

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Aplicación inmunoterapéutica del agonista sintético AC11 de las células iNKT en modelos animales de tumor

Autor: Tomás Férez Roig

Director y tutor: Dr. Ángel Raúl Castaño García

2017-2023

Agradecimientos

Quiero dedicar esta tesis a todos los que han hecho posible que llegue a realizarse. En primer lugar, al Dr. Ángel Raúl Castaño, por haberme permitido estar todos estos años trabajando en su laboratorio para la consecución de todos los resultados. Luego, a la Dra. Eva M^a Martínez Cáceres y a su post-doc la Dra. M^a José Mansilla, que me aceptaron en su laboratorio cuando ni siquiera estaba graduado, permitiéndome empezar en el mundo de la investigación, enseñándome las bases sobre las que luego he ido añadiendo más y más conocimientos, y sin las cuales creo que no estaría con este documento entre mis manos. Por último, a nivel académico, me gustaría agradecer a Dolors Freixes, mi profesora de biología gracias a la cual descubrí mi pasión por esta ciencia y gracias a ella empecé la carrera que me ha llevado hasta aquí.

A nivel personal dar las gracias a todos los que han estado allí después de los largos días de experimentos, cuando los resultados dan lo contrario de lo que uno esperaría, o hay un artefacto experimental inesperado que te hace descartar datos que han supuesto mucho esfuerzo. En resumen, cuando uno le flaquean las fuerzas para continuar un día más, esa gente te levanta o te ayuda a no pensar en los problemas para que puedas continuar al día siguiente. Agradecer a mi familia, por haber estado allí y haberme animado a seguir este camino, en especial a mi padre, el cual por desgracia no ha podido llegar a leer esto, aunque siempre me apoyó para llegar a este destino; a Èlia Palma, quien por avatares del destino hemos seguido caminos diferentes, pero que durante muchos años hemos compartido alegrías y penas, y que siempre se los agradeceré; a Aurora, Joan, Eric, África y Guillem, personas con las que he compartido todos estos años y que me han apoyado en mis peores momentos; a la gente de Esport-7 karate, que siempre han estado dispuestos a ayudar a liberar tensiones; y por último Ona Fernández, quien ha sabido sacarme una sonrisa siempre y me ha ayudado en más de lo que se puede imaginar.

A todos ellos, muchas gracias.

Índice

Resumen	8
Abreviaciones	10
1. Introducción	12
1.1. Los linfocitos NKT	12
1.1.1. Células NKT tipo I o iNKT	13
1.1.2. Células NKT tipo II	15
1.2. La molécula presentadora CD1d	16
1.2.1. Expresión de CD1d	17
1.2.2. Obtención de antígenos	17
1.2.3. Interacción con el iTCR	18
1.3. Activación de las iNKT	19
1.3.1. Activación mediada por el iTCR	19
1.3.2. Independiente del iTCR	20
1.3.3. iNKT activadas	21
1.4. El cáncer	23
1.4.1. Principales causas	23
1.4.2. Primeras etapas de la enfermedad	24
1.4.3. Metástasis	26
1.4.4. Modelos usados para su estudio	28
1.4.4.1. Modelos de trasplante de células tumorales humanas a animales inmunodeficientes ...	29
1.4.4.2. Modelos de inoculación de una línea tumoral murina a individuos sanos	29
1.4.4.3. Modelos de alteraciones genéticas para el desarrollo espontáneo de tumores	31
1.4.4.4. Modelos animales humanizados	32
1.4.5. Modelos animales usados en esta tesis	33
1.5. Relación de las iNKT y el cáncer	34
1.5.1. Análogos de la α GC y su actividad	36
1.5.1.1. Modificaciones en las cadenas lipídicas	36

1.5.1.2.	Modificaciones en el enlace O-glicosídico.....	37
1.5.1.3.	Modificaciones en el azúcar	37
1.5.2.	Análogos aminociclitolos	38
1.5.3.	Estudios funcionales previos de AC11	40
2.	Objetivos.....	44
3.	Material y métodos	46
3.1.	Cultivo de las líneas tumorales	46
3.2.	Preparación de las suspensiones celulares para su administración <i>in vivo</i>	47
3.3.	Análisis de apoptosis en líneas tumorales	47
3.4.	Preparación de los tratamientos estimuladores.....	47
3.5.	Administración de las líneas tumorales y seguimiento de su crecimiento.....	48
3.6.	Recuperación de órganos y preparación para su análisis.....	50
3.7.	Análisis por citometría de flujo	52
3.8.	Análisis estadístico	54
4.	Resultados	56
4.1.	Establecimiento del protocolo de inducción de apoptosis.....	56
4.2.	Modelo tumoral intraperitoneal.....	59
4.3.	Modelos tumorales subcutáneos.....	62
4.3.1.	Modelo B16-F10	62
4.3.2.	Modelo B16-F10-OVA.....	65
4.3.3.	Modelo B16-F10-OVA con células tumorales apoptóticas.....	67
4.3.4.	Modelo EL-4.....	71
4.3.5.	Modelo EG-7.....	73
4.4.	Modelos de metástasis pulmonares	76
4.4.1.	Modelo B16-F10-OVA.....	76
4.4.2.	Modelo B16-F10	78
4.5.	Diferencias en la respuesta inmune entre sexos	82
4.6.	Ensayo con análogos glucosilados del α -S-galactosilceramida.....	87

5.	Discusión.....	92
5.1.	AC11 es capaz de estimular una respuesta antitumoral específica.....	93
5.2.	El potencial de AC11 como tratamiento a largo plazo.....	94
5.3.	AC11 es capaz de controlar el crecimiento tumoral en estadios avanzados de la enfermedad	94
5.4.	La respuesta generada por AC11 a través de las iNKT es de tipo Th1	95
5.5.	AC11 es capaz de generar respuesta citotóxica con una respuesta reducida a IFN γ	96
5.6.	El dimorfismo sexual es relevante en el estudio de la respuesta inmune.....	97
5.7.	Diferencias en los modelos de melanoma B16-F10.....	98
5.8.	AC11 tiene un efecto más consistente y específico en modelos de melanoma subcutáneo	100
5.9.	El efecto pernicioso de la α GC que no se observa en ningún caso con AC11.....	102
5.10.	Comparativa de AC11 con los análogos XZ	103
6.	Conclusiones.....	106
7.	Bibliografía.....	108

Resumen

Las iNKT son un subgrupo de linfocitos T que tienen características que las sitúan entre el sistema inmune innato y el adaptativo. Se caracterizan por tener un TCR invariante (en humanos) o semi-invariante (en ratones) el cual es capaz de reconocer la α GC presentado a través de CD1d. A pesar de definirse por reconocer esta molécula, pueden dar respuesta frente a otros glicolípidos presentados a través de CD1d, y se ha documentado a lo largo de los años que las características de dichos glicolípidos pueden conllevar un espectro de respuestas por parte de las iNKT muy amplio. Esta versatilidad combinada con el hecho que son capaces de modular la activación del sistema inmune de forma temprana para poder desarrollar una respuesta eficiente ha llevado a diversos investigadores a estudiar compuestos que sean capaces de dirigir la actividad de esta población en diversos modelos animales con el fin de desarrollar inmunoterapias contra diversas patologías.

En nuestros estudios hemos analizado la actividad del AC11, un análogo aminociclotol de la α GC, que en ensayos previos demostró ser capaz de estimular una respuesta de perfil citotóxico por parte de las iNKT murinas y humanas. Con estos datos, el objetivo era evaluar la actividad de nuestro compuesto en comparación con la α GC en modelos animales tumorales, analizar la respuesta inmune tras su inoculación y valorar si el tratamiento con este compuesto es capaz de generar una respuesta dirigida hacia epítomos tumorales. Se ha trabajado con las líneas de timoma RMA, EL-4 y EG-7 y con las líneas de mieloma B16-F10 y B16-F10-OVA. Para poder inducir actividad antitumoral contra antígenos específicos se han utilizado líneas que expresan OVA de pollo (B16-F10-OVA y EG-7). Pero, tanto para poder desarrollar respuestas antígeno específicas en líneas sin antígenos conocidos como para poder tener una aproximación más similar a los procesos observados en pacientes, se ha puesto a punto un protocolo de inducción de apoptosis a las diversas líneas tumorales con radiación UV. Estudiando el comportamiento de estas líneas y sus tratamientos se demostró que las líneas B16-F10 y B16-F10-OVA, a pesar de ser la segunda derivada de la primera, no se comportan de forma similar ni en cultivo ni tienen cinéticas de crecimiento en el animal similares, por lo que no se puede asumir que su única diferencia es la expresión de OVA.

El tratamiento en los distintos modelos tumorales ha permitido determinar que nuestro compuesto es capaz de inducir una respuesta inmune específica tanto en machos como en hembras en todos los modelos testados, con la salvedad del EG-7 en machos donde la combinación del AC11 con el OVA no ha tenido efecto alguno. Además, nuestro compuesto ha mostrado ser capaz de controlar el crecimiento tumoral a largo plazo, ya que al contrario que la α GC, que solo es capaz de retrasar el inicio del crecimiento de la masa tumoral, el AC11 ha mostrado un cambio sostenido en el tiempo de la cinética de crecimiento del tumor, lo cual es un indicativo que incluso en estadios avanzados nuestro tratamiento sigue teniendo efecto. Probablemente la falta de actividad antitumoral frente a EG-7 en machos sea debida al dimorfismo sexual de la respuesta de las iNKT

mediada por IFN γ , la cual es dependiente de estradiol en nuestra cepa murina. Ensayos funcionales también han puesto de manifiesto dicho dimorfismo, viéndose como en hembras el tratamiento con nuestro compuesto resulta tanto en una estimulación local como en diferentes órganos mientras que en machos nuestro compuesto prácticamente solo tiene efectos significativos en el lugar de inoculación.

Durante el desarrollo de nuestros estudios surgió la oportunidad de testar compuestos derivados del α -S-galactosilceramida, de entre los cuales los XZ7 y 11 en estudios previos fueron capaces de estimular las iNKT humanas *in vitro*. Al analizar su actividad en ratones, el XZ11 fue capaz de dar una respuesta detectable por citometría de flujo, aunque en dosis varias veces mayores que las utilizadas para la estimulación con el AC11. Esto pone de manifiesto el grado de eficiencia del AC11 para estimular la actividad Th1 de las iNKT.

Con estos resultados, se puede concluir que el AC11 es capaz de inducir una respuesta citotóxica antígeno específica y duradera en el tiempo, hecho que lo postula como un compuesto con gran potencial para el desarrollo de tratamientos antitumorales.

Abreviaciones

ADN: Ácido desoxirribonucleico

APC: célula presentadora de antígenos

ARN: Ácido ribonucleico

BCR: Receptor de los linfocitos B

BTK: Tirosin quinasa de Bruton

CDR: *Complementary-determining region*

CMFDA: Diacetato de 5-clorometilfluoresceína

CSF1: Factor estimulante de colonias 1

DC: Célula dendrítica

DMSO: Dimetilsulfóxido

DP: Doble positivo

EAE: *Experimental autoimmune encephalomyelitis*

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

eLPA: *ether lysophosphatidic acid*

FBS: Suero bobino fetal

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

HCMV: *Human cytomegalovirus*

HPV: *High-risk human papillomavirus*

ICAM: *Intracellular adhesion molecule*

IFN γ : Interferón gamma

iGB3: Isoglobotrihexosilceramida

IL: Interleuquina

iNKT: Linfocitos T *natural killer* invariantes

K.O.: *Knock out*

LFA: *Lymphocyte function-associated antigen*

LLT: *Lectin-like transcript*

LPS: Lipopolisacárido

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad

M ϕ : Macrófagos

NK: Células *natural killer*

NOD: *Non obese diabetic mice*

OVA: Ovoalbúmina

PALS: *Periarteriolar lymphoid tissue*

PBS: Tampón fosfato salino

PI: Ioduro de propidio

PI3K γ : Fosfoinositol 3-quinasa gamma

pLPE: *plasmalogen lysophosphatidic acid*

PLZF: *promyelocytic leukaemia zinc finger protein*

PRR: *Pattern-recognition receptor*

PTHrP: *parathyroid hormone-related protein*

RPM: Revoluciones por minuto

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SAP: *SLAM-associated protein*

SARS-CoV-2: *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*

SLAM: *Signaling lymphocytic activation molecule*

SYK: Tirosin quinasa del bazo

TCR: Receptor de los linfocitos T

TLR: *Toll-like receptor*

TNF: *Tumour necrosis factor*

VLDL: *Very low-density lipoprotein*

α GC: Alfa- galactosilceramida

1. Introducción

La presente tesis pretende analizar la actividad del análogo aminociclitólico de la α GC, AC11, en modelos animales de cáncer. Este análogo, previamente caracterizado funcionalmente *ex vivo*, deriva de un primer compuesto, HS44, que era débilmente reconocido por las células iNKT pero que inducía una potente respuesta antitumoral en modelos de metástasis pulmonar. AC11 presenta una configuración más semejante a la α GC y estimulaba más potentemente las células iNKT en cultivos celulares, así como en la inducción de respuesta sistémica de citoquinas *in vivo*. Por tanto, se ha estudiado en diversos modelos animales tumorales por cuanto podría inducir una respuesta antitumoral más eficaz y universal, al inducir una respuesta inmune exclusivamente Th1, la más adecuada para controlar el crecimiento tumoral. Además, este agonista es capaz de estimular las iNKT humanas en cultivo *ex vivo*, por lo cual tiene potencial inmunoterapéutico para la aplicación clínica¹. La necesidad de mejorar los tratamientos actuales contra el cáncer basados en la activación de la respuesta inmune inducida por las células iNKT radica en las limitaciones mostradas por el uso del agonista prototípico α GC en múltiples ensayos clínicos, a pesar del alto potencial que mostraban los estudios preclínicos en modelos animales. Esta tesis se ha centrado en intentar generar una respuesta antitumoral específica, comparando con la respuesta innata en ausencia de antígeno tumoral, mediante el uso de distintas estrategias estimuladoras de las iNKT y en diversos modelos tumorales, con el objetivo de evaluar la distinta eficacia del control del tumor en las distintas situaciones que permitiese una generalización del tratamiento o bien la selección del tipo de tumor más adecuado para un futuro uso terapéutico. Además, se ha analizado las diferencias de la respuesta en función del sexo, factor que puede ser relevante en determinados tipos tumorales.

