



Universidad
Zaragoza



Facultad de Medicina
Universidad Zaragoza

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Desarrollo de inmunoterapias CAR-T con mayor eficiencia mediante la modulación de la maquinaria antiapoptótica

Autora:

Lydia Minguell Soto

Directores:

Julián Pardo Jimeno

Diego Sánchez-Martínez

Máster Universitario en Inmunología Tumoral e Inmunoterapia del Cáncer

Facultad de Medicina

Centro de Investigaciones Biomédicas de Aragón (CIBA)

Curso académico: 2024-2025

ABREVIATURAS

- **7-AAD:** 7-aminoactinomicina D (*7-Aminoactinomycin D*)
- **ABB Buffer:** Anexin V Binding Buffer
- **ABBV-466:** inhibidor experimental de Mcl-1
- **Ac:** anticuerpo
- **ADCC:** citotoxicidad dependiente de anticuerpo (*antibody dependent cellular antibody*)
- **APAF1:** factor activador de proteasas apoptóticas 1
- **BAK:** proteína proapoptótica de la familia Bcl-2 (*Bcl-2 Antagonist/Killer*)
- **BAX:** proteína proapoptótica de la familia Bcl-2 (*Bcl-2 Associated X Protein*)
- **Bcl-2:** B-cell Lymphoma 2
- **Bcl-A1:** B-cell Lymphoma A1
- **Bcl-X_L:** B-cell Lymphoma Extra Large
- **BSA:** albúmina sérica bovina
- **CAR-T:** receptor antígeno químérico de células T.
- **CD1a:** molécula presentadora de lípidos (*Cluster of Differentiation 1a*)
- **CD28:** receptor coestimulador de lípidos T (*Cluster of Differentiation 28*)
- **CD3:** receptor de células T (*Cluster of Differentiation 3*)
- **coT-ALL:** leucemia linfoblástica aguda cortical de células T (*Cortical T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia*)
- **Célula NK:** célula asesina natural (*natural killer cell*)
- **Célula Treg:** célula T reguladora
- **CRS:** síndrome de liberación de citoquinas (*Cytokine Release Syndrome*)
- **DCs:** células dendríticas (*Dendritic Cells*)
- **DMSO:** dimetilsulfóxido
- **DNA:** ácido desoxirribonucleico
- **DT2216:** PROTAC degradador de Bcl-X_L (*Bcl-X_L targeting PROTAC*)
- **Fas/CD95:** receptor de muerte celular
- **FasL:** receptor de FAS (*Fas ligand*)
- **FBS:** suero Fetal Bovino (*Fetal Bovine Serum*)
- **Fc:** región cristalizable del anticuerpo
- **GFP:** proteína fluorescente verde (*Green Fluorescent Protein*).
- **HEK 293T:** células embrionarias de riñón humano
- **IL-7/IL-15:** interleucina 7 / Interleucina 15

- **LLA-B:** leucemia linfoblástica aguda de células B
- **LLA-T:** leucemia linfoblástica aguda de células T
- **mCherry:** proteína fluorescente roja (*Monomeric Cherry Red Fluorescent Protein*)
- **MHC:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*)
- **MOI:** *multiplicity of infection*
- **mRNA:** RNA mensajero
- **PBMCs:** células mononucleares de sangre periférica (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*)
- **PBS:** solución salina tamponada con fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)
- **PEI:** polietilenimina
- **PVDF:** fluoruro de polivinilideno (*Polyvinylidene Fluoride*)
- **R/R:** en recaída o refractaria
- **RFP:** proteína fluorescente roja (red fluorescent protein)
- **RPMI:** medio de cultivo RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute Medium*)
- **scFv:** fragmento variable de cadena única (*Single-chain Variable Fragment*)
- **SDS-PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
- **SMAC:** activador mitocondrial de caspasas
- **T2A:** péptido 2A del virus Thosea asigna
- **TME:** microambiente tumoral
- **TNF α :** Factor de necrosis tumoral alfa
- **TU/mL:** unidades transductoras por mililitro
- **UT:** no transfectadas (*Untransduced*)
- **VSV-G:** proteína G del virus de la estomatitis vesicular (envoltura viral)
- **WT:** tipo silvestre, sin modificación genética (*Wild Type*)
- **WHO:** organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*)

Contenido

1.	RESUMEN	1
2.	ABSTRACT	2
3.	INTRODUCCIÓN.....	3
a.	El cáncer.....	3
	Definición y origen	3
	Características del cáncer	4
b.	Leucemia.....	5
	Leucemia Linfoblástica aguda de las células T (LLA-T)	6
c.	Alteraciones en la muerte celular programada: implicaciones terapéuticas	7
	Apoptosis y su importancia en la homeostasis celular	7
	Nuevas terapias dirigidas: inhibidores específicos	8
d.	Sistema inmunitario.....	9
	Estrategias del tumor para evadir el sistema inmunitario	12
	Inmunoterapia	12
e.	CAR-T	13
	CD1aCAR-T	14
	Resistencias a los CAR-Ts.....	15
4.	ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	16
a.	Antecedentes.....	16
b.	Objetivos	17
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
a.	Líneas celulares.....	18
	Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares	18
	Plásmidos.....	18
	Generación de lentivirus.....	19
	Obtención de las líneas celulares resistentes a la apoptosis.....	19
b.	Análisis de la expresión de proteínas antiapoptóticas mediante Western-Blot	21
	Obtención de los lisados celulares.....	21
	Cuantificación de proteínas en los extractos celulares.....	21
	Separación de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y transferencia a membranas PVDF.....	22
	Análisis de la expresión de las proteínas antiapoptóticas por Western-Blot	22
c.	Generación de CAR-T a partir de sangre periférica.	23

Extracción de PBMCs	23
Plásmidos y vectores virales	24
Titulación viral	25
Activación y transfección de los linfocitos T para la generación de células CAR-T.....	25
Caracterización de la transducción	26
d. Evaluación de la Viabilidad Celular.....	27
6. RESULTADOS.....	28
a. Generación de células Jurkat resistentes a la apoptosis	28
Análisis de la transfección mediante citometría de flujo.....	28
Análisis de la expresión de las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 mediante Western Blot.....	30
b. Evaluación de la resistencia a quimioterápicos convencionales	31
c. Estudio de la sensibilidad de las células Jurkat resistentes a la apoptosis frente a inhibidores específicos	33
Efecto de DT2216: Inhibidor de Bcl-X _L	34
Efecto de Venetoclax: Inhibidor de Bcl-2	34
Efecto de ABBV-467: Inhibidor de Mcl-1	38
d. Evaluación de la expresión de CD1a.....	39
e. Análisis de la actividad citotóxica de las células CD1aCAR-T frente a células Jurkat con sobreexpresión de proteínas de la familia Bcl-2.....	40
f. Evaluación del efecto de la combinación de inhibidores específicos con células CD1aCAR- T	42
7. DISCUSIÓN	47
8. CONCLUSIONES	49
9. CONCLUSIONS.....	50
10. BIBLIOGRAFÍA	51

1. RESUMEN

La inmunoterapia, y en particular las terapias con células CAR-T, han supuesto una revolución en el tratamiento del cáncer en los últimos años, mostrando altas tasas de remisión en pacientes con tumores de células B (leucemia, linfoma, mieloma múltiple) en recaída o refractarios. No obstante, aproximadamente el 50% de los pacientes tratados con células CAR-T recaen durante el año posterior a la infusión. Asimismo, la aplicación de este tipo de terapias en otros tipos de tumores presenta una serie de dificultades, especialmente debido a las toxicidades asociadas en tejidos sanos.

En el caso de la leucemia linfoblástica aguda de células T (LLA-T), la aplicación de terapias adoptivas como los CAR-T resulta especialmente compleja debido a la similitud antigenética entre las células T normales y las células tumorales. A pesar de ello, existen dianas alternativas como CD1a, frente a la que un CAR-T ha demostrado ser efectivo sin presentar potenciales toxicidades.

En este trabajo, analizamos tanto el efecto de las células CD1aCAR-T sobre tumores resistentes a la apoptosis, como la optimización del uso de inhibidores específicos de proteínas antiapoptóticas en combinación con células CD1aCAR-T. Para ello, se evaluó cada inhibidor en monoterapia y en combinación con los CAR-T.

Cabe destacar que, se observó una gran reducción en la viabilidad celular al tratar células Jurkat, que presentaban sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas, con dosis bajas de su inhibidor específico en combinación con bajos ratios de las células CD1aCAR-T. Paralelamente, se analizó el efecto del inhibidor en combinación con células T no transfectadas (UT), así como de cada monoterapia (inhibidor y células T, con y sin transfectar) de manera individual.

Los resultados obtenidos sugieren que el uso combinado de inhibidores específicos con terapias celulares podría representar una estrategia terapéutica prometedora para pacientes con LLA-T R/R los cuales, actualmente, carecen de tratamientos efectivos, dado que aumenta la eficacia en un contexto de resistencia a la muerte celular. Además, esta combinación permitiría emplear bajas dosis de inhibidores, reduciendo los posibles efectos adversos.

2. ABSTRACT

Immunotherapy, particularly chimeric antigen receptor T-cell (CAR-T) therapy, has revolutionized cancer treatment in recent years, showing high remission rates in patients with relapsed or refractory B-cell malignancies (leukemia, lymphoma, multiple myeloma). However, approximately 50 % of patients treated with CAR-T cells experience relapse within the first year after infusion. Moreover, applying this type of therapy to other cancer types poses several challenges, mainly due to toxicities in healthy tissues.

In the case of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL), the use of adoptive therapies such as CAR-T is especially complex due to the antigenic similarity between normal T cells and malignant T cells. Nevertheless, alternative targets like CD1a have been identified, against which a CD1a-directed CAR-T (CD1aCAR-T) has shown efficacy without apparent toxicity.

In this study, we investigated both the effect of CD1aCAR-T cells on apoptosis-resistant tumors and the optimization of combining these cells with selective inhibitors of anti-apoptotic proteins. To this end, each inhibitor was tested both as monotherapy and in combination with CD1aCAR-T cells.

Notably, a significant reduction in cell viability was observed in Jurkat cells overexpressing anti-apoptotic proteins when treated with low doses of their specific inhibitor in combination with low ratios of CD1aCAR-T cells. In parallel, we analyzed the effect of combining the inhibitor with untransfected T cells (UT), as well as the effects of each monotherapy (inhibitor and T cells, both transfected and untransfected) independently.

The results suggest that the combined use of specific inhibitors and cell-based therapies may represent a promising therapeutic strategy for patients with relapsed/refractory T-ALL, who currently lack effective treatment options. This combination enhances efficacy in a context of apoptosis resistance and may allow for lower inhibitor doses, potentially reducing adverse effects.

3. INTRODUCCIÓN

a. El cáncer

Definición y origen

El término “Cáncer” hace referencia a un grupo heterogéneo de enfermedades que pueden afectar a, prácticamente, la totalidad del organismo. Su principal característica es la proliferación acelerada y descontrolada de células anómalas que, al extenderse fuera de sus límites habituales, pueden invadir partes adyacentes y, en fases avanzadas, extenderse a otros órganos en un proceso denominado *metástasis* (Nelson & Cox, 2021).

El origen del cáncer se encuentra en alteraciones del material genético celular. Estas alteraciones son generadas por la interacción de factores endógenos (como predisposición genética del individuo) y agentes externos. Estos agentes externos, denominados carcinógenos, pueden clasificarse en físicos (ejem.: radiaciones ultravioletas), químicos (ejem.: amianto) y biológicos (ejem.: virus del papiloma humano, VPH) (World Health Organization [WHO], 2022).

El desarrollo del cáncer se divide habitualmente en cuatro etapas denominadas: iniciación, promoción, progresión y metástasis. La fase de **iniciación** se caracteriza por el desarrollo de alteraciones genómicas que potencian la capacidad proliferativa de la célula. Posteriormente, en la fase de **promoción**, las células preneoplásicas comienzan a acumularse, formando pequeños tumores benignos. Durante la **progresión**, las células adquieren nuevas alteraciones genéticas que dan lugar a proliferación descontrolada. Es en esta fase, donde el tumor adquiere el componente maligno, acelerando su crecimiento. Finalmente, la **metástasis** se produce como consecuencia de la pérdida de la capacidad de adhesión de algunas células, desprendiéndose de las células vecinas y pudiendo ingresar tanto en el torrente sanguíneo como el torrente linfático, diseminándose a otros órganos donde generarán focos tumorales secundarios (de Visser and Joyce, 2023).

Características del cáncer

En el año 2000, Hanahan y Weinberg propusieron que las propiedades funcionales que permiten a los tumores crecer y diseminarse podían agruparse en seis características clave (*hallmarks*): (1) capacidad proliferativa, (2) evasión de los supresores del crecimiento, (3) resistencia a la muerte celular, (4) capacidad de replicación ilimitada, (5) inducción de la angiogénesis, (6) activación de los procesos de invasión y metástasis (Hanahan, 2000).

En el año 2011, introdujeron dos nuevos *hallmarks* al proceso de desarrollo tumoral. Estas características eran (7) la capacidad de la célula para reprogramar su metabolismo, consiguiendo así una mayor proliferación y la adquisición de la capacidad de (8) evadir al sistema inmunitario (Hanahan y Weinberg, 2011).

Recientemente, los avances en la investigación sobre el desarrollo de los tumores han permitido incluir nuevos *hallmarks* como la plasticidad fenotípica, el polimorfismo del microbioma, la senescencia celular y la reprogramación epigenética no mutacional (Hanahan, 2022).

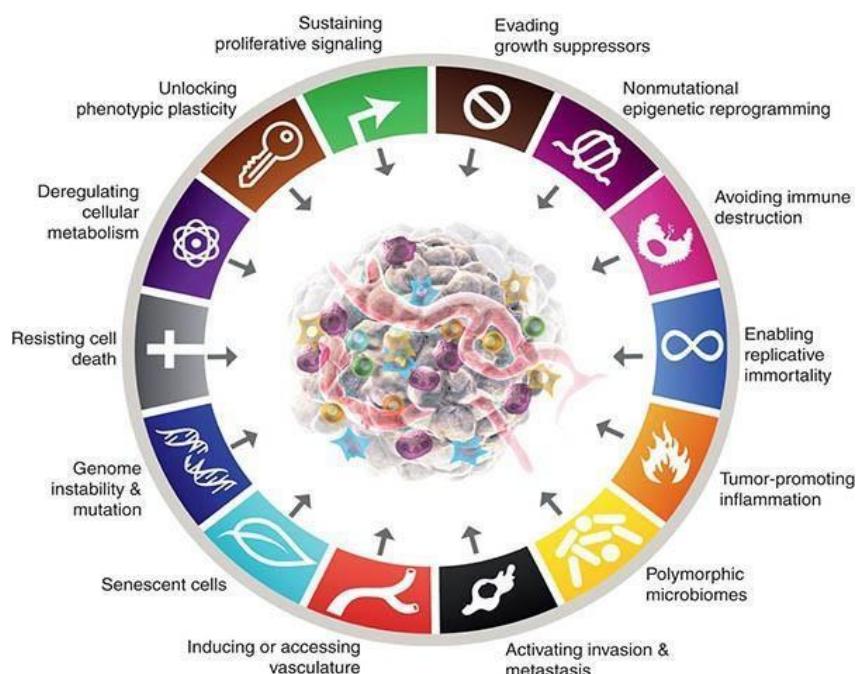


Figura 1. Características del cáncer. (Hanahan, 2022)

En relación con las características anteriormente mencionadas, encontramos la **resistencia a la muerte celular programada (apoptosis)**. La apoptosis depende del balance entre señales activadoras e inhibidoras mediadas por la **familia de proteínas**

Bcl-2, que regulan la activación de proteasas encargadas de destruir la célula y facilitar su posterior eliminación por apoptosis (Kalogi et al., 2023).

En definitiva, las características distintivas del cáncer anteriormente descritas son capacidades funcionales adquiridas gracias a la inestabilidad genómica y la inflamación crónica, que permiten a las células sobrevivir, proliferar y diseminarse (Hanahan y Weinberg, 2011).

b. Leucemia

La **leucemia** es una neoplasia maligna que se origina en la médula ósea, tejido responsable de la producción de células sanguíneas. Su principal característica es la proliferación anómala y descontrolada de glóbulos blancos, que se infiltran en la médula ósea, impidiendo la producción normal de glóbulos rojos, plaquetas y leucocitos (Carbonel Castillo, 2017).

Existen diversos tipos de leucemias, que se clasifican principalmente según su velocidad de progresión y el tipo celular afectado, lo que determina las opciones terapéuticas y pronósticas. Así, se distinguen las leucemias agudas, de rápida progresión, y las crónicas, que presentan un curso más lento y, a menudo, asintomático en las fases iniciales. Aunque existen variaciones, todas las formas leucémicas presentan una expansión clonal de células anormales que alteran la función hematopoyética normal, generando síntomas como anemia, infecciones recurrentes y otros trastornos hematológicos (Döhner et al., 2017).

Según datos del Observatorio del Cáncer de la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC), en 2023 se diagnosticaron 6.074 nuevos casos de leucemia en España siendo la incidencia mayor en varones (Domínguez & Colorado, 2024). La probabilidad de desarrollar leucemia aumenta con la edad, siendo más frecuente en personas mayores de 65 años. A pesar de esto, la leucemia es la neoplasia más común en población pediátrica, representando el 30 % de los cánceres infantiles. En términos de mortalidad, en 2023, se registraron 3.365 muertes por leucemia siendo también mayor el porcentaje de varones. Las tasas de supervivencia a cinco años varían según el tipo de leucemia y de factores endógenos del individuo como, por ejemplo, la edad al diagnóstico (Zhang et al., 2023; Mody et al., 2008).

Leucemia Linfoblástica aguda de las células T (LLA-T)

La **leucemia linfoblástica aguda de células T** (LLA-T) es una neoplasia hematológica originada por la transformación maligna de los progenitores de células T. Durante la maduración de un linfocito T, desde un progenitor hematopoyético CD34+ hasta una célula T madura en el timo, se puede producir un arresto de dicha célula originando una leucemia. El término “agudo” hace referencia a la rápida velocidad de progresión de la enfermedad, que puede resultar fatal en pocos meses si no se recibe un tratamiento adecuado. La LLA-T se caracteriza por la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas que afectan a procesos clave como la diferenciación celular y la apoptosis. Entre las anomalías genéticas más frecuentes se incluyen translocaciones y mutaciones en genes como *NOTCH1*, *CDKN2A/B*, *PTEN*, *FBXW7* e *IL7R* que están asociadas con la resistencia al tratamiento y la progresión de la enfermedad (Karrman & Johansson, 2017; Inaba & Mullighan, 2020).

La presentación clínica de la LLA-T puede incluir hiperleucocitosis, afectación extramedular de ganglios linfáticos u otros órganos, infiltración en el sistema nervioso central y la presencia de una masa mediastínica correspondiente al timo (Redaelli et al., 2005).

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) sigue una presentación bimodal, con un primer pico durante la infancia y un segundo pico, alrededor de los 50 años. Esta enfermedad constituye la neoplasia maligna más frecuente en población pediátrica, representando la LLA-T entre el 10-15 % de los casos de LLA. En los adultos, la prevalencia de la LLA-T es mayor, representando entre el 25-30 % de los diagnósticos de LLA, con una incidencia más alta en hombres que en mujeres. De estos, los casos de LLA-T suponen algo más de 100 casos anuales en España (Patel et al., 2020).

Dado que esta enfermedad no dispone de un tratamiento específico, el abordaje terapéutico suele basarse en los protocolos establecidos para la leucemia linfoblástica aguda de células B, la forma más prevalente de esta neoplasia. Tradicionalmente, la quimioterapia intensiva y el trasplante de precursores hematopoyéticos han sido las principales estrategias terapéuticas. No obstante, los efectos adversos asociados a estas terapias como la citotoxicidad inespecífica o la enfermedad de injerto contra huésped (GvHD), han impulsado la búsqueda de nuevas terapias más seguras y específicas. En este contexto, se han desarrollado enfoques terapéuticos que aprovechan la

funcionalidad del sistema inmunitario del paciente para destruir las células malignas (Hayashi et al., 2024; Litzow & Ferrando, 2015).

