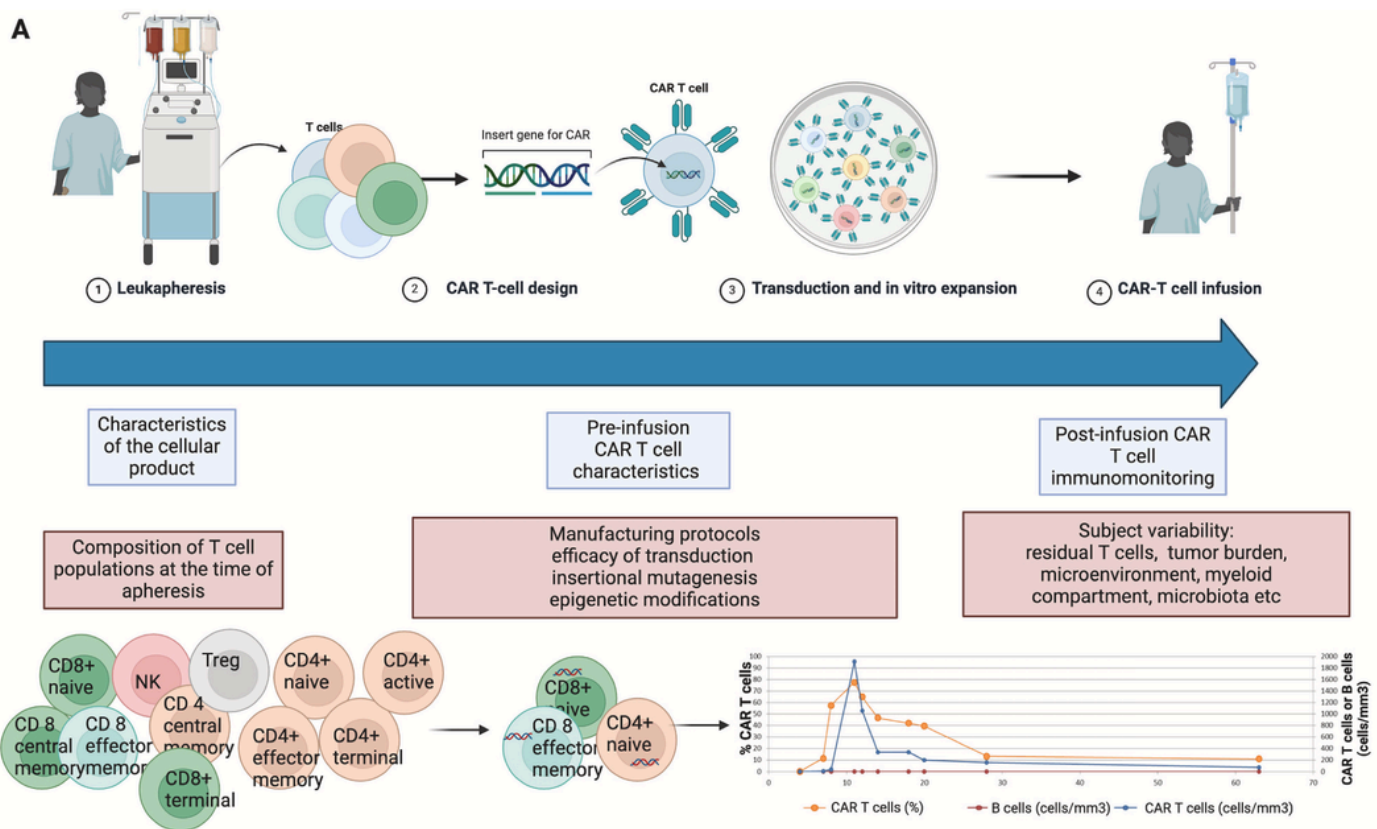


Figura 3. Flujo de trabajo y técnicas para el monitoreo inmunológico en la terapia con células CAR-T. (A) Descripción general del proceso de la terapia con células CAR-T, que comienza con la leucoaféresis para recolectar células T, seguida de la transducción y expansión ex vivo para crear células CAR-T y, finalmente, la infusión al paciente. Las características clave evaluadas en cada etapa incluyen la composición de las subpoblaciones de células T en la aféresis, la calidad y eficacia del producto de células CAR-T y el monitoreo inmunológico posterior a la infusión, que considera variables específicas del paciente, como las poblaciones residuales de células T, la carga tumoral y los factores del microambiente. Tomado de Pagliuca, S. et al. (2025). (3).