1.1. Los linfocitos NKT

Los NKT son un subgrupo de linfocitos T que engloban distintos tipos celulares con características diferentes, mayoritariamente específicos de estructuras lipídicas, en contraposición a los TCR de linfocitos convencionales que reconocen péptidos². Esto se debe a que están mayoritariamente restringidos por moléculas presentadoras de antígeno no clásicas (o MHC-like), la familia de moléculas CD1³. Se usó la denominación de NKT o células T *natural killer* porque se describieron como linfocitos T que expresan el receptor NK1.1, si bien esta definición es muy amplia y abraza un conjunto heterogéneo de linfocitos, incluyendo células que no expresan dicho marcador⁴. Funcionalmente se caracterizan por poder desarrollar una respuesta inmune específica contra lípidos, mayoritariamente glicolípidos, pero a su vez tienen características de células de la inmunidad innata como una rápida producción de citoquinas (debido a tener ARNm pre-formado), permitiendo que sean de las primeras células en responder contra una infección, incluso en ausencia de

reconocimiento específico⁵. Esta rápida respuesta, su capacidad de producción de citoquinas de amplio espectro y la expresión de moléculas coestimuladoras, les permite activar numerosos tipos celulares inmunes dirigiendo la respuesta inmune efectiva contra el estímulo antigénico, considerándose un puente entre la respuesta innata y la adaptativa.

Dentro de esta familia de linfocitos, se han descrito 3 subgrupos principales: Las NKT de tipo I, más conocidas como iNKT, se caracterizan por tener un TCR semi invariante (o iTCR), estar restringidos por CD1d y responder cuando esta molécula está cargada con α GC, un glicolípido aislado en *Agaelas mauritanus* que constituye el agonista prototípico⁶. Las NKT de tipo II también son restringidas por CD1d pero no tienen un iTCR, motivo por el cual no reconocen α GC pero siguen respondiendo a la presentación de otros antígenos lipídicos, como la 3-O-sulfatogalactosilceramida, dependiendo de su TCR variable⁷. Estas se descubrieron al hacer un ratón K.O. parra el MHC II, el cual reveló la existencia de dicha población⁸. Un tercer grupo de NKT incluye todos los linfocitos T con receptores NK los cuales no responden a la presentación por CD1d, aunque pueden estar restringidos por otros isotipos de CD1 o corresponder con los linfocitos T clásicos activados que expresan receptores NK⁹.

1.1.1. Células NKT tipo I o iNKT

La característica principal y definitoria de esta población es la presencia del TCR semi-invariante. En el caso de los ratones, el iTCR está formado por las cadenas $V\alpha 14$ - $J\alpha 18$ / $V\beta 2$, 7, 8.1, 8.2 o 8.3^{10,11}, mientras que en humanos está formado por $V\alpha 24$ - $J\alpha 18$ / $V\beta 11$ ¹². A pesar de ser de especies diferentes, las iNKT de humanos y las murinas son capaces de reconocer α GC presentado a través de CD1d de cualquiera de las dos especies³. Como células a caballo entre la respuesta innata y adaptativa presentan características típicas de células NK, como la presencia de gránulos citotóxicos de perforina y granzima en su citoplasma¹³. La estructura tridimensional del complejo iTCR-CD1d- α GC ha demostrado que la interacción con el CD1d cargado con su antígeno es relativamente rígida¹², revelando un funcionamiento similar a los PRR, receptores característicos de la respuesta innata¹⁴, en lugar del acoplamiento conformacional y cinético de los complejos TCR-MHC-péptido.

En ratón, estas células representan el 0.5-1% de los linfocitos T en timo, sangre y nódulos linfáticos; aproximadamente el 2,5% en bazo y nódulos mesentéricos y pancreáticos; y cerca del 30% en el hígado. En humanos las iNKT esta población tiene una preponderancia muy inferior, siendo además extraordinariamente variable entre la población. Así, en sangre, el porcentaje de iNKT, puede variar considerablemente desde el mínimo (0.01%) hasta el 1%, hecho al cual aún no se le ha encontrado una explicación, pero que parece estar bajo regulación genética³. También se han detectado diferencias entre sexos, probablemente debido a factores hormonales^{3,15}, siendo más abundantes en hembras¹⁶ y con un mayor sesgo a la producción de IFN γ , la citoquina prototípica de la respuesta Th1, relacionada con la producción mucho más mayoritaria de

estradiol¹⁷. También se ha hipotetizado que este dimorfismo sexual de las iNKT sea debido a la existencia de genes ligados al cromosoma X que regulen su desarrollo¹⁸.

Como parte del compartimento T, se desarrollan en el timo¹⁸ y de forma similar a los linfocitos T convencionales hasta el estadio de linfocitos doble positivos¹⁹. En este momento, los linfocitos que hayan reordenado un iTCR podrán reconocer un lípido presentado por CD1d²⁰, por otro timocito DP, en lugar de interactuar con una APC como sucede típicamente con los linfocitos T clásicos. Algunos de los lípidos endógenos presentados por CD1d que se han identificado en timocitos DP son pLPE y eLPA²¹. Esta interacción debe dar una señal fuerte a través del iTCR para dar una activación de factores de transcripción que finaliza con la expresión de Egr2 y PLZF, siendo este último el factor clave para la diferenciación de los timocitos a iNKT²², así como a otros linfocitos innatos. Durante la selección positiva, a parte de la señalización del iTCR, son fundamentales las señales de moléculas SLAM (Slamf1 y Slamf6), con las moléculas adaptadoras SAP²³, permitiendo el reclutamiento de la tirosin quinasa Fyn²⁴. Tanto Fyn como SAP son claves en el desarrollo de las iNKT, ya que los ratones K.O. presentan un número muy reducido, pero sin afectar el desarrollo de los linfocitos T convencionales^{23,24}.

Tras la selección positiva de los timocitos DP, éstos pasan por 4 estadios de diferenciación en función de la expresión de CD44, CD24 y NK1.1²⁵, perdiendo la expresión de CD8 y se volviéndose capaces de producir tanto IL-4 como IFN γ ²⁶. Es en este momento donde se produce la diferenciación que da lugar a los diversos fenotipos de las iNKT, NKT1, NKT2 y NKT17^{25,27,28}.

El desarrollo de las iNKT empieza por la denominada fase S0, en la cual son CD24⁺CD44⁺NK1.1⁻ y consecutivamente pierden la expresión de CD24, ganan la de CD44 y por último expresan NK1.1, definiendo así las fases S1-3^{26,29,30}. Sin embargo, no es un proceso lineal y homogéneo: hay células NKT17 que se desarrollan de formas alternativas o iNKT que nunca llegan a expresar NK1.1³¹. Otro esquema propuesto de desarrollo en base a expresión genética³², a partir de un progenitor común que expresa Egr2 y CD24 y puede devenir en NKT2 o NKT17 (equivalente a la fase S2), mientras que si llega a el estadio S3 deviene en una NKT1³⁰. También se ha observado que timocitos DN pueden desarrollarse hasta NKT1 CD4⁻, aunque en un porcentaje mínimo³³. Asimismo, células iNKT CCR7⁺ pueden emigrar del timo con un fenotipo NKT0³⁴, dándose una maduración en periferia³⁵. Cada subpoblación expresa niveles diferentes de iTCR, siendo las NKT1 las que tienen un valor más bajo, las NKT17 con un valor intermedio y por último las NKT2 con el valor más alto, correlacionando directamente con el estímulo recibido durante el desarrollo^{36,37}. Además, el reconocimiento de CD1d de la periferia determina la adquisición de diferentes características en función del tejido en el que estén³⁸. Así pues, las iNKT tienen un desarrollo complejo y con más ramificaciones de las que su relativamente baja proporción lleva a sospechar, poniendo de manifiesto que pueden ser más relevantes de lo que su preponderancia llevó a pensar inicialmente.

Una vez salen del timo, las iNKT en condiciones de homeostasis se pueden localizar dispersas por el bazo (en el PALS, la pulpa roja, la zona marginal y próximas a la zona vascular). Al darse una estimulación por glicolípidos, estas células se redistribuyen hacia las proximidades de las zonas vasculares y a la zona germinal³⁹. En el hígado también se localizan cerca del torrente sanguíneo, concretamente en el lumen de los sinusoides venosos, siendo retenidas en estos por la interacción entre ICAM-1 (presente en el endotelio) y LFA-1 (integrina expresada en las iNKT por la inducción de PLZF)⁴⁰ e interaccionan con las células de Kupffer. Esta localización permite a las iNKT dar una respuesta rápida frente a la aparición de lípidos o glicolípidos extraños que hayan llegado a la sangre, evitando así la diseminación del posible patógeno por el organismo⁴¹.

Las iNKT que salen del timo pueden ser CD4⁺ o CD4⁻. Siendo las CD4⁺ productoras de citoquinas tipo Th2, aunque no de forma excluyente⁴². En humanos se ha encontrado una población reducida que expresa CD8, con una mayor capacidad de producción de IFN γ y mayor actividad citotóxica⁴³. En general, las NKT1 son mayoritariamente CD4⁻NK1.1⁺, se caracterizan por expresar altos niveles del factor de transcripción T-bet y producir una gran cantidad de IFN γ ²⁸. Expresan IL-15R, el cual parece ser imprescindible para su expansión y/o su supervivencia⁴⁴ y son predominantes en hígado y bazo⁴⁵.

Las NKT2, mayoritariamente CD4⁺, se caracterizan por la expresión del factor de transcripción GATA3²⁸ y el receptor β de la IL-17⁴⁶. Producen altas cantidades de IL-4 e IL-13²⁸ y se localizan principalmente en la médula del timo, en la zona T de los nódulos linfáticos⁴⁵ y en los pulmones⁴⁷.

Las NKT17 se definen como CD4⁻²⁸, NK1.1⁻, alta expresión de CCR6³¹, expresión del receptor β de la IL17 y producción de IL-17A⁴⁷. El factor de transcripción que les caracteriza es ROR- γ t, y su localización es principalmente nódulos linfáticos periféricos, piel y pulmones⁴⁸.

Además, se han descrito células iNKTfh con funciones *follicular helper* o incluso con funciones reguladoras tipo Th10²⁸.

1.1.2. Células NKT tipo II

Esta población está conformada por los linfocitos T restringidos por CD1d pero que no presentan el iTCR^{49,50}. Al contar con un amplio repertorio de TCR⁵¹, su estudio ha sido más complejo por no disponer de un marcador específico. Son capaces de dar respuesta frente a diversos antígenos lipídicos⁵¹, siendo un ejemplo de estos la 3-O-sulfatogalactosilceramida (abundante en la mielina del sistema nervioso central⁵²). Esta población se descubrió con un ratón K.O. para el MHC II, en los que se detectaron una gran cantidad de linfocitos T CD4⁺, siendo la mayoría capaces de interaccionar con CD1d⁸, pudiendo ser sus ligandos esfingolípidos, glicerolípidos o fosfolípidos^{51,53}. Esta subpoblación es capaz de reaccionar contra lípidos de bacterias como *Corynebacterium glutamicum* o *Mycobacterium tuberculosis*⁵⁰ y así como antígenos peptídicos hidrofóbicos presentados por CD1d⁵⁴.

Además de por la presencia del iTCR y la especificidad antigénica, las células NKT de tipo II se distinguen por una expresión de PLZF intermedia⁵⁵ y una mayor producción de IL-13⁵². Al igual que las iNKT-I, pueden ser activadas de forma independiente de antígeno⁵⁰ y se relacionan con diversas enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple⁵⁶, diabetes tipo I⁵⁷ o colitis ulcerosa⁵⁸; enfermedades infecciosas como la tuberculosis⁵⁹; o incluso con la inmunidad tumoral⁶⁰, teniendo roles distintos en cada una de estas enfermedades.