A pesar de que las actuales estrategias de quimioterapia con dosis intensificadas han permitido una mejora significativa de los resultados en pacientes pediátricos, con tasas de recuperación superiores al 80 %, en los pacientes adultos el pronóstico sigue siendo desfavorable con, únicamente, un 30-40 % de los pacientes capaces de alcanzar remisión a largo plazo (Guamba Inga, 2018; Litzow & Ferrando, 2015). Esta situación se ve agravada en el contexto de la LLA-T en recaída o refractaria (R/R), donde los pacientes presentan una respuesta muy limitada a las terapias de rescate convencionales, como consecuencia de una enfermedad más agresiva, mayor carga tumoral o mecanismos moleculares de escape, fundamentalmente (Basquiera et al., 2023).

c. Alteraciones en la muerte celular programada: implicaciones terapéuticas

Apoptosis y su importancia en la homeostasis celular

La **muerte celular programada o apoptosis**, es un mecanismo fisiológico esencial para el mantenimiento de la homeostasis en los organismos pluricelulares. Este proceso permite la eliminación controlada de células dañadas y envejecidas. La apoptosis puede ser desencadenada por diferentes estímulos tanto externos como internos, incluyendo daño en el DNA o estrés oxidativo, así como por señales fisiológicas como el crecimiento tisular o el envejecimiento celular (Elmore, 2007). Existen dos vías principales: la **vía intrínseca** (o mitocondrial) y la **vía extrínseca** (o mediada por receptores de muerte) (Nelson & Cox, 2021).

La **vía extrínseca** se inicia en respuesta a estímulos extracelulares mediante la unión de ligandos específicos a receptores de muerte localizados en la membrana plasmática. Los ligandos de muerte TRAIL, FasL y TNF α (asociado a membrana) inducen la trimerización de sus receptores correspondientes, DR4 y DR5 (TRAIL), FAS/CD95 y TNFR con la posterior formación del complejo de señalización de muerte (Nelson & Cox, 2021). Este complejo recluta proteínas adaptadoras, que promueven la activación de caspasas iniciadoras, principalmente caspasa 8. Una vez activada, se inicia una cascada proteolítica que acaba con la activación de caspasas efectoras (caspasa 3 y

caspasa 7) que, finalmente, inducen los cambios responsables de la apoptosis (Ichim & Tait, 2016).

La **vía intrínseca** de la apoptosis se inicia en respuesta a señales intracelulares, como el daño en el DNA o las infecciones virales. Este proceso comienza con la permeabilización de la membrana externa mitocondrial. Las señales proapoptóticas promueven la activación de proteínas con dominio BH3, que a su vez facilitan la oligomerización de proteínas proapoptóticas BAX y BAK. Estas proteínas generan poros en la membrana mitocondrial externa, permitiendo la liberación al citoplasma de factores apoptóticos como SMAC (Second Mitochondria-derived Activator) y el citocromo c. La interacción del citocromo c con APAF1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1), induce su oligomerización y formación del apotosoma. El apotosoma recluta y activa a la caspasa-9 que a su vez activa las caspasas ejecutoras, convergiendo funcionalmente con la vía extrínseca y conduciendo finalmente a la apoptosis (Ichim & Tait, 2016).

En mamíferos, las proteínas de la familia Bcl-2, juegan un papel muy importante en el control de la vía intrínseca, controlando la permeabilidad mitocondrial y la liberación del citocromo c. Algunas de estas proteínas, como Bcl-2 o Bcl-X_L, se localizan en la membrana externa de la mitocondria e inhiben la liberación del citocromo c, actuando como agentes antiapoptóticos (Youle & Strasser, 2008). Frente a esta situación, los miméticos de BH3 representan una prometedora estrategia terapéutica al competir por los sitios de unión de las proteínas antiapoptóticas, liberando a BAX y BAK, y restaurando la vía intrínseca de la apoptosis de las células cancerosas (Townsend et al., 2021; Roberts et al., 2021).

Nuevas terapias dirigidas: inhibidores específicos

La resistencia terapéutica observada en los cánceres hematológicos frente a los tratamientos convencionales ha impulsado el desarrollo de estrategias más dirigidas. Entre ellas, destacan los inhibidores específicos diseñados para interferir selectivamente en rutas moleculares claves para la supervivencia y proliferación de las células malignas. Estas terapias dirigidas no solo permiten aumentar la eficacia del tratamiento, sino que también reducen la citotoxicidad sistémica, una de las principales limitaciones de la quimioterapia estándar (Hofmann et al., 2023).

Los **inhibidores específicos** actúan sobre dianas moleculares concretas involucradas en la fisiopatología tumoral, como proteínas reguladoras de la apoptosis o factores de señalización aberrantes. Entre sus mecanismos de acción más importantes se incluyen la inducción de la apoptosis y la inhibición de la proliferación celular. Entre los inhibidores específicos desarrollados cabe comentar los inhibidores de proteínas de la familia Bcl-2 (Kalogi et al., 2023). Entre estos inhibidores, encontramos algunos como:

Venetoclax: Inhibidor específico de Bcl-2 que ha mostrado gran eficacia clínica en la Leucemia Mieloide Aguda (LMA), Leucemia Linfocítica Crónica (LLC), Linfoma de células manto y Mieloma Múltiple (MM). No obstante, la coexpresión de otras proteínas antiapoptóticas, como Bcl-X_L y Mcl-1, también afecta a la eficacia terapéutica (Di Grande et al., 2021).

DT2216: Compuesto basado en un PROTAC (*Proteólisis Targeting Chimeric Molecule*), diseñado para generar la degradación de Bcl-X_L. Su mecanismo de acción implica el reclutamiento de la ligasa E3 VHL (*Von Hippel-Lindau*), expresada en la mayoría de las células tumorales. La interacción de DT2216 con Bcl-X_L permite su ubiquitinación, permitiendo su reconocimiento y posterior degradación por el proteasoma, favoreciendo así la inducción de apoptosis (Jaiswal et al., 2022).

ABBV-467: inhibidor potente y selectivo de Mcl-1 que ha mostrado una significativa capacidad inhibidora del crecimiento tumoral de neoplasias hematológicas en modelos *in vivo*. El bloqueo de Mcl-1, permite la liberación de BAX y BAK, restaurando la apoptosis en células tumorales dependientes de esta proteína (Yuda et al., 2023).

d. Sistema inmunitario

El sistema inmunitario comprende un conjunto de mecanismos celulares y moleculares encargados de proteger al organismo frente a agentes patógenos, como virus, bacterias y células transformadas. El sistema inmunitario se divide en dos componentes principales: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (Lanuza, 2020; González-Barros et al., 2021).

La **inmunidad innata** actúa como primera barrera de defensa del organismo, respondiendo de forma inmediata y no específica ante la presencia de patógenos (Medzhitov & Janeway, 1998; Warrington et al., 2011). Incluye barreras físicas y

químicas, como los epitelios del sistema digestivo y respiratorio, así como células inmunitarias como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (DCs) y células natural killer (NK) capaces de detectar y eliminar patógenos y células alteradas. Asimismo, el sistema de complemento, compuesto por proteínas plasmáticas, facilita la opsonización, lisis y amplificación de la respuesta inmunitaria (Dempsey et al., 2003). A pesar de que antiguamente se pensaba que este tipo de inmunidad no generaba memoria, actualmente se ha demostrado que las células del sistema inmunitario innato pueden generar un tipo de memoria inmunitaria conocida como “memoria entrenada” (Netea et al., 2011; Netea et al., 2020)

Por otro lado, la **inmunidad adquirida** constituye una segunda línea de defensa, caracterizada por su especificidad y capacidad de memoria inmunológica. Aunque su activación inicial es más lenta, permite una respuesta más eficaz frente a infecciones recurrentes o procesos tumorales. Dentro de este grupo encontramos a los linfocitos T, responsables de la respuesta celular; y a los linfocitos B, encargados de la generación de diferentes tipos de anticuerpos que componen la respuesta humoral (Medzhitov & Janeway, 1998; Dempsey et al., 2003).

Inmunovigilancia y teoría de la inmunoedición

La inmunovigilancia es la capacidad del sistema inmunitario para identificar y eliminar selectivamente células transformadas. A comienzos del siglo XX, Paul Ehrlich fue uno de los primeros investigadores en postular que el sistema inmunitario podía “vigilar” el desarrollo de tumores, previniendo su implantación y progresión (Ehrlich, 1909). En los años 50, Lewis Thomas y Frank MacFarlane Burnet, partiendo de la hipótesis anterior, propusieron que el sistema inmunitario era capaz de detectar y eliminar células cancerosas en las fases iniciales del desarrollo tumoral, sentando las bases de la teoría de la **inmunovigilancia del cáncer** (*cancer immuno surveillance*) (Burnet, 1957; Thomas, 1959; Burnet 1970; Ribatti, 2017).

Posteriormente, se amplió el concepto de inmunovigilancia hasta establecer la teoría de **inmunoedición del cáncer** (*cancer immunoediting*). Esta teoría propone un modelo de interacción entre el sistema inmunitario y las células tumorales a lo largo de tres fases: eliminación, equilibrio y escape (Dunn et al., 2002; Dunn et al., 2004; Dunn et al., 2006) Ya en el siglo XXI, se ha revisitado el modelo (Schreiber et al., 2011).

- **Eliminación:** las células inmunitarias, tanto innatas como adquiridas, reconocen y eliminan a las células tumorales en crecimiento (Vesely et al., 2011).
- **Equilibrio:** algunas células cancerosas pueden no ser eliminadas dando lugar a nuevas variantes que pueden ser más resistentes a la respuesta inmunitaria. Durante esta fase, el crecimiento tumoral queda immunológicamente controlado, pero clínicamente indetectable. Los pacientes pueden progresar hacia la eliminación completa o hacia la fase de escape (Vesely et al., 2011).
- **Escape:** las células tumorales escapan del control inmunitario, multiplicándose y generando tumores clínicamente detectables. Este proceso puede generarse como consecuencia de distintas causas como incapacidad del sistema inmunitario para reconocer a las células cancerígenas, inmunosupresión o transformación de las células cancerígenas en resistentes a la respuesta inmunitaria, entre otros (Vesely et al., 2011).

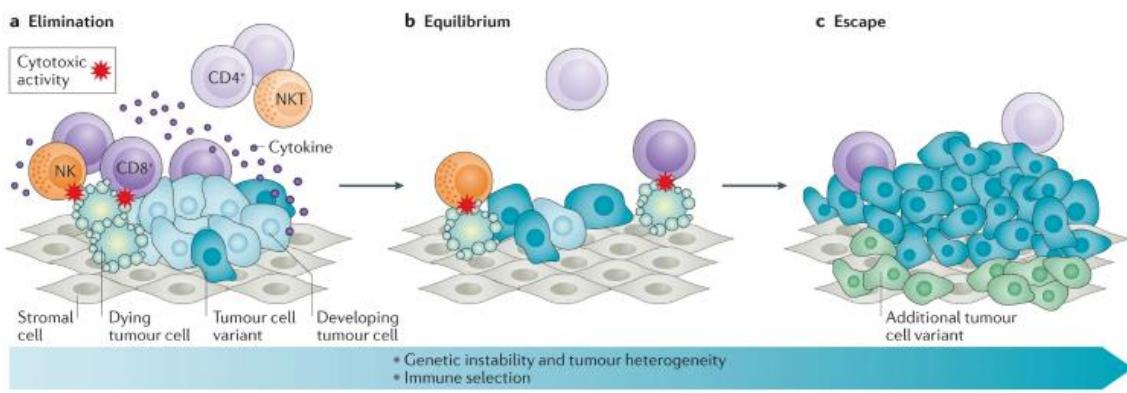


Figura 2.- Fases del proceso de inmunoedición del cáncer. (a) Eliminación de las células tumorales por parte de las células inmunitarias. **(b)** El sistema inmunitario selecciona las células tumorales capaces de resistir a la acción de las células inmunitarias, entrando en una fase de equilibrio. **(c)** El tumor escapa, comenzando una fase de expansión descontrolada (van der Burg et al. 2016).

Estrategias del tumor para evadir el sistema inmunitario

A pesar de que las actuales estrategias de inmunoterapia han obtenido resultados positivos en una parte de los pacientes, existe un porcentaje que no responden al tratamiento como consecuencia de la incapacidad del sistema inmunitario para activarse correctamente, el estado inmunodeprimido o alteraciones inmunológicas como consecuencia del cáncer. Entre los mecanismos de evasión tumoral encontramos secreción de factores inmunosupresores como prostaglandinas o IL-10, activación de células supresoras o células del sistema inmunitario que secretan citoquinas inhibidoras, disminución o pérdida de la expresión de antígenos asociados al tumor o disminución de la expresión de MHC, entre otros (Bai et al., 2020).

La disminución de la expresión de MHC es una de las estrategias de evasión de la respuesta inmunitaria más frecuente. El MHC es fundamental para que los linfocitos T CD8+ reconozcan y destruyan células tumorales. Sin embargo, cuando las células cancerígenas disminuyen la expresión de este, no pueden ser reconocidas por los linfocitos, permitiendo su crecimiento (Dhatchinamoorthy et al., 2021). Las células tumorales también pueden sobreexpresar diversas moléculas como PD-L1 o Galectina-9, que se unen a receptores inhibidores de las células T, como PD-1 o TIM, respectivamente. Estas interacciones generan inactivación, agotamiento o apoptosis de linfocitos T efectores (Yang et al., 2021).

Inmunoterapia

La inmunoterapia es una estrategia terapéutica biológica que emplea componentes del sistema inmunitario, tanto endógenos como generados en laboratorio, para potenciar, modular o restaurar su capacidad de reconocer y eliminar células tumorales. A diferencia de los tratamientos convencionales, la inmunoterapia se caracteriza por su especificidad, menor toxicidad sistémica y capacidad para generar memoria inmunológica (Waldman et al., 2020). Entre las principales estrategias se incluyen:

Anticuerpos monoclonales: Son proteínas diseñadas para reconocer antígenos específicos en la superficie de las células tumorales, facilitando su destrucción mediante la activación del complemento, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o inhibición de señales proliferativas (Paul et al., 2024).

Vacunas terapéuticas contra el cáncer: consisten, en términos generales, en la administración exógena de antígenos tumorales seleccionados, combinados con adyuvantes inmunoestimulantes que favorecen la activación de las células dendríticas. Su finalidad es inducir una respuesta inmunitaria adaptativa específica frente a los antígenos tumorales (Saxena et al., 2021).

Inhibidores de puntos de control inmunológico: Son moléculas que bloquean receptores inhibidores, como PD-1 o CTLA-4, impidiendo la inactivación de los linfocitos T y restaurando la citotoxicidad frente a células tumorales (Waldman et al., 2020).

Terapia celular: Basada en el uso de células inmunológicas del paciente activadas o modificadas en laboratorio como herramienta de ataque contra las células cancerosas. Dentro de las terapias celulares se pueden distinguir los siguientes tipos: terapia de células T con receptores de antígenos químéricos (CAR-T), terapia con linfocitos infiltrantes del tumor (TILs), terapia con receptores de células T (TCR) modificados y terapia con linfocitos citolíticos (células NK) (Wellhausen et al., 2024).

Entre las principales ventajas de la inmunoterapia destaca su capacidad para reconocer, específicamente, las células anormales y la existencia de memoria inmunológica, lo que permite una respuesta más duradera. No obstante, la activación del sistema inmunitario puede desencadenar efectos adversos asociados como el síndrome de liberación de citoquinas o problemas de autoinmunidad, entre otros (Waldman et al., 2020).

e. CAR-T

Los **receptores de antígeno químérico** (CAR, *Chimeric Antigen Receptor*, por sus siglas en inglés) son receptores de señalización unidos a la membrana celular. Los CAR están compuestos por un **dominio de unión al ligando**, responsable de reconocer y unirse al antígeno específico; un **dominio espaciador**, que determina la longitud y el alcance externo del receptor, influyendo en el lugar y la frecuencia de la unión; un **dominio transmembrana**, encargado de anclar el CAR a la membrana celular; y **endodominiós** o dominios citoplasmáticos, esenciales para desencadenar la cascada de señalización intracelular tras el reconocimiento del ligando (Milone et al., 2009; Park & Brentjens, 2015).

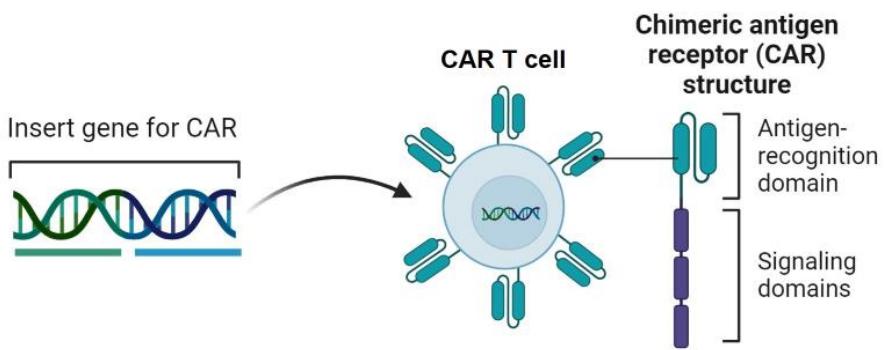


Figura 3.- Estructura del CAR-T. (Liu et al., 2024)

La **terapia CAR-T** es una inmunoterapia innovadora que permite modificar genéticamente los linfocitos T de un paciente para que puedan reconocer y destruir células cancerosas. El proceso de generación de los CAR-T es complejo: consiste en extraer los linfocitos T del paciente, modificarlos en el laboratorio para que expresen receptores químéricos específicos capaces de identificar antígenos presentes en las células tumorales y, posteriormente, reintroducirlos en el paciente (Kong et al., 2024; Sánchez-Martínez et al., 2019). Aunque la terapia CAR-T ha demostrado resultados prometedores, especialmente, en la LLA-B en recaída o refractaria, su aplicación a la LLA-T presenta diferentes desafíos (Mamonkin et al., 2015; Maude et al., 2014; Cooper et al., 2018).

Uno de los principales obstáculos en el desarrollo de terapias CAR-T para la leucemia linfoblástica aguda de células T es la expresión compartida de antígenos entre las células T normales y las células tumorales. Esta falta de especificidad puede generar el fratricidio de las células CAR-T, es decir, la destrucción de las propias células CAR-T, así como la aplasia de los linfocitos T normales, lo cual compromete gravemente la inmunidad del paciente (Cooper et al., 2018; Alcantara et al., 2018).

CD1aCAR-T

En el contexto expuesto en el apartado anterior, el antígeno CD1a ha surgido como una diana terapéutica prometedora. CD1a es una molécula presentadora de lípidos que se expresa de forma restringida en la leucemia linfoblástica aguda de las células T cortical (coT-ALL), manteniéndose incluso en recaídas y no encontrándose en linfocitos T maduros u otros tejidos periféricos. (Sánchez-Martínez et al., 2019). Cabe destacar que, actualmente hay abierto un ensayo clínico Fase Ib *first-in-human* (NCT05679895) en los hospitales Clínic y Sant Joan de Déu de Barcelona, donde emplean CD1aCAR-T.

Resistencias a la terapia CAR-T

Uno de los principales desafíos de las terapias con células CAR-T es la aparición de resistencias que pueden afectar a la eficacia del tratamiento. Los mecanismos biológicos responsables de las resistencias se clasifican en: mecanismos relacionados con las células T (como fallos en la elaboración de los CAR-T); características intrínsecas del tumor (como la pérdida de expresión del antígeno diana); y mecanismos inmunosupresores relacionados con el TME (como la presencia de células inmunosupresoras) (Majzner & Mackall, 2018).

A continuación, se describen en mayor profundidad los mecanismos implicados:

Disfunción de las células CAR-T: uno de los factores que determina la eficacia a largo plazo del tratamiento es la persistencia y funcionalidad de las células CAR-T. Estas propiedades dependen, en gran medida, del estado de diferenciación de los linfocitos T. Los linfocitos altamente diferenciados se caracterizan por presentar una menor funcionalidad, menor capacidad de expansión y mayor susceptibilidad al agotamiento. Las células T agotadas se caracterizan por expresar niveles elevados de receptores inhibidores, como PD-1, y menor capacidad de secreción de citocinas, lo que disminuye su actividad antitumoral. Para superar esta disfunción, se están investigando estrategias como el bloqueo de puntos de control inmunitario (como, por ejemplo, anti-PD-1) o el uso de células T alogénicas procedentes de donantes sanos (Majzner & Mackall, 2018).