4. Expansión ex vivo

Las células que ya expresan el CAR se cultivan en biorreactores con medios de cultivo optimizados y factores de crecimiento, como la interleucina-2 (IL-2). El objetivo es promover su multiplicación exponencial hasta obtener miles de millones de células CAR-T.

5. Control de calidad y criopreservación

Antes de su liberación, el lote de células CAR-T se somete a rigurosos controles de calidad, en los que se evalúan parámetros como la pureza celular y la eficiencia de transducción, es decir, el porcentaje de células que expresan correctamente el receptor CAR en su membrana. Una vez aprobado, el producto se vuelve a congelar mediante criopreservación para garantizar su transporte seguro de regreso al centro hospitalario.

6. Infusión al paciente

Mientras las células se producen en el laboratorio, el paciente suele recibir un régimen de quimioterapia de baja intensidad (linfodepleción) con el objetivo de "hacer espacio" en su sistema inmunitario y favorecer la expansión de las células CAR-T. Finalmente, las células se descongelan y se administran mediante una infusión intravenosa, listas para proliferar en el organismo y destruir las células tumorales.

En la Figura 3 se presenta una descripción general del proceso de terapia con células CAR-T, que comienza con la leucoféresis para la recolección de linfocitos T del paciente, seguida de la transducción genética y la expansión ex vivo para generar las células CAR-T y finalmente, la infusión al paciente (3).

Al tratarse de un medicamento vivo capaz de expandirse, persistir y evolucionar dentro del organismo, uno de los mayores desafíos actuales consiste en comprender por qué

algunos pacientes logran respuestas duraderas, mientras que otros presentan recaídas o desarrollan toxicidades severas, como el síndrome de liberación de citocinas (CRS) o la neurotoxicidad asociada a células efectoras inmunes (ICANS). El seguimiento de las células CAR-T plantea nuevos retos clínicos y analíticos que requieren herramientas de monitoreo cada vez más sofisticadas (4).



Figura 4. Monitoreo analítico de las células CAR-T. Elaboración propia.

Además de los controles de calidad estándar, como la evaluación de las propiedades fisicoquímicas, el conteo y la viabilidad celular, entre otros, Pagliuca et al. (2025) realizaron una encuesta con el objetivo de conocer las prácticas actuales para la monitorización de las células CAR-T.

Los resultados mostraron que el 63% de los protocolos, tanto en el ámbito clínico como en investigación, emplean ensayos de citometría de flujo, mientras que los métodos basados en PCR son utilizados con menor frecuencia (28%). Los autores señalan que la preferencia por la citometría de flujo podría atribuirse a la disponibilidad comercial de reactivos, la posibilidad de caracterizar diversos subtipos de células CAR-T y un menor tiempo de respuesta. No obstante, consideran que la combinación de estas técnicas con otras metodologías, como la transcriptómica, la epigenómica y la metabolómica, podría ofrecer una visión más amplia del panorama inmunológico antes y después de la infusión de estas células.