1.2. La molécula presentadora CD1d

Esta molécula es la responsable de la presentación de glicolípidos a las NKT tipo I y tipo II. Es una de las moléculas de la familia CD1, de las que existen 5 isotipos en humanos, el grupo I, conformado por CD1a, CD1b, CD1c y CD1e³; y el grupo II con CD1d⁶¹. Ambos grupos se caracterizan por presentar ligandos de naturaleza lipídica tanto endógenas como patogénicas¹².

Las moléculas CD1 se caracterizan por tener un surco hidrofóbico con cavidades profundas, ideales para unir lípidos^{62,63}. En el caso de CD1d, este surco se caracteriza por tener un bolsillo A' y otro F', con estructuras y tamaños diferentes a las otras moléculas CD1, de tal forma que los distintos isotipos tienen afinidad por diferentes lípidos, aunque el repertorio que pueden unir se solapa parcialmente^{64,65}. Al unirse los antígenos a estas moléculas presentadoras por su parte apolar insertada en los bolsillos hidrofóbicos, se expone la parte polar de los mismos (**Figura 1**), típicamente carbohidratos, la cual interacciona directamente con el TCR⁶⁴.

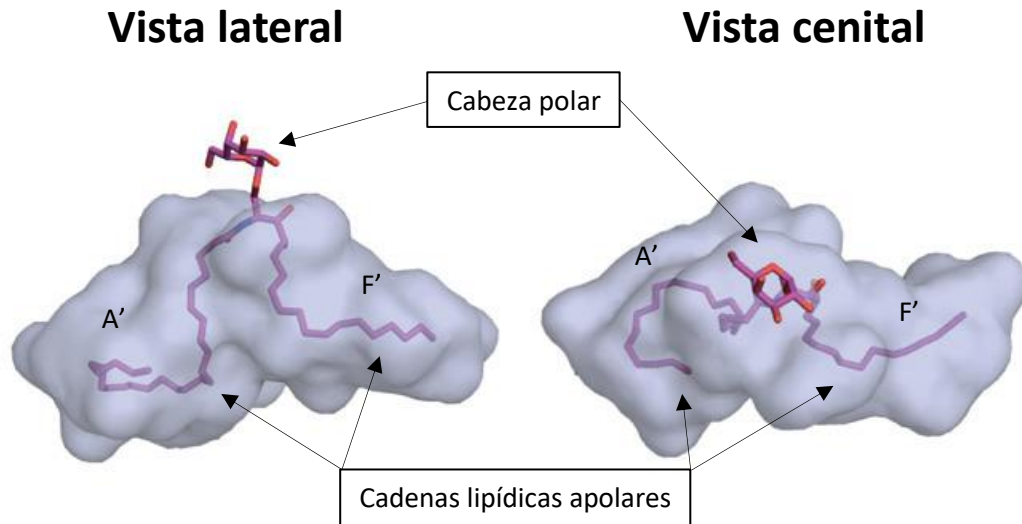


Figura 1: Representación tridimensional del CD1d cargado con un glicolípido. En esta representación se puede ver como el CD1d (gris), al cargarse con el glicolípido, introduce las partes apolares los bolsillos del surco hidrofóbico que presenta su estructura, dejando únicamente la cabeza polar al exterior. Representación extraída de [Rossjohn et al.](#)

1.2.1. Expresión de CD1d

CD1d es una molécula esencialmente monomórfica⁶⁶ y altamente conservada entre ratón y humano¹². A nivel de órganos, la expresión de CD1a-c se da principalmente en el timo, y prácticamente no se detectan fuera de este a excepción de células de la línea hematopoyética como las células de Langerhans, linfocitos B y células dendríticas de la dermis. En cambio, el CD1d tiene un patrón de expresión opuesto, expresándose a niveles muy bajos a nivel central, pero aumentando en periferia, tanto en tejidos linfoides como en páncreas, órganos reproductivos masculinos, tejido gastrointestinal entre otros⁶⁷. A nivel de tipos celulares, se puede detectar en células de origen hematopoyético como linfocitos B, T, timocitos, DC y macrófagos⁶⁸, pero también la presentan las células epiteliales⁶⁹, células de Schwann⁷⁰ y hepatocitos⁷¹. El mayor nivel de expresión de CD1d en homeostasis son las APC, ya que son las células especializadas en la función principal de esta molécula, la presentación antigénica⁷².

1.2.2. Obtención de antígenos

La naturaleza hidrofóbica de los ligandos de CD1d determina particularidades en las rutas de presentación y procesamiento antigénico que las hacen muy diferentes de los ligandos peptídicos de MHC reconocidos por los linfocitos T clásicos. Una de las vías de obtención de los ligandos lipídicos es a través de las VLDL del torrente sanguíneo⁷³ y su endocitosis por receptores específicos o carroñeros⁷⁴. Otra posibilidad de obtención de glicolípidos es su internalización a través de los receptores de lectinas tipo C que presentan las APC, después de la captura. Los linfocitos B son capaces de internalizar lípidos unidos al antígeno que reconoce su BCR, y posteriormente son capaces de estimular de forma muy eficiente a las iNKT⁷⁵. Una vez internalizados, los antígenos lipídicos se pueden procesar por mecanismos intracelulares, con la participación de chaperonas

específicas como las saponinas que permiten la extracción y el intercambio lipídico entre las estructuras vesiculares y complejos proteína-lípido para su carga en CD1⁷⁴. Por último, se ha visto que hay glicolípidos que se pueden unir directamente al CD1d sin necesidad de un procesamiento intracelular, pero estos deben ser de cadena corta y con muy pocas insaturaciones, factores que reducen su hidrofobicidad (permitiendo así que estén libres en el medio extracelular)⁷⁶.

1.2.3. Interacción con el iTCR

Se ha determinado que la única parte variable del iTCR es la región CDR3 β , la cual incluye las uniones V β -D β -J β que crean una gran variabilidad en los *loops* de la región CDR3⁷⁷. La cadena V α es la principal responsable de la interacción con CD1d y de la especificidad del reconocimiento glicolípido, mientras que la cadena β modula la afinidad del TCR, lo cual indirectamente contribuye al reconocimiento preferencial de ciertos antígenos^{77,78}. De hecho, se ha detectado que la parte que conforma los CDR1 y 3 de la cadena α se une directamente a los glicolípidos, mientras que la parte de la cadena β que conforma el CDR3 no tiene ningún rol directo en el reconocimiento de la α GC, pudiendo tener solo algún efecto en el reconocimiento de la molécula presentada solo a través de la modificación de otras zonas de la molécula con las que interactúe por juxtaposición⁷⁹.

La interacción TCR-MHC amplia divergencia conformacional, de tal forma que los ángulos que forman los ejes de las dos moléculas oscilan desde una posición perpendicular hasta llegar a ser paralelos⁸⁰. En el caso de la interacción iTCR-CD1d, por el contrario, se ha observado una elevada rigidez en la misma⁶⁴, adoptando ambas moléculas una disposición prácticamente paralela de sus ejes⁸¹, independientemente del antígeno cargado⁸⁰ tanto en humanos como en ratón¹⁴. Esta es una de las características que favorece la alta velocidad del reconocimiento de antígenos por el iTCR, siendo una interacción que se asemeja a las observadas en la respuesta inmune innata⁶⁴. El contacto entre el antígeno y el iTCR se da en la cabeza polar del antígeno, la cual contacta con la cadena α del TCR, con los segmentos CDR1 y CDR3¹⁴, y estas interacciones son clave para entender la potencia estimuladora del antígeno⁶⁴. Por otro lado, la cadena β del iTCR interacciona con los residuos que se han insertado en el bolsillo F' a través del CDR2, el cual forma una superficie hidrofóbica que cubre la zona permitiendo interaccionar¹⁴, y aunque no participa en el reconocimiento del antígeno propiamente dicho, este contacto es clave para permitir la unión iTCR-CD1d⁶⁴. Los cambios conformacionales inducidos en V α por las distintas cadenas β y sus reordenamientos modulan el reconocimiento antigénico aunque no se dé una participación directa de la cadena V β ⁸².

Modificaciones tanto en la cadena lipídica del antígeno como en la cabeza polar pueden modular la actividad de las iNKT^{80,83}. Las modificaciones de la cabeza polar afectan principalmente a la afinidad del iTCR-CD1d⁸⁴, mientras que las modificaciones en las cadenas afectan a través de cambios conformacionales en su lugar de unión⁸⁰. Un ejemplo es el OCH (un análogo de la α GC con la esfingosina truncada⁸⁵), el cual genera una

respuesta tipo Th2 por parte de las iNKT⁸⁶, debido a un cambio conformacional en el bolsillo F' al unir este compuesto⁸⁷. Por tanto, a pesar de ser una interacción de tipo innato y que implica una respuesta rápida, vemos que el reconocimiento de la molécula presentada por el CD1d es específico, debido a la modulación de la respuesta en función del antígeno cargado. Esta capacidad de modulación del tipo de respuesta en función del ligando reconocido es una de las posibilidades terapéuticas más interesantes porque podría permitir manipular la respuesta en función de las necesidades y las especificidades del desafío antigénico.

1.3. Activación de las iNKT

Como se ha mencionado con anterioridad, esta población se distingue de otras células del sistema inmune por una activación rápida y tener un reconocimiento específico de sus antígenos. Estas dos actividades son las principales causas por las que se considera que son un puente entre la inmunidad innata y adquirida⁸⁸. Su capacidad de responder rápidamente a los estímulos viene dada por presentar un estado de “alerta” permanente⁵, presentando un fenotipo activado/memoria, permitiéndoles responder como una célula de la inmunidad innata frente a señales de daño y citoquinas pro-inflamatorias^{89,90} y a su vez disponen de prácticamente todas las capacidades efectoras de un linfocito T⁸⁸.

1.3.1. Activación mediada por el iTCR

Prácticamente la totalidad de los antígenos que pueden reconocer las iNKT se pueden englobar en dos categorías: glicolípidos basados en ceramida (glicoesfingolípidos) y glicolípidos basados en glicerol (fosfolípidos de membrana). La α GC, compuesto por antonomasia utilizado para identificar y estimular esta población, es un glicoesfingolípidos. Su reconocimiento se debe a que los mamíferos no tenemos la maquinaria para unir carbohidratos a lípidos en una orientación α , por lo que esta disposición en la α GC permite reconocerlo fácilmente como un elemento ajeno al individuo⁸⁸. Moléculas con esta configuración se han descrito en patógenos como *Borrelia burgdorferi*⁹¹ o *Streptococcus pneumoniae*⁹². A parte de esta configuración, hay otros factores que permiten el reconocimiento de antígenos lipídicos de diversos patógenos también por el iTCR, pero el factor que les da su antigenicidad no está tan bien descrito⁸⁸, como se demuestra con el β glicoesfingolípidos GD3, el cual es capaz de estimular una pequeña subpoblación de iNKT⁹³.

A pesar de que el iTCR reconoce preponderantemente antígenos de patógenos, este también puede unir glicolípidos endógenos. Evidencias de esta actividad son el que al activar APC a través de TLR, estas son capaces de estimular las iNKT a través de su iTCR^{89,94} o en el hecho que estas células se activen durante infecciones virales, patologías tumorales o enfermedades autoinmunes⁸⁸, patologías en las que ningún antígeno exógeno se puede unir al iTCR. Esta actividad llevó a la búsqueda de los glicolípidos endógenos son reconocidos por el

iTCR. En primer lugar, se encontró iGb3⁹⁵, aunque a posteriori se descubrió que la mayoría de individuos no presentan un iTCR capaz de reconocerlo⁹⁶. Diversas aproximaciones se utilizaron para intentar hallar otros posibles ligandos endógenos, como animales deficientes en rutas metabólicas⁹⁵, la caracterización de moléculas con capacidad de unirse al CD1d⁹⁷⁻¹⁰⁰ y los glicolípidos estructuralmente más similares a la α GC provenientes de mamíferos¹⁰¹. Actualmente aún se desconoce cuáles son estos ligandos endógenos, solo se han encontrado glicolípidos que pueden reconocerse por una parte de las iNKT o que se presentan durante la selección tímica pero que en periferia no son capaces de activarlas, como es el caso de la lisofosfatidiletanolamina plasmalógena²¹.

1.3.2. Independiente del iTCR

La activación de las iNKT a través de citoquinas es de vital importancia para sus funciones fisiológicas^{90,102}, pudiéndose dar a través de estas una actividad similar a la coestimulación que recibe un linfocito T convencional junto a la presentación de un antígeno^{88,103}. Esta señalización parece tener una relevancia tal que se han encontrado subpoblaciones de iNKT expresando en reposo receptores de de IL-12^{90,102}, IL-18^{104,105}, IL-23^{106,107} e IL-25^{46,108} y pueden ser activadas por estas.