Resistencia tumoral: las células tumorales pueden evadir su destrucción con la pérdida de la expresión del antígeno diana, impidiendo su reconocimiento y destrucción. Algunas estrategias para superar el escape antigénico son las terapias combinadas que incluyen el uso de CAR-T dirigidos hacia múltiples antígenos o el uso de CAR bicistrónicos, capaces de reconocer antígenos diferentes (Ruembla et al., 2023).

Microambiente tumoral: el TME es un factor esencial en la eficacia del tratamiento, pudiendo plantear desafíos en la infiltración de los CAR-T o induciendo disfunción a los linfocitos T. Para contrarrestar la inmunosupresión se están investigando diferentes estrategias como la adición de IL-7 o IL-15, que promueven la expansión y activación de los linfocitos T citotóxicos (Kankeu et al., 2022).

4. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

a. Antecedentes

La inmunoterapia ha emergido como una estrategia terapéutica prometedora en el tratamiento del cáncer, gracias a su potencial de aprovechar el sistema inmunitario como herramienta para eliminar las células tumorales. En los últimos años, ha cobrado especial relevancia la inmunoterapia celular adoptiva basada en receptores de antígenos quiméricos (CAR), la cual consiste en la modificación genética de linfocitos T con el objetivo de redirigirlos para que reconozcan y destruyan las células tumorales que expresan antígenos específicos.

Las terapias CAR-T dirigidas contra antígenos como CD19 o CD22 han representado un avance significativo en el tratamiento de neoplasias malignas de las células B, evidenciando tasas de respuesta significativamente más elevadas en pacientes refractarios a tratamientos convencionales o tras recaída (Maude et al., 2014). Uno de los principales desafíos de esta estrategia radica en la respuesta a largo plazo, debido a que aproximadamente el 50 % de los pacientes tratados con CAR-T experimenta recaídas (Gardner et al., 2017; Maude et al., 2018). Factores como la baja persistencia de las células CAR-T en el organismo o la pérdida de la expresión de la diana antigénica se consideran factores contribuyentes de este proceso. A pesar de ello, existen incógnitas respecto a las razones que explican la variabilidad en eficacia del tratamiento entre los pacientes. Ante esta problemática, una alternativa para mejorar la eficiencia de la respuesta terapéutica es la combinación de células CAR-T con inhibidores específicos de la muerte celular.

Asimismo, se están explorando nuevas dianas terapéuticas específicas para el tratamiento de neoplasias de células T. Existen algunos abordajes frente a antígenos pan-T como CD5 o CD7, aunque presentan importantes retos a solucionar como el fraticidio (implicando la modificación de las células T efectoras) y la aplasia de las células T sanas (lo que suele implicar un trasplante de médula ósea) (Png et al., 2017; Gomes-Silva et al., 2017). En este contexto, se describió un CAR específico frente a CD1a (en ensayo clínico NCT05679895), que ha demostrado poseer gran citotoxicidad específica *in vitro* y actividad antileucémica *in vivo* en modelos de xenoinjerto de LLA-T cortical (coT-ALL), que representa un subtipo de LL-A que engloba aproximadamente el 40 % de los casos.

El CD1a se expresa exclusivamente en la coT-ALL y se mantiene en la recaída, limitando el riesgo de toxicidad fuera del tumor. Asimismo, los CAR-T dirigidos frente a CD1a son resistentes al fraticidio, tienen persistencia prolongada y responden a antígenos virales (Sánchez-Martínez et al., 2019).

Cabe destacar que, en el campo de los CAR-T no existe demasiado conocimiento de cómo la resistencia a la muerte celular puede influir en la resistencia al tratamiento o la persistencia de este, siendo necesario profundizar en los estudios de la muerte inducida por células CAR-T y su combinación con fármacos (Pourzia et al., 2023). Sin embargo, dentro del campo de la terapia celular sin modificar genéticamente, nuestro grupo describió que los linfocitos T citotóxicos (CTLs) o células NKs activadas eran capaces de superar el bloqueo de la apoptosis (Pardo et al., 2008; Sánchez-Martínez et al., 2015). Si bien es cierto, que dependiendo de la relación efecto:diana, puede ser necesario el empleo de fármacos como terapia combinada para superar la resistencia a la muerte (Pan et al., 2022).

b. Hipótesis y objetivos

Partiendo de lo expuesto en el apartado anterior, nuestra **hipótesis** propone que el empleo de inhibidores específicos de proteínas que bloquean la muerte celular a dosis bajas en células tumorales resistentes a la apoptosis sensibiliza a la acción de las células CD1aCAR-T, mejorando la eficacia.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Generar células Jurkat que sobreexpresen proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2: Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 y Bcl-A1.
2. Analizar la resistencia de las células Jurkat que sobreexpresan proteínas de la familia Bcl-2: Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 y Bcl-A1 a drogas clásicas de quimioterapia.
3. Estudiar la sensibilidad de las células Jurkat que sobreexpresan proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2: Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 y Bcl-A1 a inhibidores específicos.
4. Analizar la capacidad citotóxica de las células CD1aCAR-T frente a células Jurkat que sobreexpresan Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 y Bcl-A1
5. Comprobar la capacidad de sensibilización de los inhibidores específicos a la actividad citotóxica de las células CD1aCAR-T.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

a. Líneas celulares

Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares

Se emplearon las líneas de LLA-T Jurkat (ACC 282), MOLT-4 (ATCC CRL-1552) del banco de células DSMZ, la línea celular HPB-ALL (cedida por la Dr. Carmen Ruiz de la Universidad de Granada) y la línea de LLA-B, NALM6 (CRL-3273). Además, se generaron las líneas celulares mutantes a partir de Jurkat que sobreexpresan proteínas antiapoptóticas (Bcl-X_L, Bcl-2, Bcl-A1 y Mcl-1) y su control (mCherry). Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific), 1 % de Glutamax, y 1 % de antibióticos (penicilina/estreptomicina) (Gibco, Thermo Fisher Scientific). Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera con 5 % de CO₂. Las células fueron subcultivadas cada 2-3 días, manteniendo una densidad celular de aproximadamente 4×10⁵ células/mL.

Para conservar un stock de líneas celulares, se recogió medio de los cultivos y se centrifugó a 524 g durante 5 minutos a 22 °C. A continuación, se retiró 1 ml de sobrenadante y se llevó a congelación para la posterior detección de *Mycoplasma*. El pellet celular resultante de la centrifugación se resuspendió en 1 mL de FBS decomplementado y suplementado con 10 % de DMSO por cada criotubo congelado. Finalmente, los criotubos fueron almacenados en ultracongelación en un tanque de nitrógeno líquido.

Plásmidos

Los plásmidos necesarios para la generación de los vectores virales fueron empleados para transformar bacterias *Escherichia coli* mediante transformación por choque térmico a 42 °C. Posteriormente, las bacterias transformadas se cultivaron en medio selectivo e incubaron durante 16 horas (*overnight*) a 37 °C con agitación. Los plásmidos fueron purificados mediante la técnica Maxiprep utilizando un kit comercial de Invitrogen (by Thermo Fisher Scientific). Para ello, las bacterias fueron centrifugadas, lisadas, y el DNA plasmídico resultante fue purificado por adsorción a una columna de sílice. Posteriormente la pureza y concentración del DNA obtenido se evaluó por

espectofotometría (Nanodrop-100 perteneciente a la unidad de Secuenciación y Genómica Funcional del CIBA), almacenando los plásmidos obtenidos en alícuotas a una concentración de 2 µg/µL a una temperatura de -20 °C hasta su uso.

Cabe señalar que la construcción genética empleada se fundamenta en un plásmido pCCL, un vector de origen lentiviral ampliamente utilizado para la introducción estable de genes. En el plásmido se insertaron proteínas de interés, bajo el promotor EF1a, junto con una secuencia T2A y la proteína fluorescente mCherry. La secuencia T2A permite la expresión simultánea de múltiples proteínas a partir de un único transcripto de RNA mensajero. Por su parte, la proteína mCherry actúa como marcador fluorescente, permitiendo realizar el seguimiento de la expresión genérica. Esta estrategia permite tanto la visualización de la eficiencia de la transducción como asegurar la coexpresión de los genes de interés en las células diana.

Generación de lentivirus

Los lentivirus fueron generados mediante transfección de células HEK 293T con los plásmidos de interés, junto con los plásmidos auxiliares necesarios (VSV-G como plásmido de envoltura, y RRE y REV para el empaquetamiento) y polietilenimina (PEI), como agente de transfección, debido a que facilita la entrada del ADN plasmídico gracias a la formación de complejos electrostáticos que favorecen la internalización.

El objetivo de la transfección es permitir la expresión transitoria de los elementos genéticos requeridos para la generación de partículas virales competentes. Además, la transfección se realiza sobre la línea celular HEK 293T debido a su gran eficiencia de transfección, así como por su capacidad para producir niveles elevados de proteínas recombinantes.

Transcurridas 72 horas desde la transfección, los sobrenadantes virales fueron recolectados, filtrados a través de una membrana 0,45 µm de diámetro y almacenados en congelación a -80 °C para su posterior uso.

Obtención de las líneas celulares resistentes a la apoptosis

Para la generación de las diferentes líneas celulares Jurkat que sobreexpresaran proteínas antiapoptóticas (Jurkat Bcl-X_L, Bcl-2, Bcl-A1 y Mcl-1), se ajustó la concentración de las células Jurkat WT a 1×10^6 células/ml en medio RPMI-1640 completo, para garantizar un entorno óptimo durante la transfección. Posteriormente, se dispensaron 300 µL de la

suspensión celular en cada pocillo de una placa de 24 pocillos, lo que corresponde a 300.000 células por pocillo. Tras el cultivo de las células, se añadieron 300 μ L de la suspensión viral correspondiente (lentivirus con el gen de interés) a cada pocillo, obteniendo un volumen final de 600 μ L por pocillo. Para favorecer la eficiencia de la transducción, se suplementó con Polibreno hasta alcanzar una concentración final de 8 μ g/mL.

El Polibreno actúa disminuyendo la carga electrostática entre las partículas virales y la membrana celular, facilitando así la entrada del virus. Posteriormente, la placa se centrifugó a 800 g durante 30 minutos a 32 °C. Este paso, conocido como *spinfection*, incrementa la interacción entre las células y las partículas virales, mejorando la eficiencia de transducción. Finalizada la centrifugación, la placa se incubó a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 24 horas para permitir la integración del material genético en las células.

Tras la incubación inicial, se añadió nuevamente 300 μ L de la suspensión viral a cada pocillo, junto con Polibreno a la misma concentración final (8 μ g/mL), para realizar un segundo ciclo de transducción. A continuación, se repitió la centrifugación a 800 g durante 30 minutos a 32 °C y se dejó incubar la placa durante otras 24 horas bajo las mismas condiciones de cultivo (37 °C y 5 % de CO₂). El objetivo de este segundo ciclo es incrementar la probabilidad de que las células integren el vector viral, asegurando una mayor eficiencia y uniformidad en la expresión del gen de interés. Transcurridas 48 horas desde el inicio de la transfección, se realizó un análisis mediante citometría de flujo para comprobar la eficiencia de la transfección. La detección se realizó analizando la fluorescencia emitida por RFP (*red fluorescent protein*) emitida por el marcador reporter incluido en el vector lentiviral. Este marcador permite identificar las células que han integrado el material genético y expresan la proteína de interés.

Una vez confirmada la positividad de la transfección, las células fueron sometidas a un proceso de selección mediante *cell sorting* utilizando un citómetro de flujo con capacidad de separación celular (Citómetro Separador SONY SH800S) perteneciente a la unidad de Separación celular y Citometría del CIBA. Este procedimiento permite aislar exclusivamente las células que presentan fluorescencia en canal de 584 nm, garantizando así la pureza de la población celular transfectada. Posteriormente, las células obtenidas tras el *sorting* fueron cultivadas en medio RPMI-1640 completo para su expansión. Durante los días siguientes, se analizó el crecimiento celular y se realizaron pases sucesivos para alcanzar la cantidad de células necesaria para los ensayos posteriores.

Una vez obtenida una cantidad suficiente de células, se procedió a comprobar la expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Mcl-1, Bcl-X_L y Bcl-A1 mediante análisis de *Western Blot* (ver sección 5b.). Para ello, se extrajo la proteína total de cada línea celular, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con 10 % SDS (SDS-PAGE) y, posteriormente, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa o PVDF. La detección se llevó a cabo utilizando anticuerpos específicos para cada proteína de interés, así como un control de carga (β -actina) para asegurar la normalización de los resultados.

Finalmente, tras confirmar la expresión de las proteínas mediante *Western Blot*, las líneas celulares generadas quedaron disponibles para los ensayos funcionales posteriores.

b. Análisis de la expresión de proteínas antiapoptóticas mediante Western-Blot

Obtención de los lisados celulares

Para analizar la sobreexpresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-X_L, Bcl-2, Bcl-A1 y Mcl-1, se generaron lisados celulares. En primer lugar, se cuantificaron las células cultivadas y se recogieron 3×10^6 células por muestra en tubos Falcon de 15 mL. Las células se centrifugaron a 330 g durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1mL de PBS. Esta suspensión se transfirió a tubos eppendorf y se volvió a centrifugar a 330 g durante 5 minutos a 4 °C. Tras retirar el sobrenadante, los pellets se resuspendieron en 60 μ L de tampón RIPA 1x y se incubaron durante 15 minutos en hielo, agitándose con un vórtex cada 3-5 minutos. Posteriormente, se realizó una sonicación de las muestras, seguida de una centrifugación a máxima velocidad durante 5 minutos. Finalmente, se recogieron y se congelaron los sobrenadantes a -20 °C.

Cuantificación de proteínas en los extractos celulares

Con el objetivo de cargar la misma cantidad de proteína en cada pocillo durante la electroforesis posterior, fue necesario determinar la cantidad de proteína total en cada uno de los lisados. La concentración de proteína se determinó mediante el ensayo colorimétrico de Bradford. Para ello, se preparó una curva estándar con albúmina sérica bovina (BSA) en un rango de concentraciones conocido (0,125 – 1,5 mg/mL). De cada

una de las muestras de lisados se realizaron diluciones 1:5 y 1:10. Posteriormente, se añadió reactivo Bradford (que contiene azul de Coomassie G-250) tanto a las muestras como a la curva control. Tras una breve incubación, se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro BIOTEK perteneciente al servicio de proteómica del CIBA. Finalmente, la concentración proteica en los lisados se calculó mediante la sustitución de los valores de absorbancia en la ecuación de la curva estándar obtenida.

Separación de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y transferencia a membranas PVDF

Una vez añadido el Buffer de carga 1x, las muestras de lisados celulares se calentaron a 95 °C durante 10 minutos en bloque térmico sin agitación, con el objetivo de favorecer la desnaturalización de las proteínas, y se sometieron a un pulso mediante vórtex.

Por otro lado, se prepararon los geles de poliacrilamida formados por un gel concentrador (*stacking gel*) y un gel separador (*resolving gel*) siguiendo el protocolo indicado por el preparado comercial (Bio-Rad Laboratories). Se cogió la cantidad de muestra calculada para cargar 30 µg en los geles, habiendo colocado previamente estos en las cubetas de electroforesis llenas de Running Buffer. La electroforesis se realizó durante 35-40 minutos a 200V.

Una vez finalizada la electroforesis se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana. La electrotransferencia se realizó mediante la superposición sucesiva de esponja – membrana – gel – esponja, previamente humedecidos en Transfer Buffer (Bio-Rad Laboratories), que se introdujo en un equipo de transferencia (Bio-Rad Laboratories) durante 7 minutos.

Posteriormente, la electrotransferencia, se corroboró la correcta realización de esta mediante Rojo Ponceau. Tras esto, se bloquearon las membranas mediante su introducción en cubetas que contenían una disolución de leche en polvo desnatada al 5 % durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente.

Análisis de la expresión de las proteínas antiapoptóticas por Western-Blot

Tras el bloqueo, las membranas se lavaron tres veces con PBS 0,1 % Tween. A continuación, se añadió el anticuerpo primario correspondiente (dilución 1:1000) y se incubaron a 4 °C con agitación durante toda la noche.

Al día siguiente, se recuperó el anticuerpo primario y las membranas se lavaron

nuevamente tres veces con PBS 0,1 % Tween. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario (dilución 1:10000) 1 hora en agitación a temperatura ambiente.

Tras la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas se lavaron tres veces con PBS 0,1 % Tween. Finalmente, se aplicó reactivo de revelado (*Pierce™ ECL Western Blotting Substrate*, Thermo Fisher Scientific) a las membranas y se colocaron en fundas transparentes para su revelado. Como control de carga se empleó β-actina.

c. Generación de CAR-T a partir de sangre periférica.

Extracción de PBMCs

Las muestras de sangre (*leucopacks*), procedentes de donantes sanos, fueron proporcionadas por el Banco de Sangre y Tejidos de Aragón. Para la extracción de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se siguió el siguiente protocolo:

En un tubo Falcon de 50 mL, se realizó una dilución 1:5 mediante la adición de 10 mL de sangre a 40 mL de PBS. Tras asegurar la homogeneidad de la mezcla mediante resuspensión, se extrajeron 25 mL de esta dilución, los cuales fueron añadidos a un nuevo Falcon que contenía 25 mL adicionales de PBS, obteniendo una dilución final 1:10.

Posteriormente, se distribuyeron 25 mL de la dilución 1:10 sobre 15 mL de Ficoll (Histopaque, Sigma-Aldrich) en dos tubos Falcon de 50 mL, añadiendo la suspensión lentamente para evitar la mezcla de las fases. A continuación, los tubos se centrifugaron a 524 g durante 30 minutos, con aceleración a nivel 3 y sin freno (desaceleración 0).

Tras la centrifugación, se recogió el anillo blanco (anillo de células mononucleares) localizado en la interfase entre el plasma y el Ficoll, y se añadió en un Falcon de 15 mL. Se incorporó PBS hasta completar el volumen total del Falcon y se volvió a centrifugar, esta vez a máxima aceleración y desaceleración. El lavado se repitió tantas veces como fue necesario hasta conseguir que el sobrenadante resultante fuese transparente.

Finalmente, el pellet se resuspendió y se realizó el recuento celular con una cámara de Neubauer bajo microscopía óptica. Tras la cuantificación de los linfocitos, se congelaron según el procedimiento descrito para la congelación de líneas celulares (ver sección 5.a), garantizando un mínimo de 10 millones de células por vial.

Plásmidos y vectores virales

Una vez obtenido el plásmido de interés, se procedió con la producción de partículas virales para la transducción de células T humanas. Para ello, se utilizaron células HEK 293T, cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) completo.

Las células se mantuvieron en cultivo, realizando pases cada 2-3 días para favorecer su expansión. Al alcanzar la densidad celular óptima para la producción viral, se generaron lentivirus de 3^a generación. Para ello, se llevó a cabo la transfección con el plásmido (pCCL) codificante para el CD1aCAR-T, junto con los plásmidos auxiliares necesarios: VSV-G como plásmido de envoltura, y RRE y REV como plásmidos de empaquetamiento, así como con PEI, para generar partículas virales.

El sobrenadante del cultivo celular se recogió a las 48 y 72 horas tras la transfección, se centrifugó a 524 g durante 5 minutos y, posteriormente, se filtró a través de una membrana de 0,45 µm de diámetro para eliminar posibles restos celulares.

Seguidamente el virus fue concentrado mediante ultracentrifugación a 121580 g durante 2 horas y 30 minutos a 4 °C utilizando un rotor AH-629. El pellet viral obtenido se resuspendió en 600 µL de medio DMEM completo y dividido en alícuotas de 100 µL, que se almacenaron a -80 °C hasta su uso para la transducción de células T humanas.