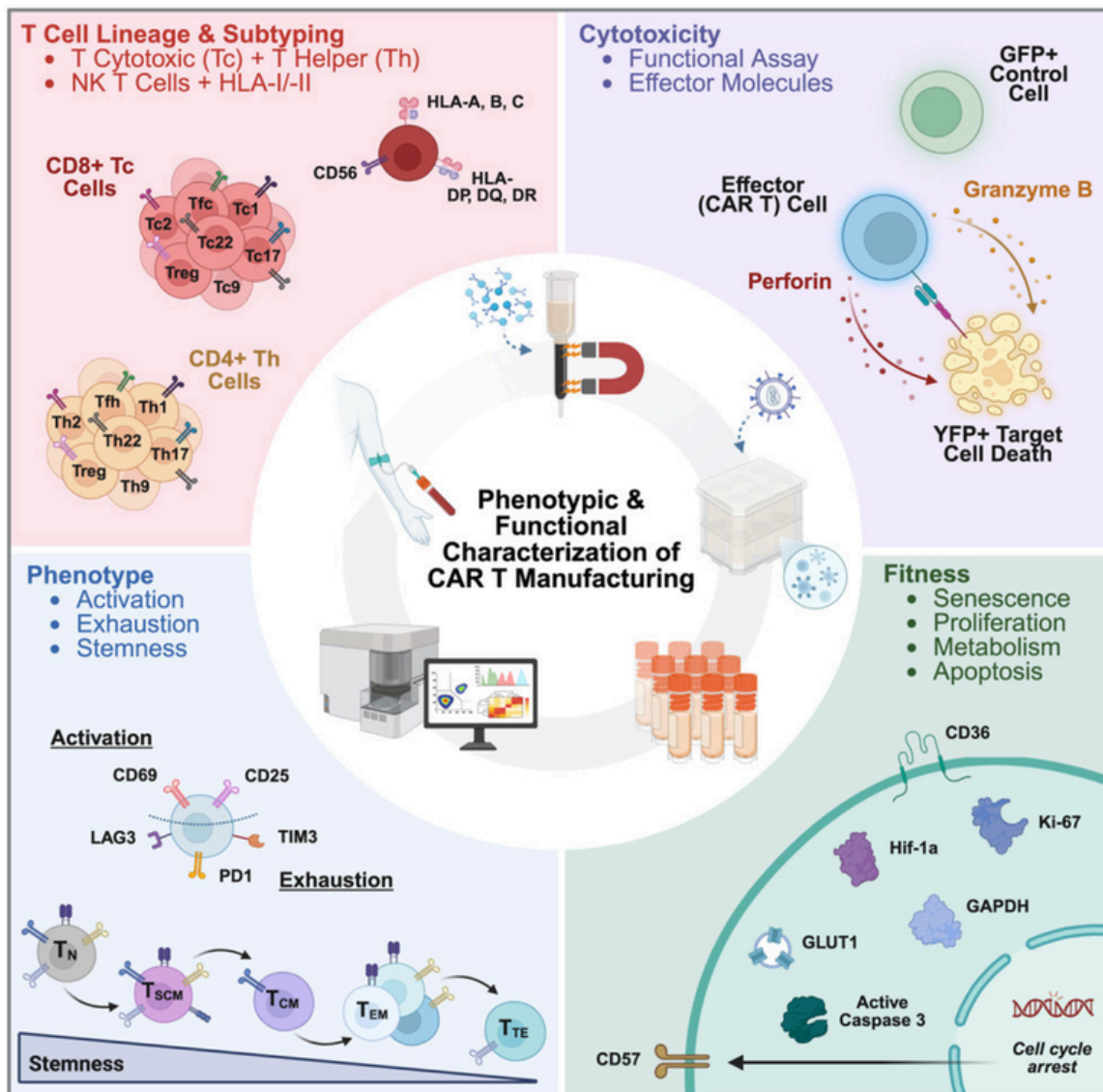


Figura 3. Graphic Abstract. High-dimensional temporal mapping of CAR T cells reveals phenotypic and functional remodeling during manufacturing. Molecular Therapy. Tomado de Cadinamos-Garai A, et al. (2025). (5).

Sumado a las ventajas de la citometría de flujo anteriormente mencionadas, hoy en día la citometría de flujo espectral de espectro completo (Full Spectrum Profiling, FSP) ofrece la posibilidad de diseñar paneles de anticuerpos robustos que permiten realizar, en un solo tubo, una caracterización multidimensional profunda. Esta tecnología no solo permite el conteo celular y la determinación de la viabilidad, sino también la evaluación del fenotipo de diferentes poblaciones celulares, como los linfocitos T CD3+, CD4+, CD8+, CD19+ y las células NK CD56+, identificando:

- Estados de diferenciación celular.
- Marcadores de activación.
- Marcadores de agotamiento (exhaustion).
- Capacidad proliferativa.
- Subpoblaciones de memoria inmunológica, entre otros.

Además, permite determinar y cuantificar tanto las células CAR-T como la población de células neoplásicas del paciente (4,5).

En estudios recientes, Odak I et al. (2024), como Cadinamos-Garai, A et al (2025). utilizaron



han utilizado plataformas de citometría espectral Cytex® junto con paneles multiparamétricos de más de 30 colores. El primer grupo empleó esta estrategia para proporcionar una visión integral de la evolución fenotípica de las células CAR-T desde la muestra del donante, pasando por las etapas de activación, transducción, expansión y evaluación funcional. Sus resultados demostraron que los productos obtenidos durante las etapas tempranas de expansión conservaban una mayor proporción de células con características de memoria y mayor potencial proliferativo, mientras que los cultivos prolongados generaban poblaciones más diferenciadas y terminales (6).