Las células iNKT pueden ser activadas sin la participación del iTCR. Así se ha descrito que algunas infecciones bacterianas y víricas generan una producción de IL-12 por parte de las APC tan importante que permiten la activación de las iNKT independientemente del reconocimiento de un antígeno a través del iTCR^{90,109,110}. Este proceso puede llegar a ser incluso determinante en la activación, porque cuando el estímulo faltante es la IL-12 (es decir, tenemos APC cargadas con un antígeno en el CD1d que puede interactuar con el iTCR pero no está presente dicha citoquina), no se consigue una activación productiva de las iNKT en respuesta a algunos patógenos⁸⁸, hecho que indica el papel crítico de la IL-12 para estimular esta población linfocítica frente a ciertos patógenos^{111,112}.

La expresión de receptores NK¹¹³ también puede tener un papel importante en su activación y regulación¹¹⁴ independientemente del reconocimiento antigénico. En el caso de NK1.1, aunque no se conoce cuál es su ligando endógeno, se ha visto que, al unir un anticuerpo específico para dicho receptor, la señal generada es suficiente para activar los linfocitos T NK1.1¹¹⁵. En el caso de las iNKT humanas posteriormente a su activación aumentan la expresión de CD161, y a su vez las APC aumentan la expresión de su ligando (LLT1 o CLEC2D), inhibiendo la actividad de tipo NK, pero a su vez estimulando la liberación de IFN γ ¹¹⁶. Otro receptor típico de células NK expresado en las iNKT es el NKG2D, cuya función es reconocer marcadores de estrés¹¹⁷, contribuyendo a la activación de las iNKT e incluso inducir su activación independiente del iTCR¹¹⁸.

Estas dos formas de activar las iNKT no son independientes, al contrario, se influyen para acabar con una activación de la célula diana. Un ejemplo de esta integración observa cuando el antígeno presentado a través de CD1d reconocido de forma débil por el iTCR, en vez de activar directamente la funcionalidad de la célula,

aumenta la sensibilidad de los receptores de citoquinas de mediante modificaciones epigenéticas¹¹⁹. Por estas interacciones entre las vías de activación, se considera las iNKT se activan a través de la integración tanto de las señales a través del iTCR como de la activación de los distintos receptores⁸⁸.

1.3.3. iNKT activadas

Tras la activación de las iNKT bien dependiente o independiente del iTCR, éstas pueden desarrollar una gran diversidad de actuaciones. Principalmente, su función se basa en estimular una u otra respuesta del sistema inmune, secretando citoquinas características de los diversos perfiles de actividad inmunitaria como son IFN γ , TNF, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21 y GM-CSF^{42,48}. En general, se ha visto que la activación a través de IL-12 o con agonistas de TLR solo generan una respuesta Th1^{90,105}. Por el contrario, dependiendo de las características del glicolípido que activa a las iNKT pueden favorecer una respuesta de tipo Th1^{85,120} o una de tipo Th2^{121,122}. Los glicolípidos pueden generar una u otra respuesta de las iNKT debido a diversos factores, como pueden ser la cinética de unión al CD1d, la localización subcelular del glicolípido al cargarse en la molécula presentadora, cuál es la APC lo presenta^{76,123-125} y la solubilidad de los glicolípidos. Este último factor puede definir los demás, dado que los glicolípidos más hidrosolubles son capaces de cargarse en el CD1d sin necesidad de pasar por vías intracelulares, lo cual hace que sean presentados por toda la membrana de forma dispersa, favoreciendo una respuesta de tipo Th2^{29,126}, mientras que los menos hidrosolubles se presentan concentrados en los *lipid rafts*, o balsas de lípidos, provienen del procesamiento a través de vías intracelulares y favorecen una respuesta tipo Th1¹²⁷.

La interacción entre las iNKT y las APC también es otro factor relevante para determinar el tipo de respuesta a desarrollar. Si la presentación es a través de células dendríticas y macrófagos, la respuesta consecuente se caracteriza por la producción de IFN γ y la transactivación de células NK^{121,125,128,129}. Esta activación es bidireccional: por un lado, las DCs producen IL-12 con lo que se estimula la respuesta de las iNKT^{89,94,96}, y a su vez las iNKT expresan CD40⁶ con el cual estimulan la actividad de las DC, que consecuentemente producen más IL-12⁸⁸. Esta interacción permite la transactivación de las NK⁸⁹ y estimula la actividad de los linfocitos T, tanto CD4⁺ como CD8⁺^{128,130}. Se activa por tanto una respuesta tanto del sistema inmune innato (células NK) como del adaptativo (linfocitos T), evidenciando las potencialidades de la estimulación de las células iNKT.

Las células iNKT pueden estimular la respuesta humoral a través de la interacción directa con los linfocitos B. Hemos descrito cómo lípidos asociados a antígenos reconocidos por el BCR generan una respuesta iNKT de tipo Th2. La internalización del antígeno permite el procesamiento y la presentación por CD1d en el linfocito B. De hecho, los linfocitos B¹³¹ de la zona marginal del bazo se caracterizan por el mayor nivel de expresión de CD1d. La activación por parte de las iNKT induce una rápida maduración de la afinidad y una producción masiva y aguda de inmunoglobulinas, pero sin desarrollar memoria a largo plazo^{132,133}.

Las células iNKT también interactúan de forma singular con los macrófagos. En concreto, las células de Kupffer del hígado son fundamentales para la activación de las iNKT frente a patógenos como *Borrelia burgdorferi*⁴¹. Los macrófagos CD169⁺ del nódulo linfático, son particularmente eficientes en la presentación de lípidos¹³⁴. Por su parte, las iNKT activadas son capaces de modular la maduración de los macrófagos, produciendo IFN γ , estimulando la función fagocítica de los mismos. Esta actividad es especialmente relevante en infecciones pulmonares como *Pseudomonas aeruginosa* o *Mycobacterium tuberculosis*^{135,136}. Además, a través de la producción de GM-CSF inducen la mielopoiesis y actúan sobre los monocitos del torrente sanguíneo, induciéndolos a hacer funciones de DC^{137,138}.

Las iNKT también actúan sobre los granulocitos, induciendo su reclutamiento mediante la secreción de CXCL12^{135,139}, en interacciones bidireccionales como hemos visto anteriormente. Por ejemplo, en la respuesta a la proteína del suero amiloide A1, promotora del desarrollo de neutrófilos inmunosupresores productores de IL-10. Las iNKT que interactúan con dichos neutrófilos pueden revertir su fenotipo inmunosupresor y promover la producción de IL-12, de relevancia en la respuesta antitumoral y en la defensa contra microorganismos¹⁴⁰. Por el contrario, los neutrófilos pueden inhibir la secreción de citoquinas de las iNKT, limitando su capacidad inflamatoria, aunque el mecanismo de esta regulación aún no está definido¹⁴¹.

Pero las células iNKT también tienen capacidades reguladoras. Por ejemplo, pueden polarizar a los macrófagos hacia un fenotipo M2, reduciendo la respuesta inflamatoria en el caso de la denominada inflamación adiposa, capacidad que se pierde en obesidad^{142,143}. Otro ejemplo es la capacidad de alterar el fenotipo de los macrófagos asociados a tumores o eliminarlos, un segundo mecanismo de la actividad antitumoral indirecto a través del control de poblaciones celulares que favorecen el crecimiento del tumor^{144,145}.

Se puede concluir por tanto que las iNKT tienen un amplio espectro de actividades, dependientes tanto de características intrínsecas del antígeno presentado, de la forma de en la membrana celular, de la célula con la que se esté interactuando y del microambiente en el momento de la presentación. Todos estos factores son los que propician la amplia variedad de actividades que pueden tener estas células, radicando ahí una de las dificultades del uso terapéutico de las células iNKT y de la necesidad de descubrir agonistas con una funcionalidad más definida que permita un uso controlado con objeto de obtener tratamientos más eficaces.

1.4. El cáncer

Esta es una enfermedad que en los últimos años ha demostrado ser un problema a escala global. Según datos de la Organización Mundial de la Salud, hoy en día es la principal causa de muertes en el mundo, con casi 10 millones de defunciones en 2020. Se calcula que una de cada seis defunciones en el mundo se debe a esta patología actualmente, siendo los más comunes el cáncer de mama, pulmón, próstata y colon y recto¹⁴⁶. Pero, a pesar de estos datos, esta denominación no es más que un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que puede afectar a cualquier parte del organismo, siendo la característica definitoria de estas patologías la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, dando el proceso conocido como metástasis¹⁴⁷.

1.4.1. Principales causas

Al ser un paraguas que engloba muchas enfermedades que se caracterizan por la proliferación desmesurada de células, las causas son muy variadas. La base de esta enfermedad son las mutaciones en el ADN, lo cual implica que dicha patología deviene de la combinatoria de factores genéticos que confieren predisposición a sufrir dichas mutaciones y factores ambientales externos que las causan o favorecen. En cuanto a los factores externos, denominados carcinógenos, tenemos de tres tipos:

Los carcinógenos físicos son aquellos que causan mutaciones por una acción física, englobándose en este grupo principalmente radiaciones ultravioletas o ionizantes. Los carcinógenos químicos son esos compuestos que por acción directa o indirecta sobre el ADN son capaces de inducir un cambio en el mismo, como por ejemplo el amianto, diversos compuestos presentes en el tabaco, las anafiotoxinas y el arsénico entre muchos otros. Por último, se define como carcinógenos biológicos a agentes infecciosos que pueden causar o favorecer la aparición de estas desregulaciones¹⁴⁸. Los carcinógenos se clasifican por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer en varias categorías según el peligro que implica exponerse a estos¹⁴⁹, y dentro de los 11 carcinógenos de categoría 1 hay 4 de carácter biológico: *Helicobacter pylori*, HPV, los virus de la hepatitis B y los de la hepatitis C. Estos 4 agentes se considera que son los causantes del 90% de los cánceres relacionados con infecciones¹⁵⁰. Tan relevantes pueden llegar a ser estos patógenos que de los 2.2 millones de nuevos casos de cáncer atribuidos a agentes infecciosos en 2018, más de 2 millones fueron causados únicamente por estos cuatro patógenos¹⁵¹.

Independientemente de las causas, la patología se desarrolla debido a que las células de un individuo adquieren la capacidad de proliferar de forma incontrolada. Este fenómeno no es extraño, de hecho, sucede con relativa frecuencia en nuestras células a lo largo de la vida, pero en condiciones normales el propio individuo es capaz de eliminarlas antes de que puedan crecer e invadir nuevos tejidos¹⁵² proceso conocido

como la “inmunovigilancia”. Este concepto fue propuesto en la década del 1950 por Mac Farlane Burnet¹⁵³ y por Lewis Thomas, y posteriormente fue demostrado a través de la observación del desarrollo de tumores espontáneos por parte de ratones inmunodeficientes¹⁵⁴, fenómeno que también se da en humanos^{155,156}.

1.4.2. Primeras etapas de la enfermedad

Debido precisamente al fenómeno de la inmunovigilancia, las células tumorales además de ser capaces de reproducirse requieren evadir o disminuir la actividad del sistema inmune, evitando así las vías clásicas de supresión de células malignas¹⁵⁷. Tanto es así que se ha llegado a observar como el sistema inmune puede ser manipulado por el propio tumor, llevando a que en lugar de prevenir el crecimiento del tumor llegue a incluso estimularlo. Esta observación llevó al desarrollo de la conocida como la teoría de la inmunoedición de los tumores¹⁵⁴. Esta se basa en las conocidas como las “tres E”, eliminación, equilibrio y escape.

En la primera fase, la eliminación, engloba el concepto original de inmunovigilancia de Mac Farlane Burnet y Lewis Thomas, las células tumorales son reconocidas y eliminadas por el sistema inmune. En esta participan los linfocitos Th1, Th17, TCD8+, las células NK, NKT, macrófagos y linfocitos Tγδ. Se caracteriza por la secreción de una gran cantidad de IFNγ, siendo el principal responsable de la eliminación de las células tumorales al estimular una respuesta inmune de tipo citotóxico. Además, en los casos de tumores sólidos, esta respuesta implica una remodelación del estroma¹⁵⁷ producida por angiogénesis¹⁵⁸ y la invasión del tejido tumoral por parte de las células del sistema inmune¹⁵⁹.

Si pasada la primera fase hay células malignas supervivientes, estas entran en la fase de equilibrio. Se considera que se ha entrado en esta fase cuando la presión que ejerce el sistema inmune es suficiente para contener el crecimiento tumoral, pero no para eliminarlas por completo. Mientras se mantiene este equilibrio, las células tumorales mutan aleatoriamente¹⁶⁰. Se calcula que esta puede ser la fase más larga en el desarrollo de la enfermedad. Las estimaciones indican que en muchos de los tumores sólidos pueden haber pasado alrededor de 20 años entre la exposición al carcinógeno y la detección de la enfermedad¹⁶¹, aunque debido a las características de estas patologías determinar con precisión cuando se dio la exposición al carcinógeno es principalmente elucubrativo. Durante este periodo, la población de células malignas, que ha es inestable por sus características intrínsecas, va ganando heterogeneidad hasta que, llegado cierto momento, se pase a la siguiente fase. El fenotipo altamente mutágeno que presentan las células tumorales¹⁶⁰ se cree que es debido a tres fenómenos de inestabilidad genética: inestabilidad en los procesos de reparación y escisión de nucleótidos, inestabilidad en ADN que forma los microsatélites e inestabilidad cromosomal¹⁶².