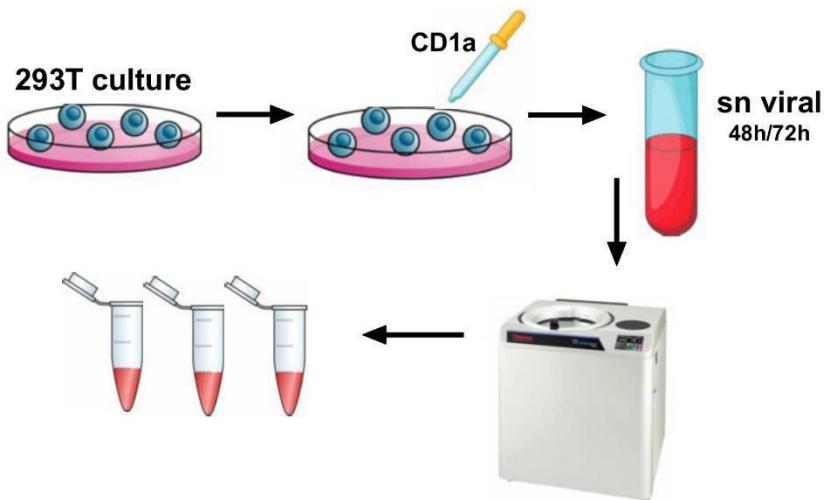


Figura 4.- Producción vector viral. (A) Cultivo y expansión de células HEK 293T. **(B)** Transducción con el plásmido de interés y plásmidos auxiliares. **(C)** Recogida sobrenadante viral a las 24 y 48 h. **(D)** Ultracentrifugación. **(E)** Congelación del vector viral a -80 °C.

Titulación viral

Para poder determinar la titulación viral se sembraron $2,5 \times 10^5$ células en 2 mL de medio en cada pocillo de una placa de 6 pocillos. Al día siguiente, se realizó el recuento celular en uno de los pocillos destinados para dicho fin (pocillo de conteo). A partir del virus obtenido según el protocolo explicado en el apartado anterior (“*Plásmidos y vectores virales*”), se prepararon diluciones seriadas de 1:10, 1:100 y 1:1000. A cada pocillo se añadieron 50 μ L de la dilución correspondiente y, posteriormente, la placa se incubó durante 48 horas.

Transcurrido este tiempo, se evaluó el título viral mediante citometría de flujo, analizando el porcentaje de células que expresaban el gen reportero. El título viral (TU/mL) se calculó a partir de la fórmula:

$$\text{TU/mL} = \text{Número contado de células a día 1} \times \text{Porcentaje de fluorescencia (De la dilución que esté entre el 3 y 30 \%)} / \mu\text{l de volumen virus añadido} \times 1000$$

En nuestro caso, en la dilución 1:100 se obtuvo un 25,47 % de fluorescencia que hizo que la titulación viral fuese de $2,09 \times 10^8$ TU/mL.

Activación y transfección de los linfocitos T para la generación de células CAR-T

La generación de células CAR-T dirigidas frente a CD1a se realizó a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Para activar los linfocitos T, se empleó una placa de 24 pocillos sin tratar, a la que se añadieron 500 μ L de agua destilada MiliQ con anticuerpos anti-CD3 (clon OKT3, BD Biosciences) y anti-CD28 (clon CD28.2, BD Biosciences), a una concentración final de 1 μ g/mL. La placa se incubó durante 4 horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo, la solución de anticuerpos fue reemplazada por 1 mL de RPMI-1640 completo, manteniéndose 30 minutos en incubación a 37 °C.

Simultáneamente, los PBMCs previamente congelados, fueron descongelados, lavados con 10 mL de RPMI completo y centrifugados (524 g, 5 minutos a temperatura ambiente). El pellet se resuspendió en 1 mL de medio y se cuantificaron las células mediante una cámara de Neubauer. Posteriormente, las células fueron llevadas a 1×10^6 células/mL; en este experimento, se prepararon 6 millones de células en 6 mL de medio completo. A continuación, se añadió 1 mL de RPMI fresco en cada pocillo activado y 1 mL de la suspensión celular, obteniéndose una concentración final de $0,5 \times 10^6$ células/mL por

pocillo. La placa se incubó durante 24 horas a 37 °C en atmósfera húmeda con 5 % de CO₂. Al día siguiente, se añadieron las citoquinas IL-7 e IL-15 (Miltenyi Biotec), a una concentración final de 10 ng/mL. Tras la adición, la placa se incubó durante 24 h más.

Transcurridas las 24 h, se procedió a la transducción de los linfocitos T con el vector viral codificante para un receptor quimérico de antígeno (CAR) específico frente a CD1a; para ello, se recogió la suspensión celular y se centrifugó a 524 g durante 5 minutos. Tras resuspender el pellet resultante, se realizó un nuevo conteo celular y se sembraron 1×10^6 células en 1 mL de medio completo en una placa de 24 pocillos tratada. En nuestro caso, como la transducción se realizó en la mitad de las células, se emplearon dos pocillos. Sobre uno de los pocillos, se añadió 50 µL de virus, que correspondía a una MOI de 10, calculada a partir de la transducción de 1×10^6 células con un virus con una titulación de $2,09 \times 10^8$ UT/mL. Con la placa apoyada en la cabina, se distribuyó uniformemente mediante movimientos lentos de la placa en varias direcciones y se volvió a introducir la placa en el incubador.

Caracterización de la transducción

La eficiencia de transducción de los linfocitos T se evaluó mediante citometría de flujo, analizando la expresión del receptor de antígeno quimérico (CAR). En todas las transducciones realizadas, la eficiencia de la transducción fue superior al 40 %.

Adicionalmente, se verificó la expresión para el fragmento variable de cadena única (scFv, single-chain variable fragment). El scFv es la región del CAR responsable del reconocimiento específico del antígeno tumoral. Por tanto, la comprobación de su expresión permite validar la correcta construcción del CAR así como correlacionar su expresión con la actividad antitumoral del CD1aCAR-T.

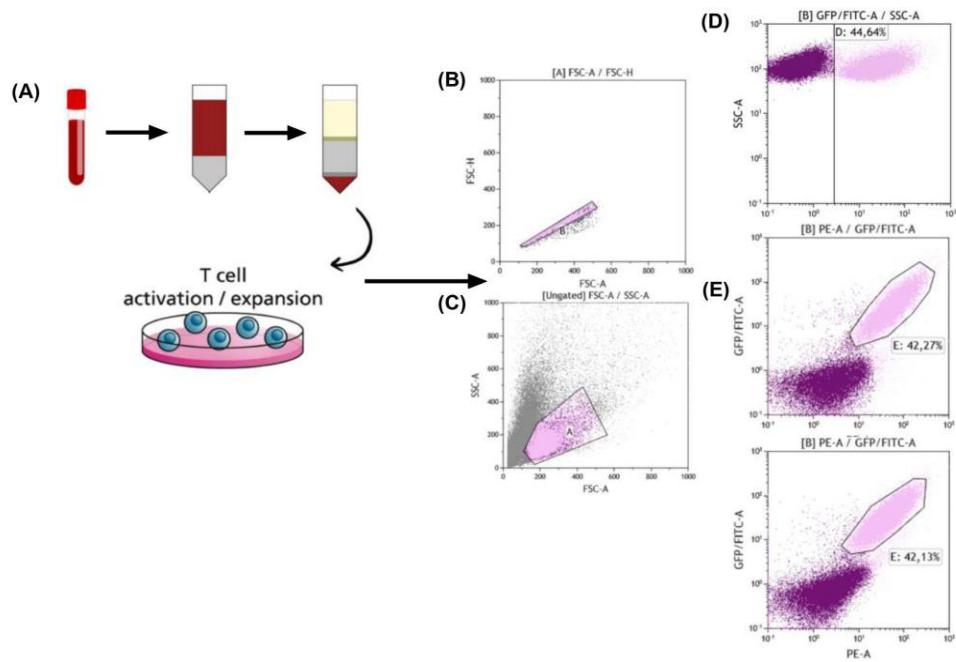


Figura 5.- Producción y caracterización de CD1aCAR-T. (A) Obtención de PBMCs. (B) Selección de la población de linfocitos por tamaño y granularidad. (C) Gating de singletes. (D) Análisis de la expresión de GFP en PBMCs tras transfección. (E) Análisis de la expresión de CAR detectada mediante anticuerpos específicos frente al scFv murino (arriba) y humano (abajo).

d. Evaluación de la Viabilidad Celular

La evaluación de la viabilidad celular en los ensayos de citotoxicidad se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Para ello, las células fueron previamente teñidas con 7-amino-actinomicina D (7-AAD), un colorante fluorescente que no atraviesa las membranas celulares intactas, permitiendo la identificación de células no viables, principalmente células necróticas y apoptóticas tardías.

Asimismo, también se empleó Anexina-V para la detección de las células en apoptosis temprana. La Anexina-V se une específicamente a la fosfatidilserina (PS), fosfolípido que normalmente se localiza en el interior de la membrana pero que se externaliza en las primeras fases de la apoptosis. Para esta tinción, las células fueron incubadas en Anexin V Binding Buffer (ABB Buffer), una solución tampón que proporciona las condiciones iónicas adecuadas para que la Anexina-V se une de manera específica y estable a la fosfatidilserina expuesta. Por tanto, la utilización de ABB Buffer resulta esencial para garantizar la fiabilidad y reproducibilidad del análisis mediante citometría de flujo.

6. RESULTADOS

a. Generación de células Jurkat resistentes a la apoptosis

Análisis de la transfección mediante citometría de flujo

Siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5.a (“*Obtención de líneas celulares resistentes a la apoptosis*”) se procedió a la transfección de las células Jurkat WT. Con el objetivo de verificar la eficiencia del proceso, se analizó la fluorescencia de las células mediante citometría de flujo. Las células transfectadas mostraron señal en el canal correspondiente a mCherry (fluorescencia roja), como se muestra en la Figura 6.

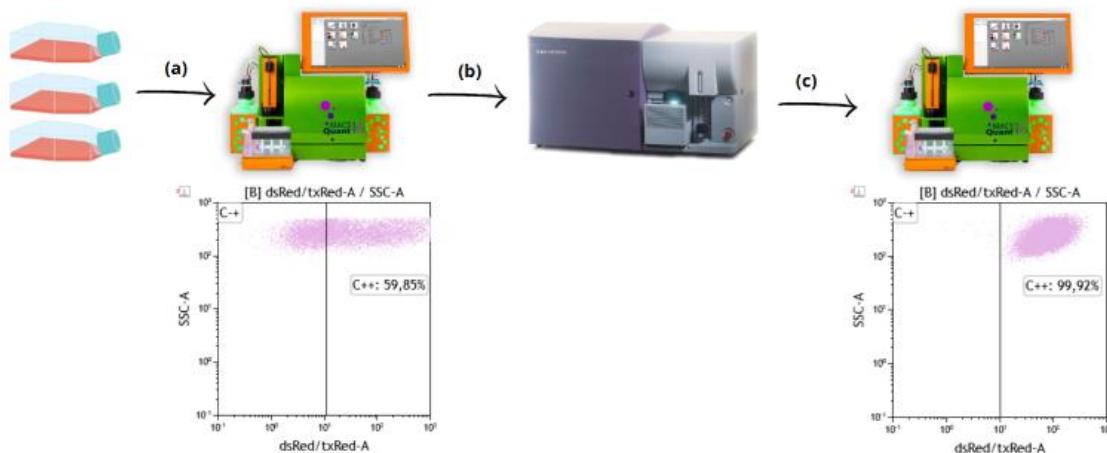


Figura 6.- Generación de células Jurkat resistentes a la apoptosis. (A) Evaluación de la eficacia de la transfección por citometría de flujo. (B) Selección por cell sorting de las células que emitían fluorescencia roja. (C) Valoración de la eficacia del proceso de selección celular.

No obstante, dado que la transfección no fue uniforme en toda la población celular, se llevó a cabo una etapa de selección de las células positivas mediante *cell sorting*, basada en la detección de mCherry. Esta selección fue realizada con el Citómetro Separador SONY SH800S, perteneciente al servicio de Separación celular y Citometría del CIBA. Tras esta etapa, se analizó nuevamente la población celular, confirmando la homogeneidad de la señal fluorescente en el conjunto de células seleccionadas (Figura 7).

En este experimento, se introdujeron en las células Jurkat diferentes proteínas antiapoptóticas pertenecientes a la familia Bcl-2: concretamente Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-A1 y Mcl-1. Estas proteínas desempeñan un papel crucial en el bloqueo de la vía intrínseca de la apoptosis. En particular, Bcl-2, Bcl-X_L y Mcl-1 son ampliamente conocidas por su capacidad para bloquear la liberación del citocromo c desde las mitocondrias. Por su parte, Bcl-A1, aunque tiene una expresión más reducida, desarrolla un papel clave en la supervivencia de las células inmunitarias, especialmente en contextos inflamatorios. La evaluación funcional de estas proteínas permite valorar su capacidad protectora frente a estímulos apoptóticos.

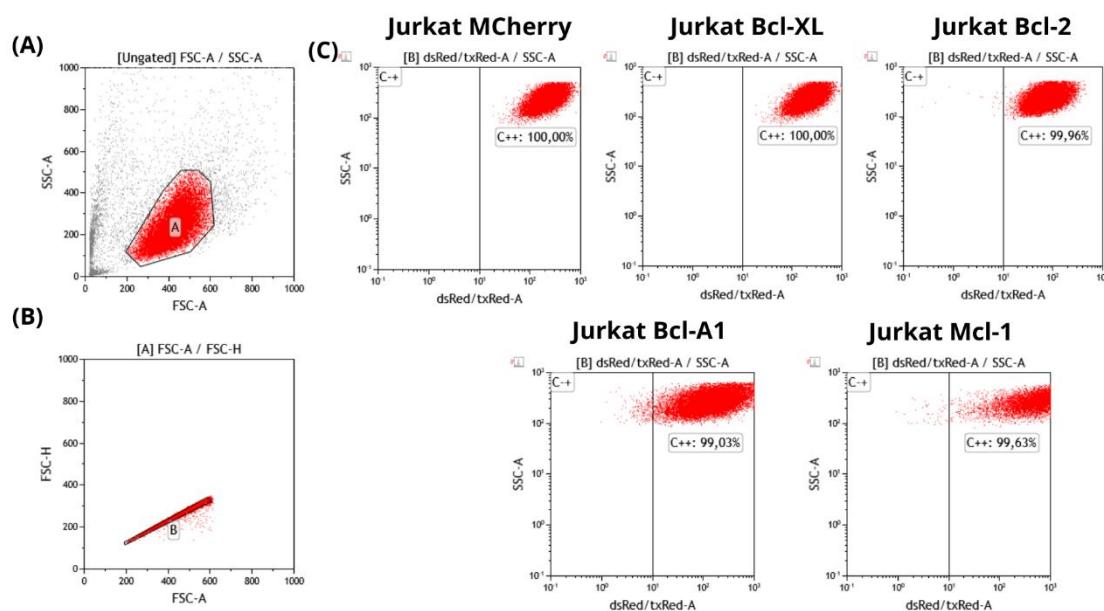


Figura 7.- Análisis por citometría de flujo de células Jurkat transfectadas y seleccionadas. **(A)** Diagrama FSC-A vs SSC-A para la selección de células vivas basándose en su tamaño y complejidad interna. **(B)** Diagrama FSC-A vs FSC-H utilizado para excluir dobles o agregados celulares, seleccionando únicamente células individuales (singlets). **(C)** Diagramas de fluorescencia en canal rojo (dsRed/tXRed-A) correspondientes a distintas líneas Jurkat transfectadas con mCherry (vector control), Bcl-X_L, Bcl-2, Bcl-A1 y Mcl-1. La población positiva (C++) representa células con expresión estable del marcador fluorescente.

Es importante señalar que, para el análisis por citometría de flujo, se seleccionó exclusivamente la población de células vivas. Esta decisión se fundamenta en que el objetivo principal del estudio es determinar la eficiencia de la transfección, lo cual requiere que la fluorescencia observada proceda únicamente de células vivas. La inclusión de células muertas podría interferir en los resultados, debido a que estas pueden presentar autofluorescencia o retener fluoróforos de forma inespecífica, lo que conllevaría una sobreestimación de la eficiencia de la transfección.

Análisis de la expresión de las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 mediante Western Blot

Con el objetivo de verificar la eficacia de las transfecciones realizadas y confirmar la sobreexpresión de las proteínas antiapoptóticas correspondientes, se llevaron a cabo ensayos Western-blot, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5.b. Para ello, se analizaron los niveles de expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-X_L (26 kDa), Bcl-2 (26 kDa) y Mcl-1 (37 kDa) en las distintas líneas celulares generadas. Como control de carga, se empleó β-actina (42 kDa).

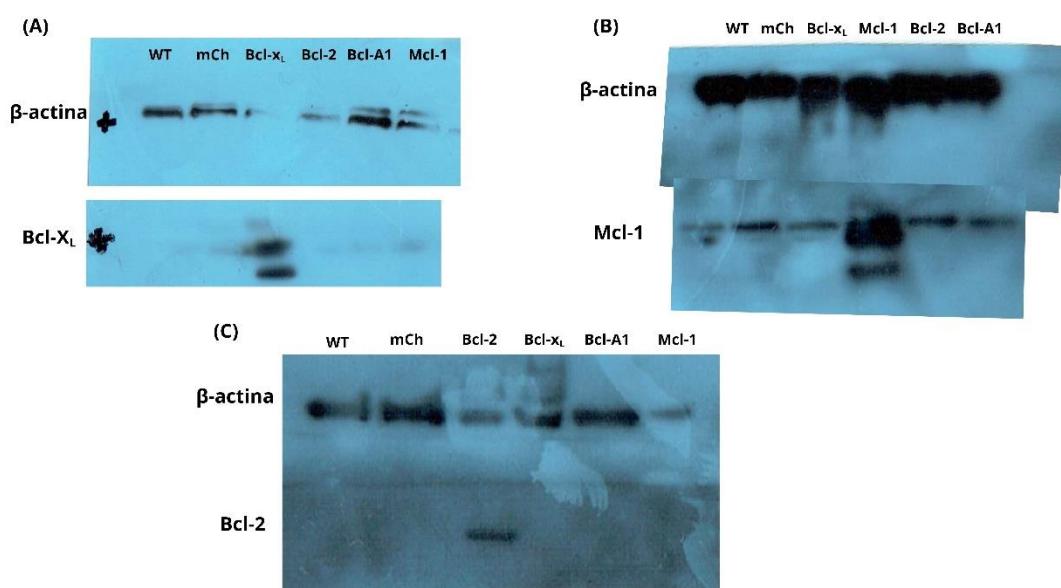


Figura 8.- Análisis de la expresión de (A) Bcl-X_L (26 kDa), (B) Mcl-1 (37 kDa) y (C) Bcl-2 (26 kDa) mediante Western Blot. Se indican las líneas celulares correspondientes a cada columna, así como la proteína analizada y su peso molecular (kDa). Se muestra una imagen representativa de tres réplicas independientes.

En la membrana empleada como control de carga (β -actina), se observó una banda de similar intensidad en todas las condiciones analizadas, que indica una carga proteica homogénea entre las muestras y válida la comparación de niveles de expresión de las diferentes proteínas.

En la membrana correspondiente a la detección de la proteína Bcl-X_L (Figura 8.A) se observó una leve banda en todas las líneas celulares, que indica una expresión endógena de la proteína. Además, en la línea celular Jurkat con sobreexpresión de Bcl-X_L, se detectó una banda de mayor intensidad y grosor, que confirmaba el aumento de expresión de dicha proteína.

El análisis de la proteína Mcl-1 (Figura 8.B) también mostró una expresión basal en todas las líneas celulares, reflejada como una estrecha banda común en todas ellas. No obstante, en las células transfectadas para la sobreexpresión de esta proteína, la banda correspondiente se observaba con mayor intensidad y grosor, evidenciando un aumento de la expresión. Nuevamente la banda de β -actina respaldó la correcta comparación entre las muestras.

Finalmente, en el Western-Blot realizado para la detección de Bcl-2 (Figura 8.C), se observó una tenue banda únicamente en la línea celular transfectada para la sobreexpresión de esta proteína. Sin embargo, en el resto de las líneas no se detectó señal alguna. Esta ausencia podría deberse a una baja expresión basal de Bcl-2 en estas células, o bien a una baja especificidad del anticuerpo empleado. Al igual que en los casos anteriores, la banda correspondiente al control con β -actina mostró intensidad constante, confirmando la homogeneidad en la carga proteica de todos los carriles.