Por su parte, el segundo grupo de investigación utilizó esta tecnología para identificar firmas inmunológicas presentes en el producto CAR-T (tisagenlecleucel, una terapia CAR-T indicada para leucemia linfoblástica aguda de células B y linfomas no Hodgkin, como el linfoma B difuso de célula grande) asociadas con el desarrollo posterior de neurotoxicidad (ICANS) en pacientes tratados con este medicamento (5).

Estos y otros trabajos publicados durante los últimos años han evidenciado que la transición de la citometría convencional a la citometría de flujo espectral amplía significativamente las posibilidades de estudio de las poblaciones celulares, tanto en la investigación como en el seguimiento clínico. Gracias al empleo de paneles de alta dimensión, es posible analizar simultáneamente múltiples parámetros biológicos en una única muestra, permitiendo evaluar:

- Identificación y linaje: CD3, CD4, CD8, CD45 y CD56 (células NK/NK-like).
- Caracterización CAR: expresión del receptor CAR (por ejemplo, CD19 CAR-T o BCMA CAR-T de Immunostep).
- Diferenciación y maduración: CD45RA,

CCR7, CD95, CD27 y CD28, permitiendo resolver subpoblaciones de linfocitos desde fenotipos naïve hasta células efectoras terminales.

- Estado funcional y citotoxicidad: niveles intracelulares de perforina y granzima B, junto con marcadores de activación como CD25 y CD69.
- Perfil metabólico: monitoreo del estado energético celular mediante GLUT1, GAPDH, CD36 e HIF-1α.
- Agotamiento y senescencia: expresión coordinada de PD-1, TIM-3, LAG-3 y CD57.

Finalmente, puede afirmarse que, aunque estos hallazgos aún requieren validación en cohortes de mayor tamaño, sugieren que la caracterización profunda de las células CAR-T podría convertirse en una herramienta predictiva para la seguridad clínica.

Si bien todavía no existe un protocolo universal para el monitoreo de estas terapias mediante citometría de flujo, la citometría espectral está redefiniendo su seguimiento. Ya no se trata únicamente de detectar la presencia de células modificadas, sino de comprender su comportamiento biológico, su capacidad funcional y su relación con la respuesta clínica y el desarrollo de toxicidades.

A medida que se establezcan protocolos estandarizados y paneles más robustos, esta tecnología continuará consolidándose como una herramienta clave para avanzar hacia una inmunoterapia más precisa, segura y personalizada.

Si es de su interés conocer acerca de las soluciones que ofrece Biosciences SAS, en cuanto al portafolio de Citometría de Flujo; lo invitamos a escribir al correo eproducto1@biosciences.com.co.



Bibliografía

1. Clinic Barcelona. Immunoterapia [Internet]. Barcelona: Clinic Barcelona; 2023. Disponible en: <https://www.clinicbarcelona.org/asistencia/pruebas-y-procedimientos/inmunoterapia/tipos-de-inmunoterapia>
2. Golmohammadi M, Noorbakhsh N, Kavianpour M. CAR-T cell therapy: managing side effects and overcoming challenges. Adv Biomed Res. 2025;14:38. doi:10.4103/abr.abr_531_23. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12087935/>
3. Pagliuca S, Malard F, Mooyaart JE, Daskalakis M, Gabellier L, Yakoub-Agha I, et al. The landscape of immune monitoring in CAR-T cell therapy: a comprehensive review and survey study by the Cellular Therapy and Immunobiology Working Party of the EBMT. Blood Rev. 2025;71:101272. doi:10.1016/j.blre.2025.101272. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39986989/>
4. Sociedad Española de Inmunología. Guía de recomendaciones para la monitorización de terapias CAR-T [Internet]. Disponible en: https://www.inmunologia.org/images/site/guias/GUIA_MONITORIZACION_CART_GEIT.pdf
5. Cadinanos-Garai A, Flugel C, Cheung A, Jiang A, Vaissie A, Abou-el-Enein M. High-dimensional temporal mapping of CAR T cells reveals phenotypic and functional remodeling during manufacturing. Mol Ther. 2025;33:2291-2309. doi:10.1016/j.ymthe.2025.04.006
6. Odak I, Bayir LM, Riemann L, Sikora R, Schneider J, Xiao Y, et al. Brief research report: in-depth immunophenotyping reveals stability of CD19 CAR T-cells over time. Front Immunol. 2024;15:1298598. doi:10.3389/fimmu.2024.1298598.