El proceso por el cual las diferentes poblaciones tumorales van modificando sus características fenotípicas es muy variado, por lo que se ha dividido las formas en las cuales las células tumorales evolucionan durante este periodo en 4 tipos, en función de cómo se dan los diferentes procesos evolutivos dentro de la colonia tumoral^{163,164}. Por un lado, tenemos la evolución linear, la cual se asemeja a un proceso de evolución clásico

en el que las variantes que tienen mayor tasa de supervivencia se imponen al resto de la población. Por otro, tenemos la evolución ramificada, denominación que se le da a cuando múltiples subclones tumorales con ventaja respecto a la línea parental coexisten en el mismo momento¹⁶⁵. En tercer lugar, tenemos la evolución tumoral neutral, proceso que se asemeja a los fenómenos de deriva génica, porque este fenómeno se da cuando la presión selectiva es relativamente baja, por lo que no hay diferencias fenotípicas que confieran una ventaja a las diversas líneas tumorales^{166,167}. Por último, tenemos la evolución puntual, proceso que sucede cuando un acontecimiento drástico acaba con un cambio sustancial del fenotipo de las células tumorales¹⁶⁸.

A través de estas dinámicas evolutivas se seleccionan las células tumorales supervivientes en la fase de equilibrio, hasta que llega la fase de escape. En esta, la presión del propio sistema inmune en la fase anterior ha acabado por seleccionar las mutaciones que permiten a las células cancerígenas proliferar, y un último cambio genético o epigenético les proporciona resistencia a la detección y/o eliminación. En este momento es cuando son detectables a nivel clínico. Esta evasión de la respuesta inmune se puede dar por diversos mecanismos, como son la secreción de citoquinas inmunosupresoras como TGFβ e IL-10 o el aprovechamiento de la función de las Treg¹⁵⁵. A parte de manipular el sistema inmune, otro mecanismo típicamente utilizado por las células tumorales es alterar el reconocimiento que pueda hacer el sistema inmune sobre las mismas por diversas vías como perder expresión antigénica, componentes del MHC¹⁶⁹, los ligandos de NKG2D¹⁷⁰ o desarrollando insensibilidad al IFNγ¹⁷¹. También pueden evitar su eliminación presentando defectos en las vías señalizadoras de receptores de muerte celular¹⁷² o expresando señales antiapoptóticas como podría ser una actividad constitutiva de STAT3¹⁷³. Todos estos mecanismos permiten que el tumor pueda escapar del control del sistema inmune, siendo estos solo una pequeña pincelada de los que se pueden llegar a observar. Estos pueden ser de mayor o menor relevancia dependiendo del tipo de tumor, el tejido en el que se desarrolle, el estado físico de la persona, etc. Sea cual sea el mecanismo, el resultado acaba siendo que las células tumorales pueden evadir el sistema inmune, permitiéndoles proliferar de forma incontrolada, siendo este el hecho que contrasta con la fase de equilibrio.

Durante el transcurso de estas fases, la actividad del sistema inmune está enfocada a eliminar las células malignas, pero también puede llegar a favorecer el crecimiento tumoral¹⁷⁴. Un ejemplo de este fenómeno es el resultado de tener al menos dos mecanismos inflamatorios con distintos efectos en los tumores: La inflamación crónica se ha corroborado que promueve la supervivencia de las células neoplásicas, angiogénesis, remodelación tisular y la posibilidad de hacer metástasis; mientras que la inflamación aguda cual favorece la destrucción de los tumores. Cada uno de estos procesos está asociado a un tipo de respuesta del sistema inmune, estando la inflamación crónica asociada a una respuesta tipo Th2, mientras que la inflamación aguda está asociada con una respuesta tipo Th1¹⁷⁵. La problemática radica en que, en el contexto del desarrollo de un tumor, una respuesta Th2 es perniciosa porque su desarrollo fomenta la supervivencia y proliferación

celular¹⁷⁶ y a su vez suprime la respuesta citotóxica Th1, fomentando la expresión en macrófagos y monocitos de la óxido nítrico sintasa o la arginasa 1, además de impedir la maduración de las DC a través de la IL-10¹⁷⁷.

Por este motivo uno de los objetivos de las inmunoterapias contra el cáncer radica en reducir el ambiente inmunosupresor, principalmente generado por macrófagos, reprogramándolos o neutralizándolos para evitar el desarrollo de una respuesta de tipo Th2. En esta línea, se ha intentado suprimir los macrófagos residentes con un anticuerpo neutralizador de CSF1 en combinación con quimioterapia o radioterapia¹⁷⁷⁻¹⁷⁹, y en estos ensayos se ha observado una mayor eliminación del tumor con los tratamientos tradicionales al combinarlos con el bloqueo de CSF1¹⁷⁵. En cultivos también se ha demostrado que la presencia de linfocitos B dificulta la eliminación del cultivo neoplásico¹⁸⁰, lo cual ha motivado que se esté dirigiendo la atención hacia tratamientos que actúen sobre vías comunes entre las células mieloides y los linfocitos B, como son SYK, BTK o PI3K¹⁸¹.

1.4.3. Metástasis

Finalizadas estas tres fases, en muchos casos se da el proceso conocido como metástasis: la propagación de un foco cancerígeno a un órgano distinto de aquel en el que se inició, normalmente por vía sanguínea o linfática. Esta se ha clasificado en varias fases: invasión local del órgano de origen, salida de las células tumorales al torrente circulatorio, supervivencia en circulación, extravasación a un nuevo órgano y finalmente la colonización de este último^{182,183} (**Figura 2**). Este proceso no es directamente dependiente de la capacidad oncogénica de las células tumorales, dado que tenemos diversos modelos animales los cuales no son capaces de establecer metástasis¹⁸⁴ e incluso se ha observado en pacientes con células tumorales diseminadas que estas son incapaces de realizar procesos de metástasis¹⁸⁵. La capacidad de manifestar esta conducta viene dada en gran medida por las singularidades que presentan las células tumorales, como son el ilimitado potencial proliferativo, la tolerancia a los errores en la replicación del material genético y el no depender del microambiente externo para su supervivencia¹⁵⁷.

Este proceso inicia con la invasión del parénquima de su órgano de origen por parte de las células tumorales hasta que encuentran con un vaso sanguíneo. Una vez dada esta situación, y con las condiciones adecuadas, se puede observar la intravasación de células tumorales, que a continuación extravasarán a un nuevo órgano, donde se formará una nueva masa tumoral. La intravasación y extravasación son procesos que dependen mucho del tejido de origen de las células tumorales, ya que estos pueden dar de base más o menos facilidades, ya sea por expresión de receptores o facilidades físicas propiamente como sería la proximidad del tejido diana¹⁸³. Una vez estas células diseminadas entran en un nuevo tejido formando una nueva masa tumoral tenemos el proceso conocido como “colonización”¹⁸⁶. Después de la infiltración de las células en el tejido diana, hay un tiempo de latencia muy variable entre los diferentes tipos de cáncer y el órgano a colonizar hasta que la masa tumoral empieza a crecer, obteniéndose la longitud del mismo de la combinación de estos dos factores principalmente¹⁸³. El tejido de origen del tumor no solo da características que facilitan la

intravasación, si no que se ha observado que según este se tiene la capacidad de hacer metástasis más predominantemente sobre ciertos órganos. Un ejemplo lo tenemos en el cáncer de próstata, que prácticamente solo hace metástasis hacia el tejido óseo¹⁸⁷ o los melanomas oculares, que solo son capaces de hacer metástasis hacia el hígado casi de forma exclusiva¹⁸⁸. Otro factor a tener en cuenta para el estudio de este fenómeno es la cinética. Para ejemplificar la diferencia entre dichos factores, podemos centrarnos en las diferencias entre adenocarcinomas de pecho y los pulmonares: ambos invaden aproximadamente los mismos órganos, pero mientras que con el primer tipo de adenocarcinoma el primero se pueden detectar la aparición de nuevas metástasis con décadas de tiempo después de la remisión de la enfermedad^{189,190}, los segundos establecen nuevas metástasis con solo unos meses^{191,192}.

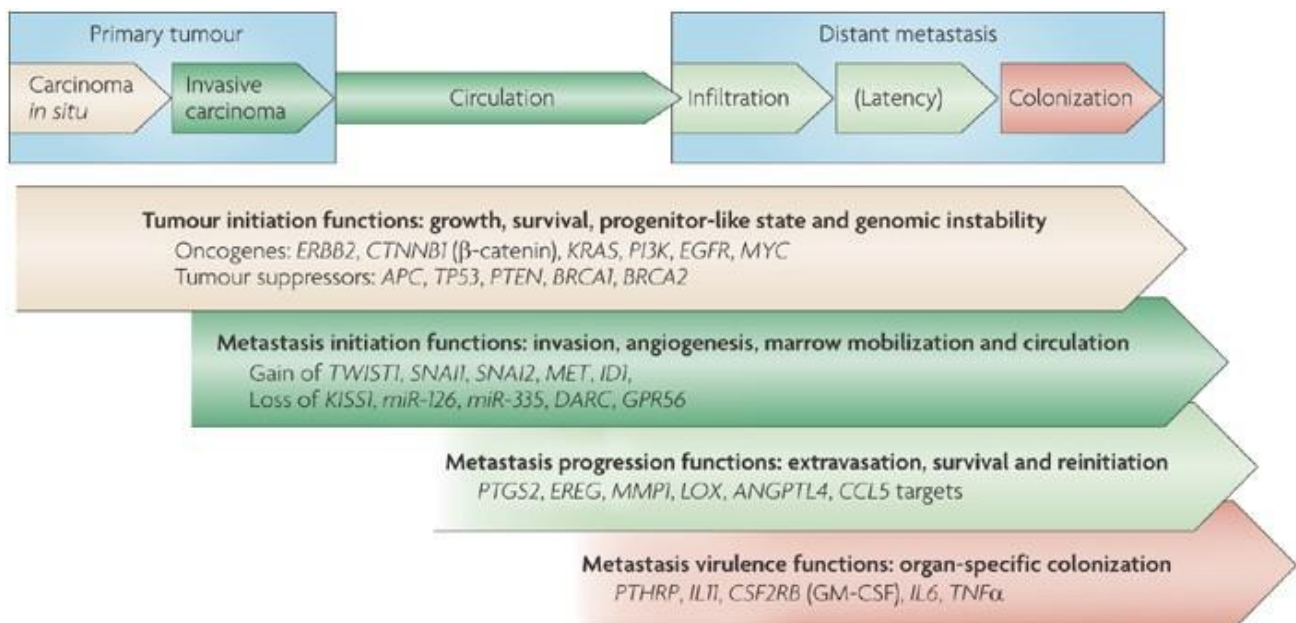


Figura 2: Representación gráfica del proceso de metástasis de un carcinoma. En este gráfico se muestran las distintas fases por las que pasan las células de carcinoma al hacer una metástasis y los diversos factores que se expresan, se dejan de expresar o se secretan en cada una de las fases. Figura extraída de [Nguyen, D. X., Bos, P. D. & Massagué, J.](#)

Esta serie de eventos que llevan a la metástasis han sido descritos detalladamente¹⁹³ y están propiciados por cambios genéticos y epigenéticos en las células tumorales, pero por si solos los cambios genéticos no son suficientes como para que se dé la metástasis, como se infiere en el hecho de que los modelos animales de cáncer en los que se activan oncogenes no desarrollan automáticamente metástasis¹⁸⁴ o en que algunos pacientes con células tumorales diseminadas no desarrollan metástasis¹⁸⁵. Además, cada órgano tiene un microambiente y barreras específicas para evitar la infiltración celular, motivo por el cual las células tumorales deben adquirir la capacidad tanto de traspasar esas barreras en específico como de crecer en el microambiente concreto del órgano¹⁸³. Esto significa que, aunque todas las metástasis sigan un proceso

similar, las capacidades que adquieren las células tumorales para realizarlas pueden llegar a ser significativamente distintas.

Los genes alterados en las metástasis se clasifican de diversas formas, aunque habitualmente se dividen en genes de iniciación de la metástasis, de progresión o de virulencia^{194,195}. Los genes del primer grupo permiten invadir el estroma adyacente, promueven la motilidad celular, permiten la degradación de la matriz extracelular, favorecen la angiogénesis y/o permiten evitar el sistema inmune. Cuando se detecta la expresión de estos genes en el ambiente tumoral, conlleva una mala prognosis, siendo más preocupante en los cánceres más agresivos¹⁸³.