En conjunto, los resultados confirman la sobreexpresión específica de las proteínas de interés en las líneas transfectadas. La evaluación funcional de dicha sobreexpresión se presenta en el siguiente apartado.

b. Evaluación de la resistencia a quimioterápicos convencionales

Se evaluó la resistencia al agente quimioterápico etopósido en las líneas celulares modificadas para sobreexpresar proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, en

comparación con líneas control: Jurkat WT, Jurkat transfectadas con vector vacío (mCherry), y dos líneas adicionales – HPB-ALL y MOLT-4 (LLA-T). La inclusión de la línea HPB-ALL se fundamenta en su representación en la leucemia linfoblástica aguda de células T y en su expresión endógena de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (MacLeod et al., 2003; Yao et al., 2007).

El **etopósido** es un fármaco ampliamente utilizado en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, como el cáncer de pulmón de células pequeñas y la leucemia mieloide aguda. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la topoisomerasa II, dando lugar a roturas del ADN e inducción de la vía intrínseca de la apoptosis.

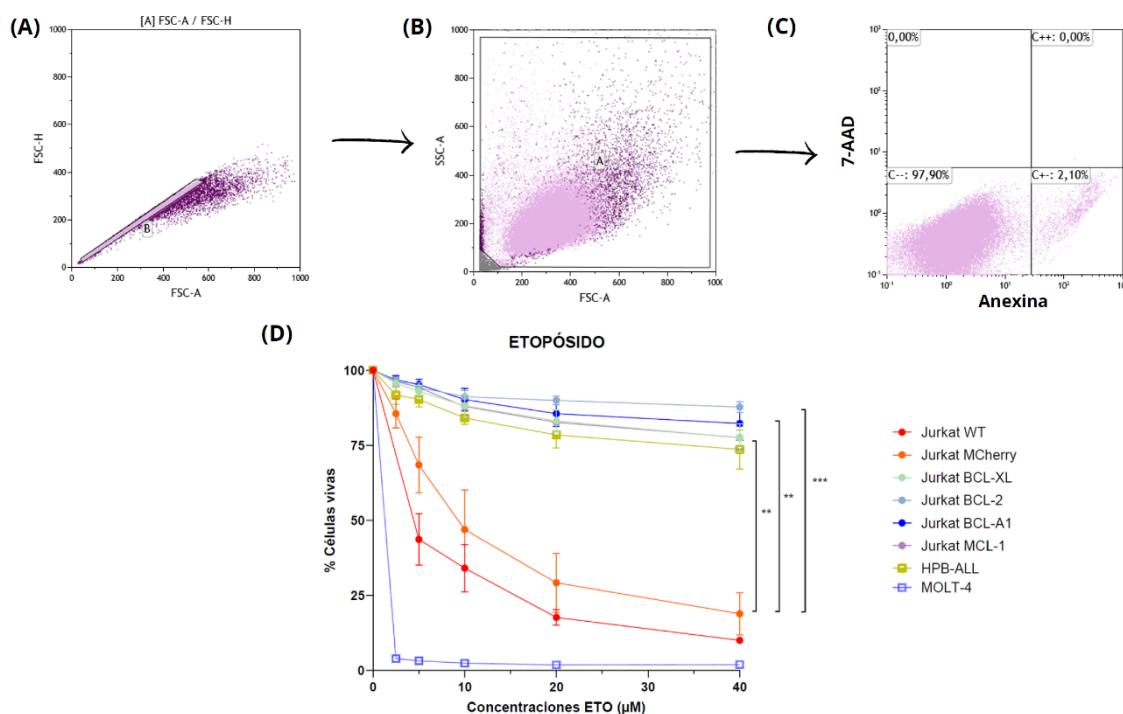


Figura 9.- Análisis de muerte celular inducida por etopósido en diferentes líneas celulares mediante citometría de flujo. (A) Selección de los eventos individuales (singletes) mediante dispersión de FSC-H vs FSC-A. **(B)** Selección de las poblaciones celulares vivas según el tamaño y complejidad celular por dispersión de SSC-A vs FSC-A. **(C)** Análisis de la apoptosis temprana y la muerte celular mediante tinción con Anexina V y 7-AAD. **(D)** Curvas de supervivencia tras la exposición de las células a etopósido con concentraciones crecientes (0 – 40 μ M) durante 24 horas. Los datos representados son el resultado de la media obtenida \pm SEM en tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se determinaron con un test T-student * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001 y **** p <0.0001.

Para el análisis, las células se incubaron durante 24 horas con concentraciones crecientes del fármaco (1,25; 2,5; 5; 10 y 20 μ M). Posteriormente, la viabilidad se evaluó mediante citometría de flujo, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5.c. Tal como se muestra en la Figura 9, las células Jurkat con sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas (Bcl-X_L, Bcl-2, Bcl-A1 y Mcl-1), así como la línea celular HPB-ALL, mostraron una marcada resistencia a la muerte celular inducida por etopósido, incluso a las concentraciones más elevadas. En contraste, las líneas control Jurkat WT y mCherry, así como la línea MOLT-4, experimentaron una significativa disminución de su viabilidad incluso a las concentraciones más bajas de etopósido.

Cabe señalar que, el análisis estadístico mostró que las diferencias de viabilidad entre las células mCherry y aquellas con sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas fueron estadísticamente significativas, alcanzando niveles de significación de moderada a alta ($p < 0,05$ a $p < 0,001$) en función del perfil de sobreexpresión.

Estos resultados respaldan el papel protector de las proteínas de la familia Bcl-2 frente a la apoptosis inducida por daño en el ADN. Además, confirman que la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas proporciona resistencia funcional al tratamiento con quimioterápicos convencionales.

c. Estudio de la sensibilidad de las células Jurkat resistentes a la apoptosis frente a inhibidores específicos

Tras confirmar la resistencia de las líneas Jurkat con sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas frente al etopósido, se procedió a evaluar su sensibilidad frente a inhibidores específicos dirigidos contra distintos miembros de la familia Bcl-2. Estos compuestos dirigen su actividad hacia el bloqueo selectivo de proteínas antiapoptóticas clave, como Bcl-X_L, Bcl-2 y Mcl-1, con el objetivo de reactivar la vía intrínseca de la apoptosis en células tumorales que dependen funcionalmente de estos factores de supervivencia.

Los inhibidores utilizados en este estudio fueron: **Venetoclax** (ABT-199), un inhibidor específico de Bcl-2 aprobado para uso clínico; **DT2216**, un degradador selectivo de Bcl-X_L; y **ABBV-467**, un inhibidor experimental de Mcl-1.

Las células fueron incubadas durante 24 horas con concentraciones crecientes de cada inhibidor de forma independiente, evaluando la viabilidad celular mediante citometría de flujo.

Efecto de venetoclax: Inhibidor de Bcl-2

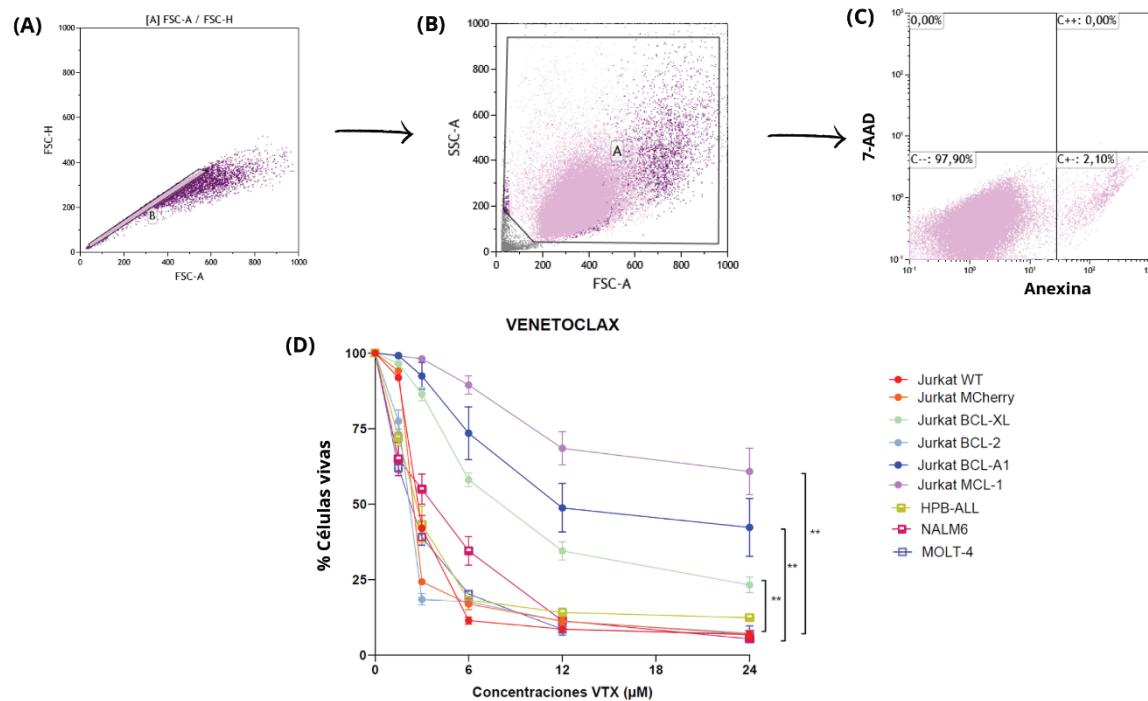


Figura 10.- Análisis de muerte celular inducida por venetoclax en diferentes líneas celulares mediante citometría de flujo. (A) Selección de los eventos individuales (singletes) mediante dispersión de FSC-H vs FSC-A. **(B)** Selección de las poblaciones celulares vivas según el tamaño y complejidad celular por dispersión de SSC-A vs FSC-A. **(C)** Análisis de la apoptosis temprana y la muerte celular mediante tinción con Anexina V y 7-AAD. **(D)** Curvas de supervivencia tras la exposición de las células a concentraciones crecientes (1,5 – 24 μ M) de venetoclax durante 24 horas. Los datos representados son el resultado de la media obtenida \pm SEM en tres experimentos independientes. Los datos representados son el resultado de la media obtenida \pm SEM en tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se determinaron con un test T-student

* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ y **** $p<0.0001$.

El perfil de inhibición de venetoclax, inhibidor de Bcl-2, mostró un efecto dosis-dependiente. Se observó una clara disminución de la viabilidad en células Jurkat WT, Jurkat mCherry, Jurkat Bcl-2, HPB-ALL, MOLT-4 y Nalm6. Adicionalmente, las células Jurkat Bcl-X_L mostraron una reducción moderada de la viabilidad, aunque menos pronunciada que las líneas dependientes de Bcl-2. Por su parte, las Jurkat con sobreexpresión de Bcl-A1 y Mcl-1, fueron las líneas con mayor resistencia al tratamiento (Figura 10).

Los resultados obtenidos son consistentes con los datos previamente reportados por Souers et al. (2013) y Di Grande et al. (2021), quienes demostraron que, aunque venetoclax presenta elevada afinidad específica por Bcl-2, también es capaz de unirse a Bcl-X_L, lo que justificaría el efecto parcial observado en células Jurkat que sobreexpresan Bcl-X_L. Por el contrario, no se ha descrito afinidad significativa de venetoclax por Mcl-1, lo que explica la ausencia de efecto citotóxico en líneas celulares funcionalmente dependientes de esta proteína.

Asimismo, cabe señalar que el análisis estadístico reveló diferencias significativas en la viabilidad celular entre la línea celular control, Jurkat mCherry, y aquellas con sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas Bcl-A1 o Mcl-1, así como con la línea Jurkat Bcl-X_L.

Efecto de DT2216: Inhibidor de Bcl-X_L

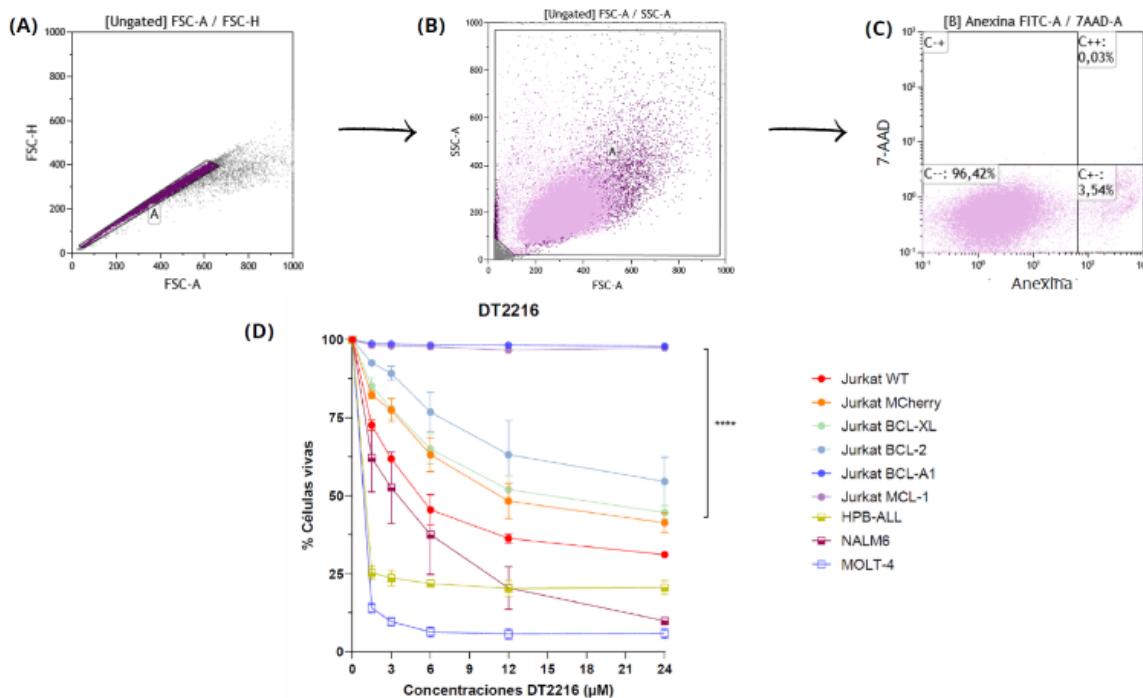


Figura 11.- Análisis de muerte celular inducida por DT2216 en diferentes líneas celulares mediante citometría de flujo. (A) Selección de los eventos individuales (singletes) mediante dispersión de FSC-H vs FSC-A. **(B)** Selección de las poblaciones celulares vivas según el tamaño y complejidad celular por dispersión de SSC-A vs FSC-A. **(C)** Análisis de la apoptosis temprana y la muerte celular mediante tinción con Anexina V y 7-AAD. **(D)** Curvas de supervivencia tras la exposición de a concentraciones crecientes (1,5 – 24 μ M) de DT2216 durante 24 horas. Los datos representados son el resultado de la media obtenida \pm SEM en tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se determinaron con un test T-student * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001 y **** p <0.0001.

El tratamiento con DT2216 indujo una citotoxicidad marcada y dosis-dependiente en varias de las líneas celulares analizadas (Figura 11). Las células Jurkat WT y Jurkat mCherry mostraron una progresiva reducción de la viabilidad celular a partir de concentraciones de 3 μ M, alcanzando valores inferiores al 50 % en torno a concentraciones de 6 μ M. Las células Jurkat con sobreexpresión de Bcl-X_L presentaron un perfil de sensibilidad muy similar al de las líneas control, lo que evidencia la especificidad funcional del inhibidor, diseñado para degradar selectivamente la proteína Bcl-X_L.

Por otro lado, las células Jurkat con sobreexpresión de Bcl-2 mostraron una reducción parcial de su viabilidad, sugiriendo que el inhibidor DT2216 posee eficacia limitada sobre esta proteína. Asimismo, las células Jurkat con sobreexpresión de Mcl-1 o Bcl-A1 mostraron alta resistencia al tratamiento, manteniendo viabilidades superiores al 90 % incluso a las concentraciones analizadas más altas. En contraste, las líneas HPB-ALL, MOLT-4 y Nalm6, presentaron una marcada sensibilidad al tratamiento con Venetoclax (Figura 10).

Es importante destacar que el análisis estadístico reveló una diferencia altamente significativa en la viabilidad celular entre la línea celular control, Jurkat mCherry, y aquellas con sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas Bcl-A1 o Mcl-1 ($p < 0,0001$).

En conjunto, estos resultados respaldan la alta especificidad de DT2216 por Bcl-X_L y ponen de manifiesto la capacidad de otras proteínas antiapoptóticas para conferir resistencia completa al tratamiento. Asimismo, resulta especialmente relevante la sensibilidad mostrada por las células MOLT-4, dado que, según lo descrito por Khan et al. (2019), esta línea depende exclusivamente de Bcl-X_L para su supervivencia, lo que justifica su marcada vulnerabilidad frente al inhibidor.

Efecto de ABBV-467: Inhibidor de Mcl-1

Finalmente, se analizó el efecto de ABBV-467, un inhibidor selectivo de MCL-1, en distintas líneas celulares de leucemia T. La Figura 12 muestra la viabilidad relativa tras 24 horas de tratamiento con concentraciones crecientes del inhibidor.

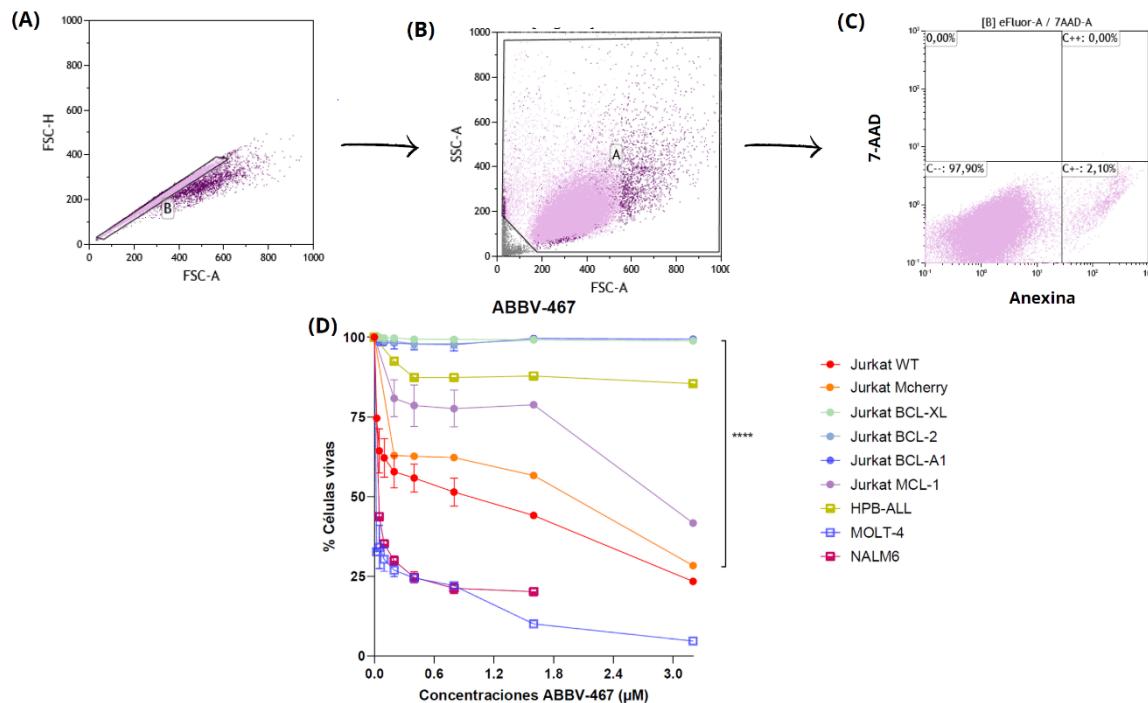


Figura 12.- Análisis de muerte celular inducida por ABBV-467 en diferentes líneas celulares mediante citometría de flujo. (A) Selección de los eventos individuales (singlets) mediante dispersión de FSC-H vs FSC-A. **(B)** Selección de las poblaciones celulares vivas según el tamaño y complejidad celular por dispersión de SSC-A vs FSC-A. **(C)** Análisis de la apoptosis temprana y la muerte celular mediante tinción con Anexina V y 7-AAD. **(D)** Curvas de supervivencia tras la exposición de las células a concentraciones crecientes (0,05 – 3,2 μ M) de ABBV-467 durante 24 horas. Los datos representados son el resultado de la media obtenida \pm SEM en tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se determinaron con un test T-student * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001 y **** p <0.0001.