Por otro lado, los genes de progresión de la metástasis pueden estar expresados en el inicio del crecimiento tumoral, pero no hacer su función hasta haber salido las células del tejido de origen. Incluso se conoce de algunos casos en que estos genes tienen una función en el tumor primario, pero al darse la migración a otro órgano ejercen otro tipo de función. Para ejemplificar este fenómeno podemos focalizarnos en la metástasis de cáncer de mama hacia el pulmón. En esta patología, la expresión de epiregulina y prostaglandina G/H sintasa 2 promueven la generación de capilares sanguíneos desde el tejido muscular liso hacia el tumor mamario. Pero, a su vez, estos genes permiten a las células tumorales pasar a través de las barreras endoteliales, permitiéndoles migrar fácilmente a los pulmones una vez han abandonado su tejido de origen. Como podemos ver, unos genes expresados desde el inicio del tumor y que en estadios tempranos de la enfermedad tenían una función determinada, al darse la progresión de la metástasis adquieren nuevas funcionalidades. La expresión de estos genes puede ser determinante para conocer cuáles son los órganos hacia los que las células neoplásicas tendrán preferencia a migrar¹⁸³.

Por último, están los genes que se denominan de virulencia. Están relacionados con la facilidad que tendrán las células tumorales para crecer en ciertos órganos una vez se hayan dado las fases previas y los hayan colonizado. Un ejemplo lo tenemos en la expresión de factores de movilidad de osteoclastos, IL-11 o la PTHRP, las cuales no implican ninguna actividad ventajosa para los cánceres de mama, pero les permiten establecer metástasis osteolíticas con mayor facilidad¹⁹⁶⁻¹⁹⁸.

1.4.4. Modelos usados para su estudio

El conjunto de enfermedades que conocemos como “cáncer” pueden tener tanto causas como cursos de lo más diversos. Por este motivo, uno de los puntos más importantes para poder mejorar el conocimiento de dichas patologías y la posterior elaboración de tratamientos frente a las mismas es el desarrollo de modelos animales capaces de mimetizar el curso de este conjunto de patologías. Esto incluye la heterogeneidad genética, el microambiente tumoral altamente complejo y las poblaciones estromales que se movilizan en este tipo de patologías¹⁹⁹.

Con este objetivo, para el desarrollo de terapias antitumorales clásicas como pueden ser los tratamientos quimioterapéuticos, se utilizan modelos xenográficos en los cuales se trasplantan líneas tumorales de pacientes humanos a ratones inmunocomprometidos para evaluar tanto la eficacia como la seguridad de estos tratamientos²⁰⁰. Aunque estos modelos son útiles, para el desarrollo de inmunoterapias antitumorales estos no son válidos, ya que se requiere un sistema inmune intacto y capaz de desarrollar una respuesta. Este es uno de los motivos por los que es tan complejo desarrollar modelos tumorales válidos y reproducibles, ya que deben contar tanto con la alta variabilidad que presentan las células tumorales como con la variabilidad en la adaptación del sistema inmune a la patología.

Por estos motivos, se pueden dividir los diversos modelos utilizados en el desarrollo de terapias antitumorales de la siguiente forma:

- Modelos de trasplante xenográfico de células tumorales de un paciente humano a animales inmunodeprimidos.
- Modelos de inoculación de una línea tumoral animal en un individuo inmunocompetente.
- Modelos de alteraciones genéticas específicas que permiten el desarrollo espontáneo de tumores.
- Modelos de trasplante xenográfico de células tumorales a animales humanizados.

1.4.4.1. Modelos de trasplante de células tumorales humanas a animales inmunodeficientes

Estos modelos han sido muy útiles para el desarrollo de terapias citotóxicas¹⁹⁹ y para el desarrollo de las terapias de receptor de antígenos quiméricos o CAR²⁰¹. Pero, a pesar de ser útiles, están muy limitados en cuanto a que no proveen información sobre el curso de una enfermedad natural, además que son muy dependientes del tipo de inmunodeficiencia que tenga el animal huésped. Clásicamente se ha usado animales atímicos, los cuales por motivos evidentes tienen una deficiencia en la respuesta de los linfocitos T, pero contando con un compartimento innato completamente funcional. El hecho de tener una respuesta innata funcional puede llegar a interferir en los resultados obtenidos debido a la idiosincrasia de estos modelos, motivo por el cual el uso de estos modelos está limitado a los campos anteriormente mencionados.

1.4.4.2. Modelos de inoculación de una línea tumoral murina a individuos sanos

Estos son los modelos más antiguos y extendidos como modelos para estudios preclínicos. En general, se utilizan líneas murinas bien establecidas como son C57 BL/6 o BALB/c. De estos animales se aíslan células tumorales, las cuales pueden ser de aparición espontánea o inducidos por algún carcinógeno y se mantienen *in vitro* hasta su inoculación a un animal sano para iniciar el modelo. Otra aproximación para establecer una línea tumoral se basa en coger células sanas de los animales, modificarlas genéticamente para inmortalizarlas y volverlas así una línea tumoral. Este método también se utiliza para modificar líneas tumorales ya establecidas. Sea cual sea el procedimiento utilizado, el resultado acaba siendo una línea tumoral proveniente de la cepa de ratón a usar, ya que si se usaran líneas tumorales procedentes de otra cepa murina hay más

probabilidad de que esta sea eliminada por el ratón simplemente por diferencias genéticas entre cepas que le permitan reconocer las células como ajenas.

Una vez se tiene establecida la línea tumoral, para iniciar los experimentos con estos modelos se inoculan las células a animales sanos. En estos modelos es importante tener en cuenta tanto el estado de las células a implantar (en caso de estar en estadios de apoptosis, podrían llegar a favorecer una respuesta inmunitaria específica, enmascarando los posibles resultados del tratamiento a estudiar²⁰²) y el lugar donde previsiblemente las células tumorales crecerán, dado que según la naturaleza de estas será más adecuado trabajar con una implantación subcutánea, intravenosa (como es el caso de la línea de melanoma B16-F10²⁰³) o intraperitoneal (como es el caso de una de los usos de la línea RMA²⁰⁴).

Estos modelos se usan comúnmente para evaluar la eficacia de las inmunoterapias antitumorales. También se usaron para describir los fenómenos de la inmunoección²⁰⁵, principalmente porque son muy sencillos de utilizar en comparación con los otros modelos disponibles para estudiar este tipo de patologías y por la facilidad con la que pueden ser genéticamente manipulados. Pero, estas facilidades también tienen su contrapartida, como por ejemplo la falta del microambiente que suele caracterizar las patologías de los pacientes o la falta de heterogeneidad entre los tumores desarrollados, lo cual es otro aspecto definitorio del cáncer²⁰⁶. La falta de heterogeneidad tumoral en parte es debida a que las células tumorales carecen de su población progenitora, la cual es responsable en parte de la generación del microambiente y este favorece el fenotipo altamente mutágeno de las poblaciones tumorales²⁰⁷. Otro factor que contribuye a la falta de heterogeneidad está relacionado con el cultivo de estas líneas tumorales, que implica *de facto* una selección de las células más resistentes en medio de cultivo, contribuyendo así a la homogeneidad de la línea. Por toda esta casuística, una aproximación que se ha propuesto para intentar sobrepasar esta limitación es inocular distintas líneas tumorales simultáneamente con el objetivo de obtener un tumor compuesto de diferentes subpoblaciones²⁰⁸, pero este protocolo no provee la plasticidad funcional que permite a los tumores adaptarse constantemente durante el proceso de inmunoección²⁰⁵.

Otra problemática que presentan estos modelos es un crecimiento tumoral atípico, sin una selección en la fase de equilibrio y todos los procedimientos anteriormente comentados. En estos modelos las células crecen como una masa maligna poco diferenciada²⁰⁹. A consecuencia de esto, en los modelos de inoculación de una línea tumoral murina no se observa el periodo de latencia tumoral, periodo en el cual un individuo puede desarrollar y amplificar una respuesta inmune antitumoral. Este es un motivo por el que los resultados obtenidos de estos modelos pueden diferir bastante de los observados después en pacientes²¹⁰, ya que este crecimiento abrupto del tumor da una ventana de tiempo para evaluar la eficacia de la inmunoterapia poco eficiente, principalmente porque estos tratamientos son más eficaces en los primeros estadios de la enfermedad²¹¹.

A pesar de todos estos inconvenientes y limitaciones, actualmente estos son los modelos más utilizados para el estudio de inmunoterapias antitumorales, al ser los modelos con los que se puede hacer un seguimiento más preciso del crecimiento tumoral y, a pesar de todas las problemáticas anteriormente mentadas, son bastante representativos del desarrollo de la patología en humanos.

1.4.4.3. Modelos de alteraciones genéticas para el desarrollo espontáneo de tumores

Estos modelos han sido posibles gracias a los avances en la tecnología de ingeniería genética de las últimas décadas. Suelen usar dos aproximaciones: por un lado, se pueden basar en la inserción de oncogenes (como SV40²⁰⁹ o BRAF^{V600E 212}) bajo la regulación de promotores específicos de tejido; o la expresión de enzimas que eliminan supresores tumorales conocidos (como PTEN o p53²¹³). Usando esta aproximación se ha conseguido desarrollar un cáncer espontáneamente, y además en este caso se observan las patologías previas al tumor, como por ejemplo las lesiones en cáncer de próstata²¹⁴ o las neoplasias intraepiteliales en cánceres pancreáticos²¹⁵. Este periodo de desarrollo y progresión más natural del tumor permite tener ventanas de tratamiento más grandes, hecho especialmente relevante para evaluar adecuadamente la efectividad de las inmunoterapias²¹⁶.

Pero, estos modelos distan igualmente de ser una representación inequívoca de la patología en seres humanos. Para empezar, a través de los procesos naturales esta se manifiesta por la acumulación de mutaciones en una fracción pequeña de células de un tejido, mientras que en estos modelos los oncogenes se expresan en la totalidad del tejido. Además, al haber insertado estos genes para el desarrollo de la patología, los tumores derivados de la actividad de los oncogenes tampoco tienen la variabilidad genética observada en los pacientes humanos²¹⁷, factor que como se ha comentado anteriormente es muy relevante en el desarrollo de las patologías que se están modelando. Por esto, se está trabajando en intentar favorecer esta variabilidad genética afectando también a mecanismos de reparación del ADN²¹³, con el objeto de obtener una aproximación más realista del desarrollo de la patología.

A pesar de que estos modelos a priori son muy buenos para el estudio de inmunoterapias, presentan una serie de complicaciones. Para empezar, tienen una variabilidad muy alta en cuanto al fenotipo tumoral que se manifiesta y su latencia, efecto que se agrava dependiendo de los oncogenes y el tejido diana elegidos. Por otro lado, también nos encontramos con una problemática a la hora de realizar el seguimiento del crecimiento tumoral, motivo por el cual se deben usar métodos más complejos respecto a los usados con los modelos de implantación de una línea tumoral, como son la detección a través de ultrasonidos o la resonancia magnética¹⁹⁹. Por estos motivos, a pesar de ser unos modelos prometedores y tanto conceptual como empíricamente más similares al curso natural de la enfermedad, su uso no está tan ampliamente extendido como uno esperaría, además de motivos económicos.

1.4.4.4. Modelos animales humanizados

Para el desarrollo de estos modelos se partió de animales inmunodeficientes a los cuales se les injertaron células o tejidos humanos funcionales, y al contrario de los demás modelos comentados, se pueden usar para el estudio de un abanico más amplio de funcionalidades fisiológicas, no están limitados al estudio de las patologías relacionadas con el cáncer. Pero, para el estudio de las patologías que ocupan el presente documento, típicamente se genera un ratón con el sistema inmune humanizado. Con este fin, se suele trabajar con ratones deficientes de la cadena γ y del receptor de la IL-2 en tres modelos distintos. El primero se basa en la inoculación a los animales de humanos extraídos de sangre periférica, los cuales se extienden por todo el animal en el plazo de una semana. Este modelo ha demostrado ser muy representativo de la actividad de los linfocitos T *in vivo*, pero tiene una ventana de trabajo relativamente pequeña, dada la eliminación por parte del huésped del implante de células del sistema inmune en el plazo de 4-8 semanas²¹⁸, aunque este plazo se puede llegar a extender usando animales que también carezcan de algunos MHC²¹⁹.

Otro modelo usado consiste en la inoculación intrafemoral de células linfoides derivadas de tejidos hematopoyéticos o ricos en células con potencial hematopoyético como son la médula ósea, el cordón umbilical o el hígado. Este modelo permite tener un sistema inmune completamente humanizado, al contrario de lo observado con el modelo anterior, en el cual únicamente se obtienen linfocitos T humanizados. Las únicas partes del sistema inmune murinas que restan en este modelo son las presentes en tejidos hematopoyéticos periféricos, pero su porcentaje es relativamente bajo. Además, un dato curioso de estos modelos es que las células T humanas en este modelo son seleccionadas en el timo independientemente del HLA²²⁰ aunque el timo murino es incapaz de generar algunos factores necesarios para mimetizar completamente todos los aspectos del desarrollo de los linfocitos T humanos²²¹.

El tercer modelo se establece con un trasplante de tejido humano fetal de hígado y timo debajo de la cápsula renal y además una inoculación intravenosa de células hematopoyéticas^{222,223}. Como en el modelo anterior, en este se desarrollan todos los tipos celulares del sistema inmune humano, e incluso se humaniza el sistema inmune asociado a mucosas. Pero, en contraste con el modelo anterior, en este los linfocitos T seleccionados en el timo sí se ven restringidos por el HLA. Pero, a pesar de ser un modelo que mimetiza completamente el sistema inmune humano, estos animales acaban desarrollando un rechazo al implante, lo cual limita el tiempo en el cual este modelo puede ser usado²²⁴.

Estos modelos, a pesar de ser a priori los más fácilmente trasladables, presentan unas problemáticas bastante acusadas, como es el hecho de que tienen una ventana de uso bastante limitada y el coste de elaboración y mantenimiento de estos. Por estos motivos, aunque se está trabajando actualmente en ellos, no se seleccionan en primera instancia para los estudios de tratamientos que a futuro se prevé que puedan

llegar a humanos, aunque se sigue trabajando en su desarrollo para mejorarlos y hacer modelos más representativos de lo que sucede en pacientes humanos.

1.4.5. Modelos animales usados en esta tesis

El trabajo aquí desarrollado tiene como objetivo analizar la actividad del compuesto AC11 y de los linfocitos iNKT que lo reconocen con la finalidad estudiar su posible utilidad en el tratamiento de patologías tumorales, usando modelos animales de administración de una línea tumoral murina a individuos sanos. Concretamente, se han seleccionado líneas tumorales de timoma (las líneas RMA, EL-4 y EG-7) y de melanoma (B16-F10 y B16-F10-OVA).

Líneas tumorales de timoma

Los modelos de RMA y EL-4 (y su transfectante EG-7) son líneas tumorales de linfoma que presentan epítomos del virus murino de la leucemia²²⁵. En el caso de las RMA, fueron derivadas de una línea precursora (RBL-5), generada por una infección por este virus. La línea RMA se estableció al seleccionar las células RBL-5 que tenían una expresión reducida de H-2k²²⁶. En el caso de la línea EL-4, es una línea tumoral inducida a través de dimetilbenzotraceno²²⁷. Durante mucho tiempo estas líneas se trataron como si fuesen completamente independientes, teniendo tanto *in vitro* como *in vivo* conductas sensiblemente diferentes: las RMA tienen un crecimiento rápido y predominantemente en suspensión, mientras que las EL-4 tienen un ciclo vital más lento y mayor tendencia a agregarse. Pero al caracterizar los TCR de estas líneas, se descubrió que sus TCR tienen idénticas cadenas α y β , hecho que indica inequívocamente por lo menos un antecesor común entre dichas líneas, o que durante el paso de los años estas líneas se han ido contaminando de forma cruzada en los cultivos. Una de las posibles explicaciones en línea de con la hipótesis del antecesor común implica que línea progenitora fuese la EL-4, la cual fue establecida en 1945, y que esta se infectara con el virus de la leucemia murina resultando en la línea RBL-5. Estos hallazgos se han ratificado en varios laboratorios que jamás han intercambiado células entre sí²²⁸, lo cual refuerza la teoría de que la relación entre las líneas tumorales es ontogénica, no de contaminación cruzada.

En cuanto a su uso, estas líneas son seleccionadas tanto para desarrollar tumores líquidos, principalmente en el peritoneo²⁰⁴, como para la generación de tumores sólidos subcutáneos²²⁹. Por sus características fenotípicas, la línea RMA es la más utilizada a nivel intraperitoneal como modelo de tumor líquido, mientras que la EL-4 y su transfectante EG-7 se utilizan habitualmente como modelo de tumor sólido subcutáneo.

Líneas tumorales de melanoma

La línea B16-F10, y por consecuencia su derivada B16-F10-OVA, son líneas derivadas de células tumorales de melanoma que aparecieron espontáneamente en la oreja en un ratón C57 BL/6 en The Jackson Laboratory en 1954. La línea B16-F10 se estableció inyectando células B16 a ratones sanos, cultivando posteriormente las células que se pudieron recolectar y repitiendo este procedimiento un total de 10 veces. Se caracteriza por

ser capaz de generar metástasis eficazmente incluso en animales inmunocompetentes. Se ha visto que tienen niveles muy bajos de las moléculas de clase I H-2Kb y H-2Db²³⁰ y son fáciles de seguir, dado que al derivar de células epiteliales producen melanina, motivo por el cual se pueden identificar fácilmente sus colonias por la coloración negra, observable en los modelos de metástasis hacia los pulmones, hígado o bazo²³¹.

Estas líneas se utilizan para hacer modelos de melanomas subcutáneos y como modelos de metástasis principalmente. En los modelos subcutáneos, crecen formando una masa sólida debajo de la piel, si bien desarrollan unos tumores muy vascularizados, susceptibles a ulceración y difícilmente manejables. Por otro lado, en los modelos de metástasis, las células tumorales se inoculan de manera intravenosa a los animales y se vehiculan por el torrente sanguíneo hasta establecerse en los pulmones²⁰³.

1.5. Relación de las iNKT y el cáncer

Las células iNKT son un subgrupo de linfocitos que pueden tener diversas funciones según características fenotípicas y cómo se estimulen^{25,27,28}, siendo relacionadas con las patologías como el cáncer⁶ desde las primeras descripciones. De hecho, los ratones que no tienen el segmento J α 18 y por tanto carecen de iNKT son más susceptibles a desarrollar cierto tipo de tumores^{232,233}, y su restauración mediante transferencia adoptiva permite recuperar la actividad antitumoral normal²³⁴. Igualmente, en ratones CD1d K.O. (que no pueden desarrollar ni de iNKT ni NKT de tipo II) el aumento de la susceptibilidad tumoral es similar a la de los ratones J α 18 K.O.²³⁵. En humanos se da también esta correlación, de forma que los pacientes con tumores sólidos tienen una frecuencia o funcionalidad de las iNKT disminuidas²³⁶⁻²³⁸ y una mayor frecuencia intratumoral de estas células se relaciona con un pronóstico más favorable de la progresión de la enfermedad²³⁹.

Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos concretos con los que las iNKT controlan el crecimiento tumoral en homeostasis¹⁴⁴, así como los glicolípidos endógenos y potenciales antígenos tumorales capaces de estimularlas^{89,90,94}. De hecho, esta actividad antitumoral no tiene por qué ser por acción directa de las iNKT sobre las células malignas. Por ejemplo, en ratones NOD/SCID humanizados la actividad antitumoral mediada por esta población es a través de la eliminación de los macrófagos asociados al tumor²⁴⁰.

Aplicaciones terapéuticas de la α GC

Numerosos estudios han demostrado como los agonistas de las iNKT, y en particular la α GC, (**Figura 3**), aislado en *Agelas mauritanicus*, son capaces de generar una actividad antitumoral^{144,241-243}. En la mayor parte de los casos, esta actividad no corresponde a una acción directa de las iNKT sobre los tumores, si no la activación secundaria de otras poblaciones celulares efectoras como las NK, linfocitos B y T, macrófagos o neutrófilos²⁴⁴

las cuales ejecutan la acción antitumoral. Las mismas iNKT pueden tener una acción directa contra la población tumoral, a través de una acción citotóxica directa^{245–248}, a través de CD1d y el iTCR, pero también puede ser a través de receptores NK como el NKG2D¹¹⁸.

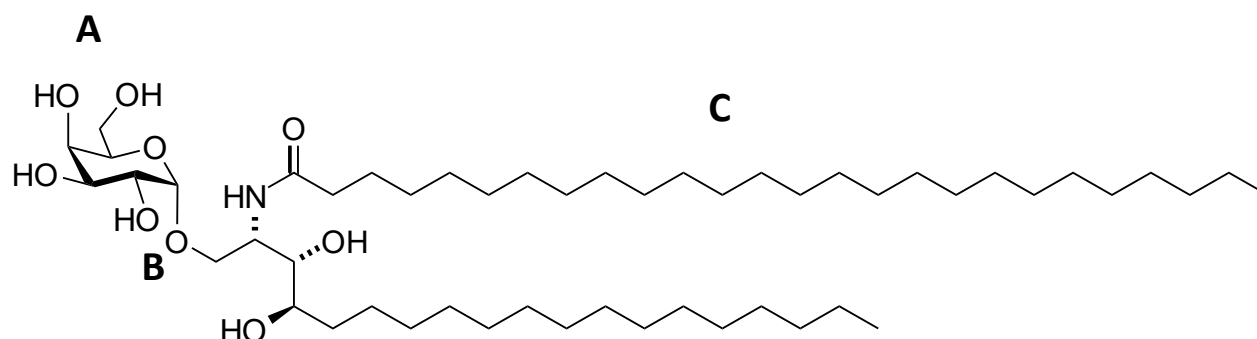


Figura 3: Representación de la estructura molecular de la α GC. En esta se pueden ver las tres partes características de la molécula, siendo la cabeza polar formada por un azúcar (A), el enlace O-glicosídico (B) y las cadenas lipídicas (C). Fuente: [Ioltim - Own work, CC BY-SA 4.0, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=67044266](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=67044266)

A parte de la actividad antitumoral, la α GC es efectiva en otros modelos de patologías, como la EAE²⁴⁹, diabetes²⁵⁰, aumentando la respuesta frente a infecciones víricas²⁵¹, bacterianas²⁵² o parasitarias²⁵³. Como activador de la respuesta inmune, posee capacidad adyuvante en modelos de vacunación tanto contra patógenos^{254–256} como contra tumores^{130,257}. Así, en modelos animales la α GC induce una respuesta antitumoral, cuya eficacia depende de las pautas de administración. La estrategia más efectiva es la administración de células dendríticas autólogas cargadas con antígenos tumorales y α GC, generando una respuesta más prolongada en el tiempo y una menor anergia de las iNKT²⁵⁸. Así mismo, la utilización de exosomas cargados con α GC es más eficaz que la administración libre²⁵⁹.

Los subsiguientes ensayos clínicos han seguido diversas estrategias, desde administrándose de forma libre²⁶⁰ o a través de DC del propio paciente cargadas exógenamente²⁶¹. Todos los ensayos han demostrado la seguridad del compuesto, así como una activación de NK y linfocitos T. Sin embargo, las mejoras clínicas no han sido suficientemente relevantes²⁶². El único tratamiento que ha conseguido mejorar significativamente la clínica de los pacientes ha sido la combinación de DC autólogas cargadas con α GC con células iNKT expandidas *in vitro* y reintroducidas al paciente²⁶³.

Esta falta de resultados puede venir propiciados por diversos motivos. En primer lugar, la α GC induce una producción de citoquinas exacerbada, cercana a la tormenta de citoquinas, pero no definida hacia ningún tipo de respuesta en particular, por lo que se estimula una respuesta tanto Th1, como Th2 o Th17. Esto disminuye en gran medida la efectividad de los tratamientos, llevando al sistema inmune a lo que se denomina una respuesta Th0, de forma que al estimular todas las respuestas a la vez ninguna de ellas llega a ser eficiente debido a las retroalimentaciones negativas²⁶⁴, efecto similar a la respuesta observada frente a

superantígenos²⁶⁵. Adicionalmente, esta alta estimulación induce un estado de anergia funcional, en el cual las iNKT no son capaces de responder a una segunda estimulación a través del iTCR^{266,267}. Para intentar evitar estos efectos, numerosos grupos de investigación intentaron desarrollar o buscar compuestos análogos al α GC para estimular las iNKT de una forma más controlada y dirigida.

1.5.1. Análogos de la α GC y su actividad

Vistas las limitaciones del agonista prototípico, varios grupos centraron sus esfuerzos en intentar encontrar nuevos compuestos similares al α GC que focalizasen la respuesta producida, bien realizando modificaciones sintéticas de la molécula α GC como buscando en la naturaleza otros compuestos capaces de estimular las iNKT²⁶⁸. En cuanto a las moléculas naturales, se han encontrado varias que pueden estimular las iNKT (la mayoría glicolípidos con un enlace α -glicosídico, como los glicolípidos de bacterias Gram positivas)^{91,92,269-271}, pero ninguna parece ser más eficaz que la α GC.

Numerosos análogos sintéticos han sido desarrollados, incluyéndose la forma usada en todos los laboratorios, modificando una o varias de las partes principales de la molécula: el azúcar, el enlace O-glicosídico o la cola lipídica. Estas modificaciones conllevan diferencias que afectan en diversos puntos al reconocimiento y funcionalidad de las iNKT (interacción con el CD1d, interacción con el iTCR, tiempo de vida media...) lo cual induce respuestas efectoras cualitativa o cuantitativamente diferentes.