Los resultados evidenciaron una sensibilidad clara y dosis-dependiente en las líneas Jurkat WT, Jurkat mCherry y Jurkat Mcl-1, así como en las líneas MOLT-4 y Nalm6 incluidas en el estudio. En particular, en las células Jurkat Mcl-1, diana objetivo del inhibidor, la curva dosis-respuesta mostró una caída pronunciada a partir de concentraciones de 1,6 μ M, con una EC₅₀ aproximada de 3 μ M. Estos resultados respaldan la dependencia funcional de

Mcl-1 en esta línea celular y validan la especificidad del compuesto, aunque la eficiencia no fue tan profunda como en los casos de venetoclax y DT2216 con Bcl-2 y Bcl-X_L , respectivamente.

Por otro lado, las líneas HPB-ALL, así como las células Jurkat con sobreexpresión de Bcl-2, Bcl-X_L y Bcl-A1, no mostraron sensibilidad al tratamiento, manteniendo elevados niveles de viabilidad celular. Este resultado indica que estas líneas celulares presentan mecanismos de resistencia frente a la inhibición de Mcl-1, bien por una menor dependencia funcional de la misma o por la activación de rutas compensatorias gracias a la elevada expresión de otros miembros de la familia de Bcl-2. Cabe destacar que el análisis estadístico reveló una diferencia significativa en la viabilidad celular entre la línea celular control, Jurkat mCherry, y las células con sobreexpresión de Bcl-2, Bcl-X_L y Bcl-A1 tras el tratamiento con ABBV-467 ($p < 0,0001$).

Estos resultados evidencian que la sobreexpresión específica de proteínas de la familia Bcl-2 puede conferir resistencia frente a inhibidores dirigidos a otras proteínas dianas de la misma familia, confirmando la importancia de caracterizar el perfil antiaapoptótico tumoral a la hora de seleccionar estrategias terapéuticas dirigidas realmente eficaces. En este contexto, he de señalar que en el estudio se incluyeron células Jurkat con sobreexpresión de Bcl-A1 debido a su marcada resistencia frente a todos los inhibidores específicos empleados; manifestando la necesidad de considerar proteínas antiapoptóticas menos comunes en el diseño de terapias combinadas que permitan superar mecanismos de escape apoptótico.

d. Evaluación de la expresión de CD1a

Con el objetivo de determinar la potencial sensibilidad al CD1aCAR-T en los siguientes experimentos, se evaluó la expresión del antígeno CD1a en las diferentes líneas celulares mediante citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 13, las células Jurkat y las MOLT-4 mostraron una elevada expresión de CD1a mientras que, en comparación, la línea HPB-ALL mostró una expresión notablemente disminuida. A su vez, confirmamos que nuestro control negativo de LLA-B, la línea Nalm6, no mostró expresión detectable del antígeno.

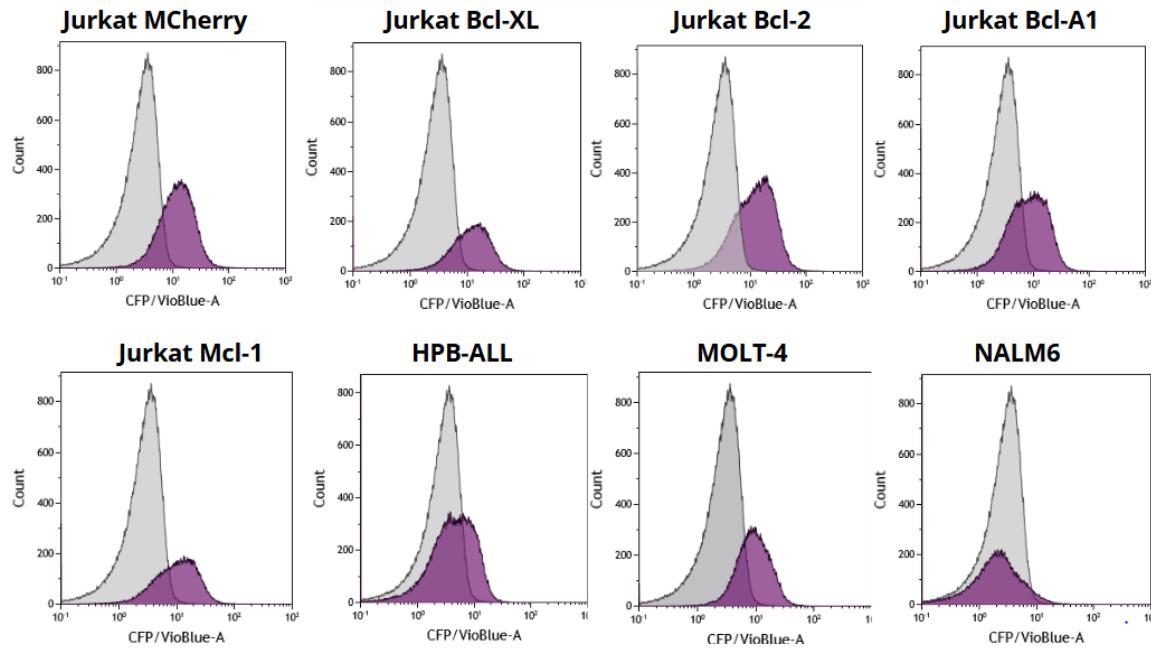


Figura 13.- Análisis por citometría de flujo de la expresión del antígeno CD1a en las líneas celulares utilizadas como diana. Las células se marcaron con anticuerpos anti-CD1a y se analizaron mediante citometría de flujo. Los histogramas muestran la fluorescencia del control negativo para CD1a (gris) y la señal correspondiente a la expresión de CD1a en las distintas líneas celulares (morado). Se muestra una imagen representativa de dos réplicas independientes.

e. Análisis de la actividad citotóxica de las células CD1aCAR-T frente a células Jurkat con sobreexpresión de proteínas de la familia Bcl-2

Tras evaluar la resistencia a agentes quimioterapéuticos convencionales y a inhibidores específicos de proteínas antiapoptóticas, se analizó la capacidad citotóxica mediada por células CD1aCAR-T frente a las distintas líneas celulares. Para ello, se cocultivaron células efectoras con células diana, previamente teñidas con CellTrace™ Violet, durante 24 horas, utilizando distintas proporciones efector:diana (E:T) de 1:4; 1:2 y 1:1. Como control negativo, se emplearon células T no transducidas (untransduced, UT). La viabilidad celular se evaluó mediante citometría de flujo, y los datos presentados corresponden a la media de cinco experimentos independientes.

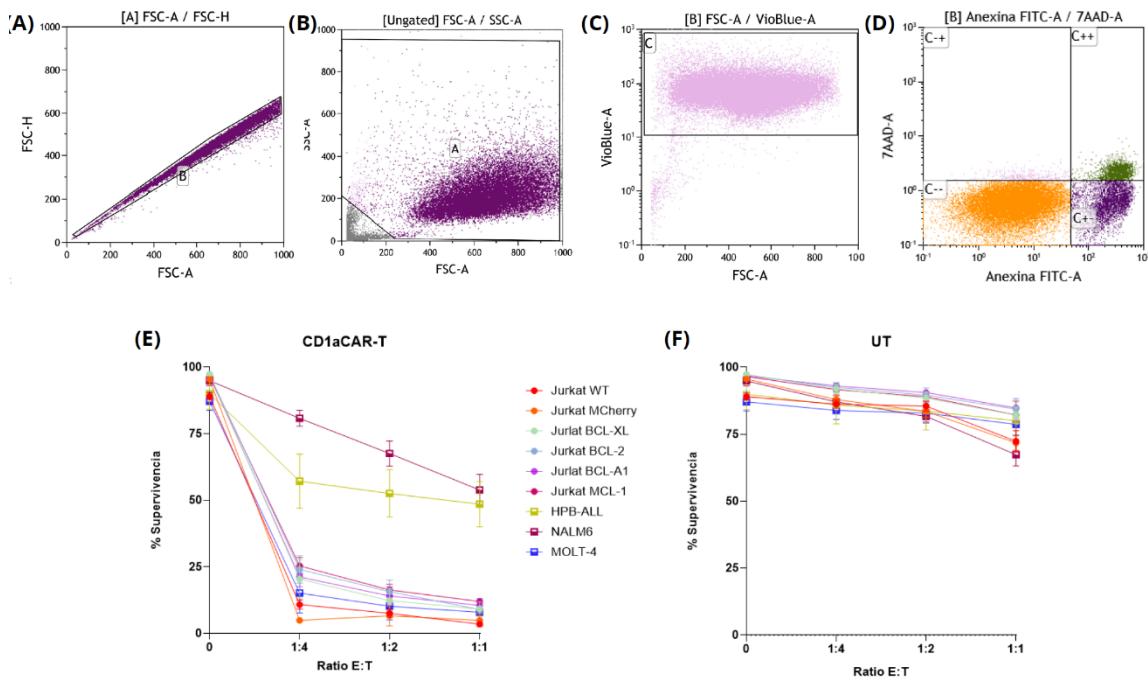


Figura 14.- Estrategia para análisis por citometría de flujo y evaluación de la citotoxicidad mediada por células CD1aCAR-T y UT. (A) Selección de los eventos individuales (singletes) mediante dispersión de FSC-H vs FSC-A. **(B)** Selección de las poblaciones celulares vivas según el tamaño y complejidad celular por dispersión de SSC-A vs FSC-A. **(C)** Selección de células diana teñidas con sonda fluorescente (CellTrace™ Violet). **(D)** Análisis de la apoptosis temprana y la muerte celular mediante tinción con Anexina V y 7-AAD en las células diana positivas para CellTrace™ Violet. **(E)** Evaluación de la citotoxicidad de los CD1aCAR-T frente diferentes líneas diana. **(F)** Evaluación de la supervivencia en condiciones control (células T sin transfectar, UT) Los datos de (E) y (F) representan el promedio \pm SEM de cinco réplicas independientes.

Tal como se muestra en la Figura 14, las células CD1aCAR-T indujeron una marcada reducción de la viabilidad celular en las líneas con expresión de CD1a, incluso a bajas proporciones E:T. En particular, las líneas Jurkat, tanto las control (WT y mCherry) como las mutantes (Bcl-2, Bcl-X_L, BCL-A1 y Mcl-1), mostraron niveles de viabilidad celular inferiores al 10 % incluso a las menores proporciones E:T (1:4). Este efecto no se observó en los cultivos con células no transducidas, donde la viabilidad permaneció elevada (>80 %), a excepción de una leve muerte basal esperable en cocultivos. Estos resultados, subrayan la elevada potencia y especificidad de la respuesta mediada por CD1aCAR-T.

En el caso concreto de la línea HPB-ALL, que presenta una débil expresión de CD1a, se observó una parcial reducción de la viabilidad tras la exposición al CAR-T, aunque mucho

menos acusada que en las células Jurkat. Por otro lado, en la línea MOLT-4, que no expresa CD1a, no se evidenció diferencia significativa entre el cocultivo con CD1aCAR-T y el control con las UT; confirmando la especificidad antigénica de la citotoxicidad observada, así como los resultados obtenidos en el apartado 6.d.

En general, estos resultados apoyan el uso de CD1a como biomarcador funcional de susceptibilidad al CD1aCAR-T y, refuerzan el potencial de esta estrategia como tratamiento dirigido.

f. Evaluación del efecto de la combinación de inhibidores específicos con células CD1aCAR-T

Como última fase del estudio, se evaluó si el tratamiento previo con inhibidores específicos podía potenciar el efecto citotóxico de las células CD1aCAR-T frente a células diana con sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas. Para ello, las células diana (Jurkat WT y sus mutantes) fueron teñidas con CellTrace™ Violet, con el objetivo de poder diferenciarlas de las células T y, posteriormente, se incubaron durante 24 horas con las concentraciones seleccionadas de los inhibidores específicos (Venetoclax, DT2216 y ABBV-467).

La elección de las concentraciones empleadas de los inhibidores se basó en criterios de eficacia y seguridad: seleccionando concentraciones donde la viabilidad celular se mantuviera en torno al 75-80 %, con el objetivo de mantener bajas concentraciones de droga. Por su parte, dada la alta actividad demostrada por las células CD1aCAR-T en los ensayos anteriores, se optó por emplear la relación efector:diana efectiva más baja (efector:diana 1:4).

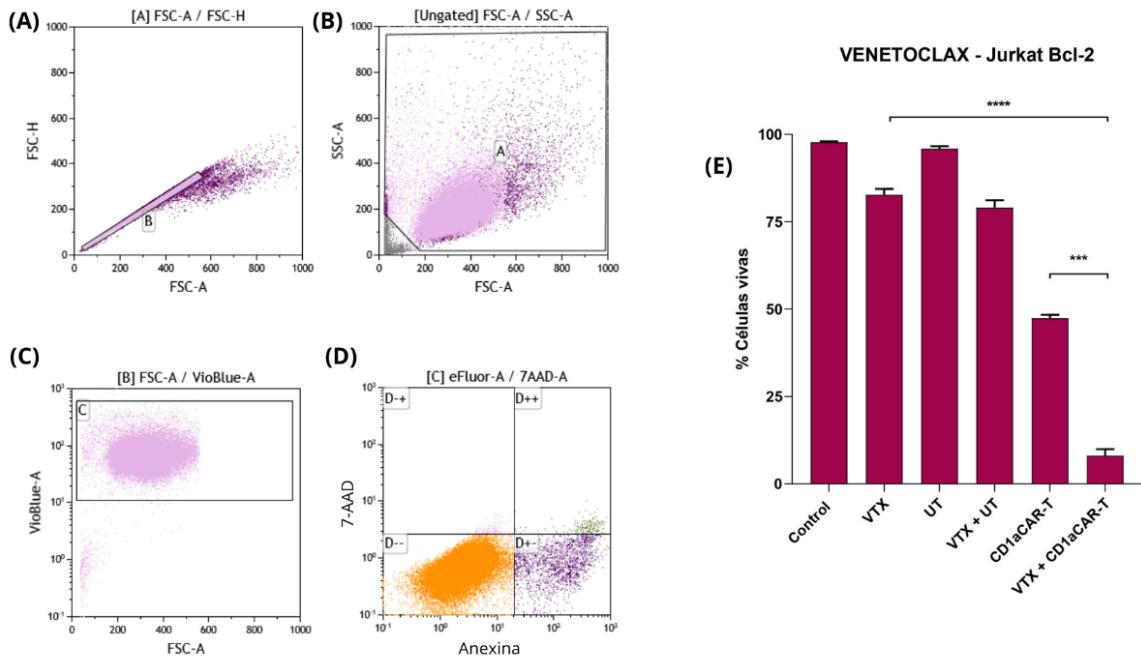


Figura 15.- Análisis de la viabilidad de las células Jurkat Bcl-2 tras el tratamiento con venetoclax y células CAR-T. (A) Selección de los eventos individuales (singletes) mediante dispersión de FSC-H vs FSC-A. (B) Selección de las poblaciones celulares vivas según el tamaño y complejidad celular por dispersión de SSC-A vs FSC-A. (C) Selección de células diana teñidas con sonda fluorescente (CellTrace™ Violet). (D) Análisis de la apoptosis temprana y la muerte celular mediante tinción con Anexina V y 7-AAD en las células diana positivas para CellTrace™ Violet. (E) Evaluación de la eficacia de distintas terapias en monoterapias y terapias de combinación. Los datos de (E) representan el promedio \pm SEM de cinco réplicas independientes. Las diferencias significativas se determinaron con un test T-student * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ y **** $p<0.0001$.

Transcurridas 24 horas desde la adición del inhibidor, se añadieron las células T (CD1aCAR-T o UT, según correspondiera); 24 horas después, se evaluó la viabilidad celular por citometría de flujo, utilizando tinción con 7-AAD y Anexina V.

En el análisis de los resultados obtenidos se observó que el efecto de la terapia combinada era superior únicamente cuando el inhibidor específico actuaba sobre las células diana que sobreexpresan la proteína antiapoptótica objetivo. El tratamiento en monoterapia con el inhibidor indujo una reducción moderada de la viabilidad celular, alrededor del 20 %, mientras que la monoterapia de las células T no transfectadas (UT) generó un efecto citotóxico residual, inferior al 5 %. Por el contrario, las células CD1aCAR-T en monoterapia generó una reducción de la viabilidad celular superior al 50 %. La

combinación de CD1aCAR-T con el inhibidor específico generaba el mayor efecto citotóxico, alcanzando reducciones de la viabilidad celular del 80-90 %. Asimismo, el análisis estadístico confirmó diferencias significativas entre los tratamientos en monoterapia, tanto con inhibidores como con CD1aCAR-T, y la terapia combinada con el inhibidor específico en todas las variantes analizadas.

En el caso de las células Jurkat con sobreexpresión de proteína Bcl-2, la terapia combinada del inhibidor (Venetoclax) y el CAR-T redujo significativamente la viabilidad celular en comparación con la monoterapia de CD1aCAR-T ($p = 0,0002$). Asimismo, la comparación entre Venetoclax en monoterapia frente a la terapia combinada también evidenció una reducción todavía más marcada de la viabilidad celular ($p < 0,0001$) (Figura 15).

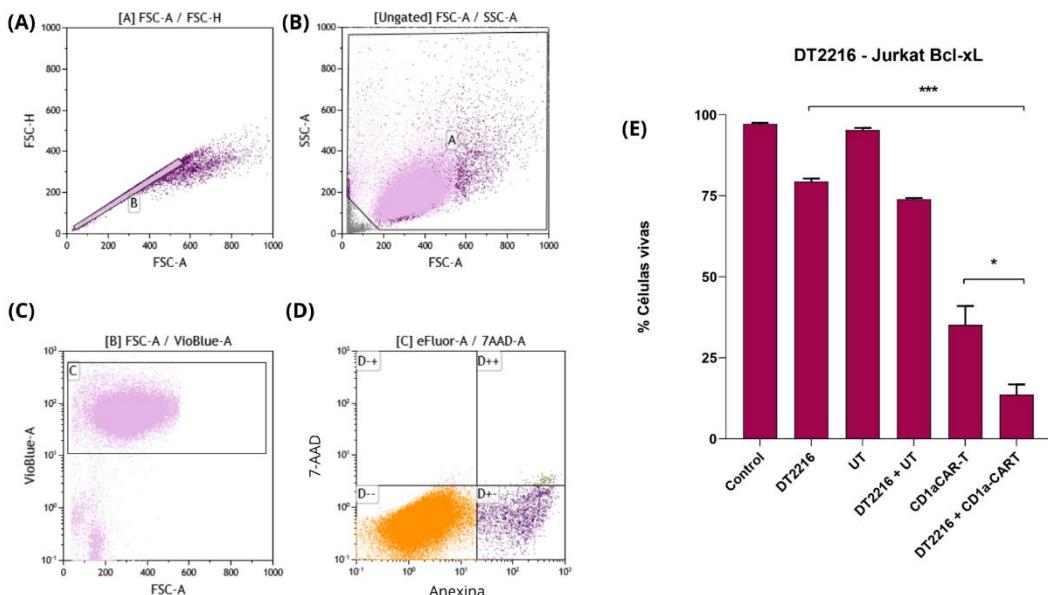


Figura 16.- Análisis de la viabilidad de las células Jurkat Bcl-X_L tras el tratamiento con DT2216 y células CAR-T. (A) Selección de los eventos individuales (singletes) mediante dispersión de FSC-H vs FSC-A. (B) Selección de las poblaciones celulares vivas según el tamaño y complejidad celular por dispersión de SSC-A vs FSC-A. (C) Selección de células diana teñidas con sonda fluorescente (CellTrace™ Violet). (D) Análisis de la apoptosis temprana y la muerte celular mediante tinción con Anexina V y 7-AAD en las células diana positivas para CellTrace™ Violet. (E) Evaluación de la eficacia de distintas terapias en monoterapias y terapias de combinación. Los datos de (E) representan el promedio ± SEM de cinco réplicas independientes. Las diferencias significativas se determinaron con un test T-student * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ y **** $p<0.0001$.

En el análisis de las células Jurkat Bcl- X_L los resultados observados fueron similares a los anteriormente comentados. DT2216 en monoterapia inducía citotoxicidad moderada, mientras que el tratamiento combinado con células CD1aCAR-T producía una reducción más marcada de la viabilidad celular en las células con sobreexpresión de Bcl- X_L. Los análisis estadísticos revelaron diferencias significativas tanto entre el tratamiento combinado de DT2216 con CD1aCAR-T frente a los CAR-T en monoterapia ($p = 0,0221$) como frente al inhibidor en monoterapia ($p = 0,0002$) (Figura 16).

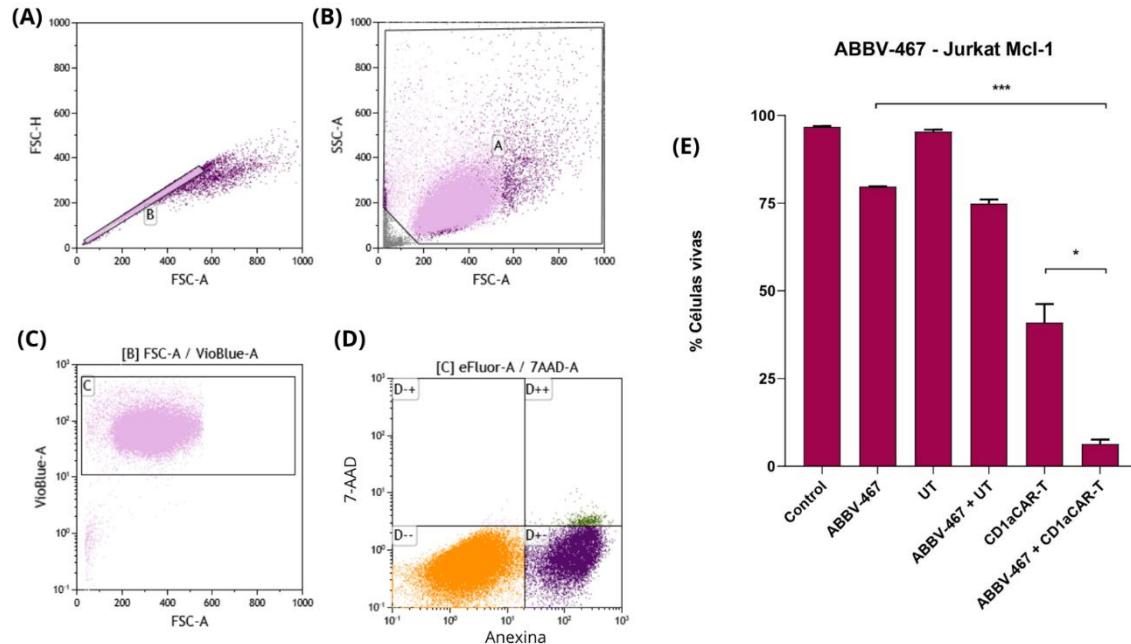


Figura 17.- Análisis de la viabilidad de las células Jurkat Mcl-1 tras el tratamiento con ABBV-467 y células CAR-T. (A) Selección de los eventos individuales (singlets) mediante dispersión de FSC-H vs FSC-A. (B) Selección de las poblaciones celulares vivas según el tamaño y complejidad celular por dispersión de SSC-A vs FSC-A. (C) Selección de células diana teñidas con sonda fluorescente (CellTrace™ Violet). (D) Análisis de la apoptosis temprana y la muerte celular mediante tinción con Anexina V y 7-AAD en las células diana positivas para CellTrace™ Violet. (E) Evaluación de la eficacia de distintas terapias en monoterapias y terapias de combinación. Los datos (E) representan el promedio \pm SEM de cinco réplicas independientes. Las diferencias significativas se determinaron con un test T-student * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$.

Finalmente, la combinación de ABBV-467 con el CD1aCAR-T en células con sobreexpresión de Mcl-1, también demostró aumento significativo del efecto citotóxico frente a las condiciones en monoterapia. Los análisis estadísticos reflejaron diferencias significativas tanto en la comparación de la terapia combinada frente a la monoterapia con

el inhibidor ($p = 0,0003$) como frente a la monoterapia con el CAR-T ($p = 0,0240$) (Figura 17).

Estos datos apoyan la existencia de efecto sinérgico entre los inhibidores específicos de proteínas antiapoptóticas y la inmunoterapia basada en células CD1aCAR-T. Asimismo, en el estudio realizado, la combinación de ambas estrategias no sólo incrementó la citotoxicidad frente a las células tumorales resistentes a la apoptosis que sobreexpresaban la proteína objetivo del inhibidor, sino que también permitió reducir las dosis terapéuticas, lo que podría suponer una disminución de los efectos adversos.

7. DISCUSIÓN

Los resultados del estudio realizado respaldan la relevancia de conocer el perfil antiapoptótico de las células tumorales a la hora de predecir la respuesta a terapias dirigidas. Asimismo, se confirma que la sobreexpresión de proteínas de la familia Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 o Bcl-A1) confiere resistencia a agentes quimioterápicos convencionales, en consonancia con lo previamente descrito en la literatura sobre mecanismos de evasión de la muerte celular programada en neoplasias hematológicas.

En este contexto, los inhibidores específicos de proteínas antiapoptóticas han emergido como una alternativa terapéutica para superar dichas resistencias. A pesar de ello, su citotoxicidad únicamente se manifiesta a concentraciones elevadas y exclusivamente en células que sobreexpresan su proteína objetivo, lo que limita su utilidad en monoterapia. Esta observación refuerza la necesidad de realizar una caracterización tumoral antes de seleccionar la estrategia terapéutica.

Respecto a la inmunoterapia, los ensayos realizados con CD1aCAR-T demostraron un potente efecto citotóxico sobre las células que expresan el antígeno diana (CD1a), independientemente de la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas.

Un hallazgo especialmente relevante observado en el estudio fue la observación de un efecto sinérgico entre los CD1aCAR-T y los inhibidores específicos. Esta combinación no sólo potenció la eficacia citotóxica frente a las células tumorales, sino que permitió reducir las dosis necesarias de ambos agentes terapéuticos. Este hecho, puede tener importantes implicaciones clínicas, reduciendo los efectos tóxicos y aumentando la tolerancia al tratamiento. No obstante, será necesario realizar más estudios experimentales para determinar si la combinación de inhibidores y células CAR-T contribuye a una mayor persistencia del efecto antileucémico. Asimismo, será crucial establecer si, como se ha propuesto previamente, la vía mitocondrial resulta crítica en función de la dependencia celular y de la relevancia de la vía de los receptores mortales (Pourzia et al., 2023).

En este contexto, resulta también fundamental profundizar en los mecanismos de muerte celular implicados en la acción de las células CAR-T, así como en su capacidad para superar la resistencia a la apoptosis. Estudios previos ya han sugerido que, en ausencia de

modificaciones genéticas, las terapias celulares requieren de combinación con fármacos a bajas dosis efector:diana (Pan et al., 2022). Sin embargo, dosis efector:diana elevadas, podrían superar por sí solas estas resistencias (Pardo et al., 2008).

En conjunto, el enfoque terapéutico combinado parece ser una estrategia prometedora para el tratamiento de neoplasias como la LLA-T, donde las opciones terapéuticas son limitadas y las tasas de recaída elevadas. Sin embargo, dado que el estudio se ha realizado sobre modelos celulares, sería necesario confirmarlo en modelos *in vivo*. Además, deben considerarse las limitaciones del estudio experimental empleado; como la representatividad de las líneas celulares estudiadas o la ausencia de microambiente tumoral.

En definitiva, el presente trabajo contribuye a la evidencia de que las terapias combinadas, correctamente diseñadas, podrían suponer una mejora en el tratamiento de las leucemias resistentes a tratamientos convencionales, pero, a pesar de ello, se requiere de más investigación.

8. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo podemos establecer las siguientes conclusiones:

1. Las células con sobreexpresión de proteínas de la familia de Bcl-2 muestran resistencia a la apoptosis inducida por quimioterapia con etopósido.
2. Los inhibidores específicos de proteínas antiapoptóticas ejercen efecto citotóxico sobre células resistentes. Sin embargo, dicho efecto aparece a concentraciones elevadas de inhibidor y únicamente cuando actúan sobre líneas celulares con sobreexpresión de su proteína objetivo; lo que obliga a conocer el perfil antiapoptótico del tumor antes de seleccionar la terapia.
3. Las células CD1aCAR-T muestran gran actividad citotóxica frente a células que expresan el antígeno diana (CD1a), independientemente de su perfil de expresión de proteínas antiapoptóticas. Sin embargo, esta citotoxicidad es dependiente de la expresión del antígeno, resultando ineficaz en células con baja o nula expresión de CD1a.
4. La combinación de células CD1aCAR-T con inhibidores específicos potencia el efecto citotóxico frente a células tumorales, lo que permite reducir la dosis necesaria tanto de los inhibidores como de los CAR-T en comparación con su uso en monoterapia.

9. CONCLUSIONS

Based on the results obtained in this study, the following conclusions can be drawn:

1. Cells overexpressing members of the Bcl-2 protein family exhibit resistance to apoptosis induced etoposide chemotherapy.
2. Specific inhibitors of anti-apoptotic proteins exert cytotoxic effects on resistant cells. However, this effect is only observed at high inhibitor concentrations and exclusively in cell lines that overexpress the targeted protein, highlighting the need to determine the tumor's anti-apoptotic profile prior to therapy selection.
3. CD1aCAR-T cells exhibit strong cytotoxic activity against cells expressing the target antigen (CD1a), regardless of their anti-apoptotic protein expression profile.
4. However, this cytotoxicity is antigen-dependent and ineffective in cells with low or absent CD1a expression.
5. The combination of CD1aCAR-T cells with specific inhibitors enhances the cytotoxic effect against tumor cells, allowing for a reduction in the required doses of both the inhibitors and CAR-T cells compared to monotherapy.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Alcantara, M., Tesio, M., June, C. H., & Houot, R. (2018). CAR T-cells for T-cell malignancies: challenges in distinguishing between therapeutic, normal, and neoplastic T-cells. *Leukemia*, 32(11), 2307–2315. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0285-8>
- Bai, R., Chen, N., Li, L., Du, N., Bai, L., Lv, Z., Tian, H., & Cui, J. (2020). Mechanisms of cancer resistance to immunotherapy. *Frontiers in Oncology*, 10, 1290. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01290>
- Balta, B., Gebreyohannis, T., & Tachbele, E. (2023). Survival and predictors of mortality among acute leukemia patients on follow-up in Tikur Anbessa Specialized Hospital, Addis Ababa, Ethiopia: A 5-year retrospective cohort study. *Cancer Reports*, 6(10), e1890. <https://doi.org/10.1002/cnr2.1890>
- Basquiera, A. L., Seiwald, M. C., Best Aguilera, C. R., Enciso, L., Fernandez, I., Jansen, A. M., Nunes, E., Sanchez Del Villar, M., Urbalejo Ceniceros, V. I., & Rocha, V. (2023). Expert recommendations for the diagnosis, treatment, and management of adult B-cell acute lymphoblastic leukemia in Latin America. *JCO Global Oncology*, 9, e2200292. <https://doi.org/10.1200/GO.22.00292>
- Burnet, F. M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Progress in Experimental Tumor Research*, 13, 1–27. <https://doi.org/10.1159/000386035>
- Burnet, M. (1957). Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *British Medical Journal*, 1(5022), 779–786. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5022.779>
- Carbonel Castillo, M. A. (2017). “LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA PEDIÁTRICA Y LOS EFECTOS DE LA QUIMIOTERAPIA DE INDUCCIÓN EN LA COGNICIÓN Y EL DESEMPEÑO ACADÉMICO: UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA”. https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/12082/Leucemia_BernedoDelCarpio_Hern%C3%A1n.pdf?isAllowed=y&sequence=1
- Civetta, M. T. M. de, & Civetta, J. D. (2011). Carcinogénesis. *Salud publica de Mexico*, 53(5), 405–414. <https://doi.org/10.1590/s0036-36342011000500008>
- Cooper, M. L., Choi, J., Staser, K., Ritchey, J. K., Devenport, J. M., Eckardt, K., Rettig, M. P., Wang, B., Eissenberg, L. G., Ghobadi, A., Gehrs, L. N., Prior, J. L., Achilefu, S., Miller, C. A., Fronick, C. C., O’Neal, J., Gao, F., Weinstock, D. M., Gutierrez, A., ... DiPersio, J. F. (2018). An “off-the-shelf” fratricide-resistant CAR-T for the treatment of T cell hematologic malignancies. *Leukemia*, 32(9), 1970–1983. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0065-5>
- de Visser, K. E., & Joyce, J. A. (2023). The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell*, 41(3), 374–403. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.02.016>
- Dempsey, P. W., Vaidya, S. A., & Cheng, G. (2003). The art of war: Innate and adaptive immune responses. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 60(12), 2604–2621. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3180-y>
- Dhatchinamoorthy, K., Colbert, J. D., & Rock, K. L. (2021). Cancer immune evasion

through loss of MHC class I antigen presentation. *Frontiers in Immunology*, 12, 636568. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.636568>

Di Grande, A., Peirs, S., Donovan, P. D., Van Trimpont, M., Moriscio, J., Lintermans, B., Reunes, L., Vandamme, N., Goossens, S., Nguyen, H. A., Lavie, A., Lock, R. B., Prehn, J. H. M., Van Vlierberghe, P., & Ni Chonghaile, T. (2021). The spleen as a sanctuary site for residual leukemic cells following ABT-199 monotherapy in ETP-ALL. *Blood Advances*, 5(7), 1963–1976. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021004177>

Döhner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Büchner, T., Dombret, H., Ebert, B. L., Fenaux, P., Larson, R. A., Levine, R. L., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G. J., Sanz, M., Sierra, J., Tallman, M. S., Tien, H.-F., ... Bloomfield, C. D. (2017). Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*, 129(4), 424–447. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-733196>

Domínguez, J.J & Colorado Araujo, M. (2024). *Leucemias*. Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). <https://www.contraelcancer.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/leucemias>

Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, 3(11), 991–998. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>

Dunn, G. P., Koebel, C. M., & Schreiber, R. D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature Reviews Immunology*, 6(11), 836–848. <https://doi.org/10.1038/nri1961>

Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology*, 22(1), 329–360. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803>

Ehrlich, P. (1909). Über den jetzigen Stand der Chemotherapie. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 42(1), 17–47. <https://doi.org/10.1002/cber.19090420105>

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

Gale, R. P. (2024, julio 2). *Antígenos tumorales*. Manual MSD versión para profesionales; Manuales MSD. <https://www.msmanuals.com/es/professional/hematolog%C3%ADA-y-oncolog%C3%ADA/inmunolog%C3%ADA-tumoral/ant%C3%ADgenos-tumorales>

García, M., & Vecino, E. (2003). Vías de señalización intracelular que conducen a la apoptosis de las células de la retina. *Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia*, 78(7). <https://doi.org/10.4321/s0365-66912003000700004>

Gardner, R. A., Finney, O., Annesley, C., Brakke, H., Summers, C., Leger, K., Bleakley, M., Brown, C., Mgebroff, S., Kelly-Spratt, K. S., Hoglund, V., Lindgren, C., Oron, A. P., Li, D., Riddell, S. R., Park, J. R., & Jensen, M. C. (2017). Intent-to-treat leukemia remission by CD19 CAR T cells of defined formulation and dose in children and young adults. *Blood*, 129(25), 3322–3331. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-02-769208>

- Gomes-Silva, D., Srinivasan, M., Sharma, S., Lee, C. M., Wagner, D. L., Davis, T. H., Rouce, R. H., Bao, G., Brenner, M. K., & Mammonkin, M. (2017). CD7-edited T cells expressing a CD7-specific CAR for the therapy of T-cell malignancies. *Blood*, 130(3), 285–296. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-01-761320>
- González-Barros, Martínez, López, & González & Correl. (2021). *Inmunología: biología y patología del sistema inmunitario*. Editorial Médica Panamericana.
- Guamba Inga, C. J. (2018). *Leucemia linfoblástica aguda* [Universidad Manabí]. <https://revistafdm.uleam.edu.ec/wp-content/uploads/2019/10/ensayo-leucemia-linfoblastica-aguda-.pdf>
- Guitar, M. R. (2024). Tratamiento de recaída de leucemia linfoblástica aguda en pacientes pediátricos. *Revista del Hospital Italiano de Buenos Aires*, 44(1), e0000358. <https://doi.org/10.51987/revhospitalbaires.v44i1.358>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, Douglas. (2022). Hallmarks of cancer: New dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, Douglas, & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hayashi, H., Makimoto, A., & Yuza, Y. (2024). Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia: A historical perspective. *Cancers*, 16(4), 723. <https://doi.org/10.3390/cancers16040723>
- Hofmann, W.-K., Trumpp, A., & Müller-Tidow, C. (2023). Therapy resistance mechanisms in hematological malignancies. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 152(3), 340–347. <https://doi.org/10.1002/ijc.34243>
- Ichim, G., & Tait, S. W. G. (2016). A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nature Reviews. Cancer*, 16(8), 539–548. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.58>
- Inaba, H., & Mullighan, C. G. (2020). Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 105(11), 2524–2539. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.247031>
- Inhibidores de puntos de control inmunitario*. (2019, septiembre 24). Cancer.gov. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/immunoterapia/inhibidores-de-puntos-de-control>
- Jaiswal, A. S., Williamson, E., Hromas, R. A., & Zhou, D. (2022). Abstract 5654: Degradation of Bcl-xL by DT2216 is lethal to T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Research*, 82(12_Supplement), 5654–5654. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.am2022-5654>
- Kaloni, D., Diepstraten, S. T., Strasser, A., & Kelly, G. L. (2023). BCL-2 protein family: attractive targets for cancer therapy. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 28(1–2), 20–38. <https://doi.org/10.1007/s10495-022-01780-7>

Kankeu Fonkoua, L. A., Sirpilla, O., Sakemura, R., Siegler, E. L., & Kenderian, S. S. (2022). CAR T cell therapy and the tumor microenvironment: Current challenges and opportunities. *Molecular Therapy Oncolytics*, 25, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2022.03.009>

Karrman, K., & Johansson, B. (2017). Pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 56(2), 89–116. <https://doi.org/10.1002/gcc.22416>

Khan, S., Zhang, X., Lv, D., Zhang, Q., He, Y., Zhang, P., Liu, X., Thummuri, D., Yuan, Y., Wiegand, J. S., Pei, J., Zhang, W., Sharma, A., McCurdy, C. R., Kuruvilla, V. M., Baran, N., Ferrando, A. A., Kim, Y.-M., Rogojina, A., ... Zhou, D. (2019). A selective BCL-XL PROTAC degrader achieves safe and potent antitumor activity. *Nature Medicine*, 25(12), 1938–1947. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0668-z>

Kong, Y., Li, J., Zhao, X., Wu, Y., & Chen, L. (2024). CAR-T cell therapy: developments, challenges and expanded applications from cancer to autoimmunity. *Frontiers in Immunology*, 15, 1519671. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1519671>

Konopleva, M., & Letai, A. (2018). BCL-2 inhibition in AML: an unexpected bonus? *Blood*, 132(10), 1007–1012. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-03-828269>

Lanuza Morte, Pilar Ma (2020). Inmunoterapia de células NK para el tratamiento de cáncer colorrectal con mutaciones de resistencia a drogas. Universidad de Zaragoza

Litzow, M. R., & Ferrando, A. A. (2015). How I treat T-cell acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood*, 126(7), 833–841. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-10-551895>

Liu, F., Miao, X., Han, L., & Song, X. (2024). Advances in CAR-NK cell therapy for lung cancer: is it a better choice in the future? *Frontiers in Oncology*, 14, 1390006. <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1390006>

López, Á. G., Seoane, J. M., & Sanjuán, M. A. F. (2017). Dynamics of the cell-mediated immune response to tumour growth. *Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences*, 375(2096). <https://doi.org/10.1098/rsta.2016.0291>

MacLeod, R. A. F., Nagel, S., Kaufmann, M., Janssen, J. W. G., & Drexler, H. G. (2003). Activation of HOX11L2 by juxtaposition with 3'-BCL11B in an acute lymphoblastic leukemia cell line (HPB-ALL) with t(5;14)(q35;q32.2). *Genes, Chromosomes & Cancer*, 37(1), 84–91. <https://doi.org/10.1002/gcc.10194>

Majzner, R. G., & Mackall, C. L. (2018). Tumor antigen escape from CAR T-cell therapy. *Cancer Discovery*, 8(10), 1219–1226. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0442>

Malm, M., Saghaleyni, R., Lundqvist, M., Giudici, M., Chotteau, V., Field, R., Varley, P. G., Hatton, D., Grassi, L., Svensson, T., Nielsen, J., & Rockberg, J. (2020). Evolution from adherent to suspension: systems biology of HEK293 cell line development. *Scientific Reports*, 10(1), 18996. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76137-8>

- Mamonkin, M., Rouce, R. H., Tashiro, H., & Brenner, M. K. (2015). A T-cell-directed chimeric antigen receptor for the selective treatment of T-cell malignancies. *Blood*, 126(8), 983–992. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-629527>
- Marks, D. I., & Rowntree, C. (2017). Management of adults with T-cell lymphoblastic leukemia. *Blood*, 129(9), 1134–1142. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-07-692608>
- Marks DI, Rowntree C. Management of adults with T-cell lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2017;129(9):1134-1142. (2017). *Blood*, 129(15), 2204. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-03-772350>
- Maude, S. L., Frey, N., Shaw, P. A., Aplenc, R., Barrett, D. M., Bunin, N. J., Chew, A., Gonzalez, V. E., Zheng, Z., Lacey, S. F., Mahnke, Y. D., Melenhorst, J. J., Rheingold, S. R., Shen, A., Teachey, D. T., Levine, B. L., June, C. H., Porter, D. L., & Grupp, S. A. (2014). Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 371(16), 1507–1517. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1407222>
- Maude, S. L., Laetsch, T. W., Buechner, J., Rives, S., Boyer, M., Bittencourt, H., Bader, P., Verneris, M. R., Stefanski, H. E., Myers, G. D., Qayed, M., De Moerloose, B., Hiramatsu, H., Schlis, K., Davis, K. L., Martin, P. L., Nemecek, E. R., Yanik, G. A., Peters, C., ... Grupp, S. A. (2018). Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 378(5), 439–448. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709866>
- Medzhitov, R., & Janeway, C. A., Jr. (1998). Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Seminars in Immunology*, 10(5), 351–353. <https://doi.org/10.1006/smim.1998.0136>
- Milone, M. C., Fish, J. D., Carpenito, C., Carroll, R. G., Binder, G. K., Teachey, D., Samanta, M., Lakhal, M., Gloss, B., Danet-Desnoyers, G., Campana, D., Riley, J. L., Grupp, S. A., & June, C. H. (2009). Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 17(8), 1453–1464. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.83>
- Mody, R., Li, S., Dover, D. C., Sallan, S., Leisenring, W., Oeffinger, K. C., Yasui, Y., Robison, L. L., & Neglia, J. P. (2008). Twenty-five-year follow-up among survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Blood*, 111(12), 5515–5523. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-10-117150>
- Mosquera Sáiz, M. (2016). *Estudio de la contribución de la vía de Notch1 y sus efectores moleculares a la patogénesis de la leucemia T linfoblástica aguda (T-ALL)*. Universidad de Madrid.
- Nelson, D. L., & Cox, M. (2021). *Lehninger principles of biochemistry: International edition* (8a ed.). W.H. Freeman.
- Netea, M. G., Domínguez-Andrés, J., Barreiro, L. B., Chavakis, T., Divangahi, M., Fuchs, E., Joosten, L. A. B., van der Meer, J. W. M., Mhlanga, M. M., Mulder, W. J. M., Riksen, N. P., Schlitzer, A., Schultze, J. L., Stabell Benn, C., Sun, J. C., Xavier, R. J., & Latz, E. (2020). Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nature*

Reviews. Immunology, 20(6), 375–388. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0285-6>

Netea, M. G., Quintin, J., & van der Meer, J. W. M. (2011). Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host & Microbe*, 9(5), 355–361.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.04.006>

Pan, R., Ryan, J., Pan, D., Wucherpfennig, K. W., & Letai, A. (2022). Augmenting NK cell-based immunotherapy by targeting mitochondrial apoptosis. *Cell*, 185(9), 1521–1538.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.03.030>

Pardo, J., Wallich, R., Martin, P., Urban, C., Rongvaux, A., Flavell, R. A., Müllbacher, A., Borner, C., & Simon, M. M. (2008). Granzyme B-induced cell death exerted by ex vivo CTL: discriminating requirements for cell death and some of its signs. *Cell Death and Differentiation*, 15(3), 567–579. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402289>

Park, J. H., & Brentjens, R. J. (2015). Are all chimeric antigen receptors created equal? *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(6), 651–653. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.5472>

Patel, A. A., Thomas, J., Rojek, A. E., & Stock, W. (2020). Biology and treatment paradigms in T cell acute lymphoblastic leukemia in older adolescents and adults. *Current Treatment Options in Oncology*, 21(7), 57.
<https://doi.org/10.1007/s11864-020-00757-5>

Paul, S., Konig, M. F., Pardoll, D. M., Bettegowda, C., Papadopoulos, N., Wright, K. M., Gabelli, S. B., Ho, M., van Elsas, A., & Zhou, S. (2024). Cancer therapy with antibodies. *Nature Reviews. Cancer*, 24(6), 399–426. <https://doi.org/10.1038/s41568-024-00690-x>

Png, Y. T., Vinanica, N., Kamiya, T., Shimasaki, N., Coustan-Smith, E., & Campana, D. (2017). Blockade of CD7 expression in T cells for effective chimeric antigen receptor targeting of T-cell malignancies. *Blood Advances*, 1(25), 2348–2360.
<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017009928>

Pollán Santamaría, M., López-Abente Ortega, G., Aragonés Sanz, N., González Diego, P., & Navas Acién, A. (2001). Incidencia y mortalidad por leucemias en España. *Semergen*, 27(6), 313–316. [https://doi.org/10.1016/s1138-3593\(01\)73974-3](https://doi.org/10.1016/s1138-3593(01)73974-3)

Pourzia, A. L., Olson, M. L., Bailey, S. R., Boroughs, A. C., Aryal, A., Ryan, J., Maus, M. V., & Letai, A. (2023). Quantifying requirements for mitochondrial apoptosis in CAR T killing of cancer cells. *Cell Death & Disease*, 14(4), 267. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05727-x>

¿Qué es el cáncer y cómo se desarrolla? (2019, diciembre 16). Seom.org.
<https://seom.org/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla>

Redaelli, A., Laskin, B. L., Stephens, J. M., Botteman, M. F., & Pashos, C. L. (2005). A systematic literature review of the clinical and epidemiological burden of acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *European Journal of Cancer Care*, 14(1), 53–62.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2354.2005.00513.x>

Ribatti, D. (2017). The concept of immune surveillance against tumors. The first theories. *Oncotarget*, 8(4), 7175–7180. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12739>

- Roberts, A. W., Wei, A. H., & Huang, D. C. S. (2021). BCL2 and MCL1 inhibitors for hematologic malignancies. *Blood*, 138(13), 1120–1136.
<https://doi.org/10.1182/blood.2020006785>
- Ruella, M., Korell, F., Porazzi, P., & Maus, M. V. (2023). Mechanisms of resistance to chimeric antigen receptor-T cells in haematological malignancies. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 22(12), 976–995. <https://doi.org/10.1038/s41573-023-00807-1>
- Salazar O., F. (2000). El sistema inmune, herramienta estratégica en la batalla contra el cáncer. *Revista Chilena de Pediatría*, 71(4). <https://doi.org/10.4067/s0370-41062000000400003>
- Sánchez-Martínez, D., Azaceta, G., Muntasell, A., Aguiló, N., Núñez, D., Gálvez, E. M., Naval, J., Anel, A., Palomera, L., Vilches, C., Marzo, I., Villalba, M., & Pardo, J. (2015). Human NK cells activated by EBV+ lymphoblastoid cells overcome anti-apoptotic mechanisms of drug resistance in haematological cancer cells. *Oncoimmunology*, 4(3), e991613. <https://doi.org/10.4161/2162402X.2014.991613>
- Sánchez-Martínez, D., Baroni, M. L., Gutierrez-Agüera, F., Roca-Ho, H., Blanch-Lombarte, O., González-García, S., Torrebadell, M., Junca, J., Ramírez-Orellana, M., Velasco-Hernández, T., Bueno, C., Fuster, J. L., Prado, J. G., Calvo, J., Uzan, B., Cools, J., Camos, M., Pflumio, F., Toribio, M. L., & Menéndez, P. (2019). Fratricide-resistant CD1a-specific CAR T cells for the treatment of cortical T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 133(21), 2291–2304. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-10-882944>
- Saxena, M., van der Burg, S. H., Melief, C. J. M., & Bhardwaj, N. (2021). Therapeutic cancer vaccines. *Nature Reviews. Cancer*, 21(6), 360–378.
<https://doi.org/10.1038/s41568-021-00346-0>
- Schreiber, R. D., Old, L. J., & Smyth, M. J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6024), 1565–1570. <https://doi.org/10.1126/science.1203486>
- SEOM. (2024). *El cáncer en cifras*. Seom.org. <https://seom.org/prensa/el-cancer-en-cifras>
- Souers, A. J., Leverson, J. D., Boghaert, E. R., Ackler, S. L., Catron, N. D., Chen, J., Dayton, B. D., Ding, H., Enschede, S. H., Fairbrother, W. J., Huang, D. C. S., Hymowitz, S. G., Jin, S., Khaw, S. L., Kovar, P. J., Lam, L. T., Lee, J., Maecker, H. L., Marsh, K. C., ... Elmore, S. W. (2013). ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature Medicine*, 19(2), 202–208.
<https://doi.org/10.1038/nm.3048>
- Thomas, L. (1959). Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States. *Journal of Cancer Therapy*, 4(5), 529–532.
- Townsend, P. A., Kozhevnikova, M. V., Cexus, O. N. F., Zamyatnin, A. A., Jr, & Soond, S. M. (2021). BH3-mimetics: recent developments in cancer therapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 40(1), 355.
<https://doi.org/10.1186/s13046-021-02157-5>
- van der Burg, S. H., Arens, R., Ossendorp, F., van Hall, T., & Melief, C. J. M. (2016). Vaccines for established cancer: overcoming the challenges posed by immune

- evasion. *Nature Reviews. Cancer*, 16(4), 219–233. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.16>
- Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annual Review of Immunology*, 29(1), 235–271. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101324>
- Waldman, A. D., Fritz, J. M., & Lenardo, M. J. (2020). A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nature Reviews. Immunology*, 20(11), 651–668. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0306-5>
- Warrington, R., Watson, W., Kim, H. L., & Antonetti, F. R. (2011). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology: Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 7 Suppl 1(S1), S1. <https://doi.org/10.1186/1710-1492-7-S1-S1>
- Wellhausen, N., Baek, J., Gill, S. I., & June, C. H. (2024). Enhancing cellular immunotherapies in cancer by engineering selective therapeutic resistance. *Nature Reviews. Cancer*, 24(9), 614–628. <https://doi.org/10.1038/s41568-024-00723-5>
- World Health Organization (2022). (2022). *Cancer EURO*. WHO Regional Office for Europe. <https://www.who.int/europe/health-topics/cancer/preventing-and-treating-cancer>
- Yang, R., Sun, L., Li, C.-F., Wang, Y.-H., Yao, J., Li, H., Yan, M., Chang, W.-C., Hsu, J.-M., Cha, J.-H., Hsu, J. L., Chou, C.-W., Sun, X., Deng, Y., Chou, C.-K., Yu, D., & Hung, M.-C. (2021). Galectin-9 interacts with PD-1 and TIM-3 to regulate T cell death and is a target for cancer immunotherapy. *Nature Communications*, 12(1), 832. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21099-2>
- Yao, Q., Weigel, B., & Kersey, J. (2007). Synergism between etoposide and 17-AAG in leukemia cells: critical roles for Hsp90, FLT3, topoisomerase II, Chk1, and Rad51. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(5), 1591–1600. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1750>
- Youle, R. J., & Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(1), 47–59. <https://doi.org/10.1038/nrm2308>
- Yuda, J., Will, C., Phillips, D. C., Abraham, L., Alvey, C., Avigdor, A., Buck, W., Besenhofer, L., Boghaert, E., Cheng, D., Cojocari, D., Doyle, K., Hansen, T. M., Huang, K., Johnson, E. F., Judd, A. S., Judge, R. A., Kalvass, J. C., Kunzer, A., ... Souers, A. J. (2023). Selective MCL-1 inhibitor ABBV-467 is efficacious in tumor models but is associated with cardiac troponin increases in patients. *Communications Medicine*, 3(1), 154. <https://doi.org/10.1038/s43856-023-00380-z>
- Zhang, N., Wu, J., Wang, Q., Liang, Y., Li, X., Chen, G., Ma, L., Liu, X., & Zhou, F. (2023). Global burden of hematologic malignancies and evolution patterns over the past 30 years. *Blood Cancer Journal*, 13(1), 82. <https://doi.org/10.1038/s41408-023-00853-3>

ANEXOS.

ANEXO 1.- Medios completos para los cultivos celulares-

A. Medios completos para líneas de leucemia y linfoma.

Medio de cultivo RPMI 1640 completo	Volumen añadido	Concentración
Medio RPMI-1640	500 mL	-
Suero fetal bovino (FBS)	50 mL	10 %
Penicilina-estreptomicina	5 mL	1 %
GlutaMAX	5 mL	1 %

B. Medio completo para HEK 293T.

Medio de cultivo DMEM completo	Volumen añadido	Concentración
Medio DMEM	500 mL	-
Suero fetal bovino (FBS)	50 mL	10 %
Penicilina-estreptomicina	5 mL	1 %
GlutaMAX	5 mL	1 %
Aminoácidos no esenciales	5 mL	1 %

C. Medio completo para PBMCs.

Medio de cultivo RPMI 1640 completo	Volumen añadido	Concentración
Medio RPMI-1640	500 mL	-
Suero fetal bovino (FBS)	50 mL	10 %
Penicilina-estreptomicina	5 mL	1 %
GlutaMAX	5 mL	1 %

ANEXO 2.- Resultados análisis por citometría de las células CD1a-CAR-T sobre las distintas líneas celulares empleadas.

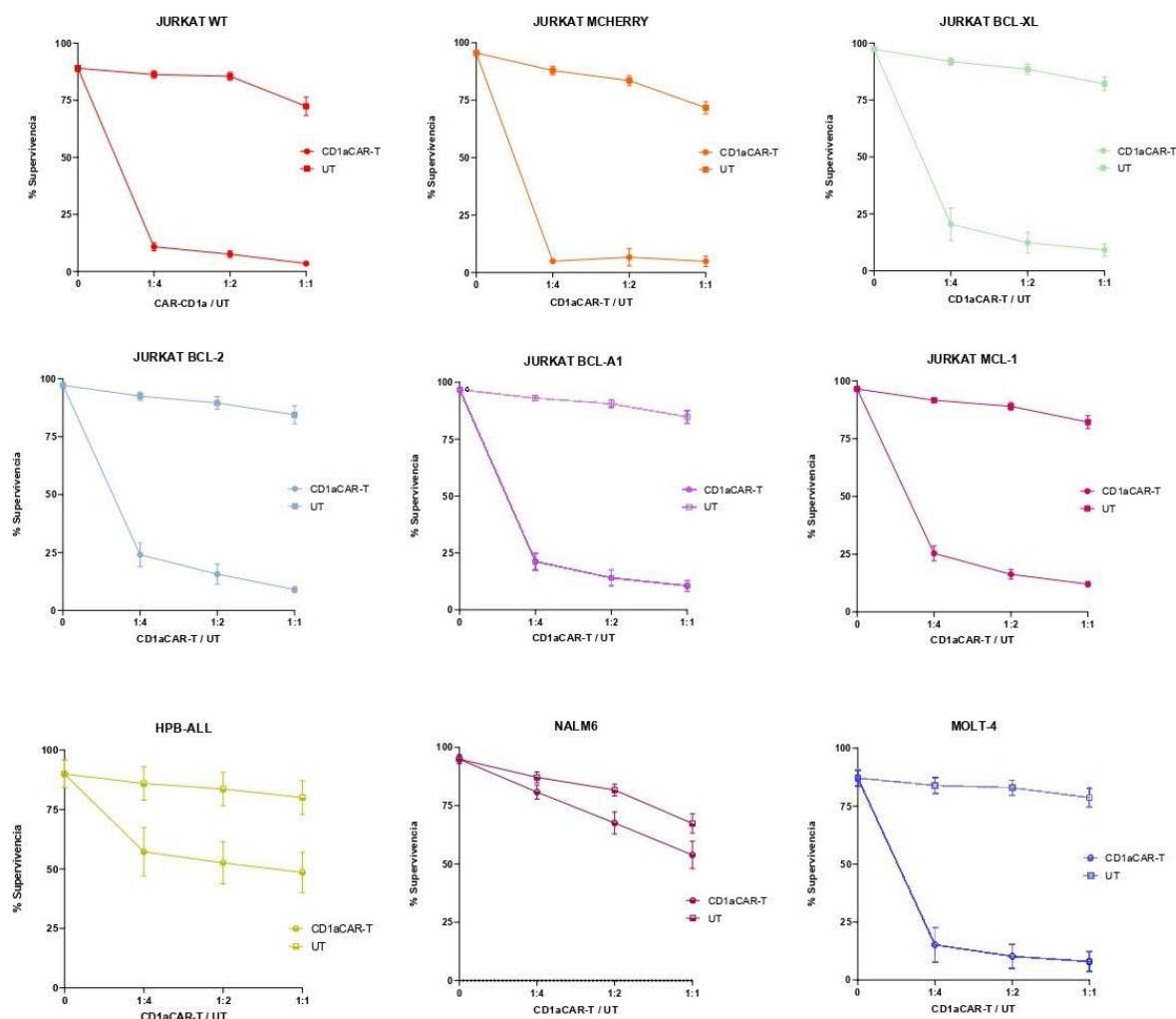


Figura 14 Bis.- Evaluación de la citotoxicidad mediada por CD1aCAR-T. Las gráficas muestran el porcentaje de supervivencia tras el co-cultivo de las células diana con células T transfectadas (CD1aCAR-T) o sin transfectar (UT) a diferentes ratios efecto:diana (1:4; 1:2; 1:1). Tras 24 h de incubación se observó reducción significativa de la viabilidad celular en las líneas con expresión del antígeno CD1a.

ANEXO 3.- Paneles de citometría.

A. Panel empleado en el citómetro MACSQuant Analyzer 10.

	Láser	Filtro	Canal	Reactivos	Fluoróforo	Casa comercial
Citotox CAR-T	Láser Rojo 640 nm	655-730 nm	FL7	Anexina V	APC	Inmunostep
	Láser azul 488 nm	655-730 nm	FL4	7-AAD	PerCP Vio700	Inmunostep
	Láser violeta 405 nm	450/50 nm	FL1	Cell Trace Violet	VioBlue	Inmunostep

	Láser	Filtro	Canal	Ac	Fluoróforo	Casa comercial
Linfocitos T	Láser azul 488 nm	525/50 nm	FL1	GFP	FITC	
	Láser Rojo 640 nm	655-730 nm	FL7	CD3	APC	Miltenyi Biotec
	Láser violeta 405 nm	450/50 nm	FL9	CD4	VioBlue	Miltenyi Biotec
	Láser azul 488 nm	585/40 nm	FL2-3	CD28	PE	Miltenyi Biotec

	Láser	Filtro	Canal	Ac 1º	Ac 2º	Fluoróforo
scFv CAR-T	Láser Rojo 640 nm	655-730 nm	FL7	Anti-scFv mouse (Biotina)	Streptavidina- PE	PE
				Anti-scFv human (Biotina)		

B. Panel empleado en el citómetro Beckman Gallios

Eficiencia transfección Jurkat	Láser	Filtro	Canal	Marcador reportero	Fluoróforo
	Láser amarillo 561 nm	615/20 nm	Y2	mCherry	PE-Vio 615