1.5.1.1. Modificaciones en las cadenas lipídicas

Las modificaciones en las cadenas lipídicas han consistido en introducir insaturaciones o acortar una o ambas cadenas. Con estas modificaciones se consiguen moléculas más hidrosolubles, lo cual deriva la respuesta de las iNKT hacia a Th2.

La mayoría de las modificaciones en las cadenas lipídicas han consistido en la introducción de insaturaciones o el acortamiento de una o ambas cadenas. El primero de estos compuestos publicado fue el OCH, el cual genera una respuesta de tipo Th2 y ha resultado ser efectivo en modelos de EAE¹²². Sin embargo, OCH no es capaz de estimular las iNKT humanas. Más tarde se desarrolló el glicolípido C20:2, con un efecto similar al OCH pero de mayor potencia¹²⁰ en ratones NOD, modelo de diabetes tipo I, siendo un candidato para tratamientos de enfermedades como la diabetes en humanos²⁷². Otros compuestos con cadenas acortadas son el C20:4 y el C10:0, los cuales también conllevan una respuesta Th2⁷⁶.

Estudios de estructura/función con baterías de análogos con diversas longitudes, han tratado de determinar si la longitud de la cadena lipídica puede ser un factor decisivo en la inducción de una respuesta tipo Th1 o una Th2, comprobándose que una cadena de esfingosina más corta induce una respuesta de tipo Th2²⁷³. Esto se debe a que la respuesta de IFN γ requiere una interacción larga del iTCR con su antígeno, y los compuestos

de cadena lipídica corta no forman una interacción tan estable en los bolsillos hidrofóbicos A' y F' de CD1d (**Figura 1**), ocasionando una interacción más corta del complejo, con la consecuente respuesta de tipo Th2⁸⁶.

En contraposición, la introducción de residuos aromáticos unidos a las cadenas lipídicas estabilizaría la interacción con CD1d e induciría una mayor respuesta Th1. En efecto, análogos con estas modificaciones inducen una mayor expansión de las iNKT y una respuesta de tipo Th1²⁷⁴. Uno de estos compuestos es el 7DW8-5, el cual ha dado resultados prometedores como adyuvante en estudios preclínicos de vacunación contra malaria o VIH^{275,276}.

1.5.1.2. Modificaciones en el enlace O-glicosídico

Otra aproximación consiste en hacer modificaciones en el enlace glicosídico. Un compuesto ampliamente conocido en esta línea de modificaciones es el α -C-GalCer o KRN7000²⁷⁷, el cual tiene un carbono en vez del enlace glicosídico. Este compuesto genera una protección contra la malaria mayor que la α GC y una mayor resistencia frente a la metástasis en modelos animales. El α -C-GalCer que es un mejor inductor de IFN γ , derivando la respuesta generada hacia Th1¹²¹, siendo más eficaz que la α GC en diversos modelos²⁷⁸, habiéndose estudiado su potencial como adyuvante de vacunas de *influenza*²⁷⁹.

La estructura tridimensional del complejo CD1d- α GC-iTCR muestra que el oxígeno del enlace O-glicosídico forma un puente de hidrogeno con el CD1d, interacción que desaparece con el α -C-GalCer^{84,280}. Para recuperar esta interacción, se sintetizaron análogos del α -C-GalCer con un doble enlace entre el carbono anomérico de la galactosa y la ceramida. Este compuesto dio una respuesta aumentada de IL-12 y una reducción de la liberación de IFN γ ²⁸¹. En líneas generales los análogos generados con esta aproximación tienen una actividad muy diferente entre especies, lo cual reduce la traslacionalidad de su estudio a través de modelos animales²⁸².

También se han intentado otras modificaciones de este enlace, como la substitución el oxígeno por azufre, α -S-GalCer. Este compuesto es capaz de expandir las iNKT *in vitro* y generar una respuesta de tipo Th2²⁸³. El enlace sulfuro-carbono implica la resistencia a hidrolisis enzimáticas y quizás una posición más favorable para la interacción con el iTCR^{284,285}. Este análogo, al contrario que el α -C-GalCer, estimula las iNKT humanas *in vitro*²⁸⁶, pero no las iNKT murinas ni *in vitro* ni *in vivo*²⁸⁴, por lo que el estudio de estos compuestos en modelos animales no es viable. De este compuesto se han desarrollado análogos que añaden una glucosilación o una tioglucosilación en el carbono 6 del azúcar de la cabeza polar, denominados XZ7²⁸⁷ y XZ11 los cuales han demostrado desarrollar una respuesta Th1 y Th2 respectivamente, aunque solo en cultivo y con una intensidad mucho menor que la α GC o el 7DW8-5²⁸⁸.

1.5.1.3. Modificaciones en el azúcar

El carbohidrato de la α GC es esencial para la interacción con el iTCR, de forma que, si se modificaban grupos hidroxilo de los carbonos 2'', 3'' o 4'' del azúcar, se pierde la actividad antitumoral⁶. Por ejemplo, la substitución

del OH por flúor en el carbono 2''²⁸⁹ o por un grupo metano²⁹⁰, implican una gran pérdida de la actividad funcional. Igualmente, modificaciones en los carbonos 3'' y 4'', implican una pérdida de capacidad estimuladora, aunque no tan significativa²⁹¹⁻²⁹³. Por tanto, la interacción con el OH 2'' es clave para el reconocimiento de los compuestos, mientras que las interacciones de los OH 3'' y 4'', a pesar de ser relevantes, permiten cierta flexibilidad. La estructura tridimensional determinó que los OH 2'', 3'' y 4'' hacen puentes de hidrógeno con el iTCR, mientras que el grupo hidroxilo del carbono 6'' queda expuesto al medio⁸⁴. Por otra parte, el cambio de la orientación de la galactosa de α a β , conlleva una pérdida total de la actividad funcional²⁹⁴.

Modificaciones en el carbono 6'' del azúcar, tienen más posibilidad de ser toleradas²⁹⁵, por lo cual se han introducido cambios como la adición de un fluoróforo para poder visualizar la α GC²⁹⁶, además de con objetivos funcionales. La adición de una acetamida, que incrementaría la solubilidad de la α GC, aumentó la estimulación de las iNKT²⁹⁷. Uno de los análogos que introducen una acetamida es el Nu- α -GalCer el cual genera una respuesta de tipo Th1, aumentando la producción de IFN γ ²⁹⁸.

Esta modificación causa que en vez de sobresalir el azúcar de la interacción CD1d-análogo-iTCR, se introduce dentro de una zona del bolsillo A' y se crea un puente de hidrógeno extra con el iTCR, estabilizando la interacción, aumentando la vida media del complejo CD1d-antígeno²⁹⁹, hecho que favorece una respuesta de tipo Th1. La introducción de otras modificaciones en el mismo carbono, como la adición de un polietilenglicol, dan lugar a una respuesta Th2,^{300,301}.

Otras modificaciones realizadas con el objetivo de incrementar la estabilidad de los análogos consisten en la sustitución del oxígeno del azúcar por un carbono, obteniendo los análogos carbocíclicos. Alguno de estos análogos (RCAI-56) aumentaron la producción de IFN γ por parte de las iNKT³⁰², y se han usado en modelos de autoinmunidad como inhibiendo la artritis inducida por colágeno con resultados positivos³⁰³.

1.5.2. Análogos aminociclitoles

En nuestro laboratorio hemos estudiado análogos sintéticos que aúnan estas dos últimas categorías de compuestos. Por una parte, se diferencian del agonista prototípico por sustituir el oxígeno del azúcar (**Figura 3**) por un carbono y también porque el oxígeno del enlace O-glicosídico se reemplazó por un grupo amino, motivo por el cual se les ha denominado aminociclitoles. Estas modificaciones implican la resistencia a las glucosidasas, por lo que probablemente incrementan su vida media en el cuerpo, y también potencialmente un mayor tiempo de interacción CD1d-análogo-iTCR.

Estudios realizados con estas moléculas han demostrado que son capaces de estimular los esplenocitos de ratón *in vitro*³⁰⁴, aunque a un nivel mucho menor que la α GC. A pesar de ser menos potentes, uno de los compuestos con la cabeza análoga a una glucosa, denominado HS44 (**Figura 4 A**), induce una producción de

IFN γ solo ligeramente inferior a la α GC *in vivo*, pero sin producción de citocinas de tipo Th2. En modelos de metástasis pulmonares inducidos con la línea tumoral B16-F10, la administración de HS44 generaba una respuesta antitumoral casi tan efectiva como la α GC, con diferencias sólo en dosis pequeñas de 10 μ g³⁰⁵.

La estructura tridimensional del complejo CD1d-HS44-iTCR, demostró que la afinidad del iTCR por el complejo CD1d-HS44 es 10 veces menor que la observada con CD1d- α GC, en concordancia con los estudios funcionales *ex vivo*. Este cambio de afinidad viene dado por la pérdida de un puente de hidrógeno que se generaba entre la α GC y el iTCR en la cabeza polar de la molécula. La disparidad entre los resultados *in vitro* e *in vivo* se explica por la resistencia a la degradación que presentan los análogos aminociclitolos permitiendo al compuesto tener una biodisponibilidad *in vivo* mayor, incrementando la capacidad de activación secundaria de la respuesta inmune y equiparándose su eficacia antitumoral a la del agonista tradicional³⁰⁵. Además, este análogo es más liposoluble que la α GC, lo que implica que hay una gran probabilidad que la unión CD1d sea totalmente por vía intracelular, contribuyendo así a la deriva hacia una respuesta de tipo Th1¹, tal y como se ha observado empíricamente³⁰⁵.

Otro análogo con un mayor potencial estimulador es el AC11 (**Figura 4 B**), puesto que la cabeza polar tiene una configuración análoga a la galactosa en vez de la glucosa y, por tanto, en principio, más eficiente en el reconocimiento por el iTCR. Este análogo inducía una mayor producción de citocinas Th1 tanto *in vitro* como *in vivo* comparado con HS44, siendo el nivel comparable a la α GC, pero sin la producción alguna de citocinas de la respuesta Th2 como IL-4 o IL-13³⁰⁶, sugiriendo un mayor potencial antitumoral que HS44 y que el agonista prototípico α GC.

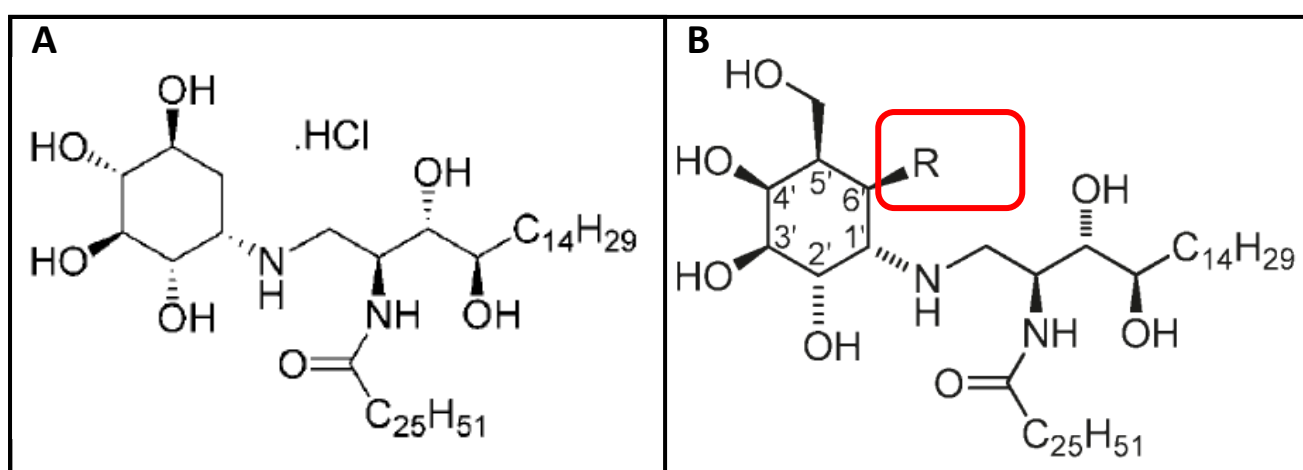


Figura 4: Representación de la estructura molecular de los análogos aminociclitolos HS44 (A) y AC11 (B). Figura A extraída de [Harrak Y. et. al.\(2009\)](#); Figura B extraída de [Harrak Y. et. al.\(2011\)](#)

1.5.3. Estudios funcionales previos de AC11

Estudios previos realizados en nuestro grupo con el análogo AC11, se recogieron tanto en [Herrak, Y et. al. \(2011\)](#) como en la tesis de [Esteban, I.](#) En estos, se pudo comprobar como AC11 es reconocido por líneas de hibridomas de iNKT *in vitro*, siendo capaz de generar una respuesta de IL-2 más potente que el HS44, aunque nunca llegando a dar una respuesta tan alta como la observada con α GC.

La capacidad de inducción de la respuesta inmune se estudió en ensayos *in vivo* mediante la cuantificación de los niveles sistémicos de citoquinas en suero. AC11, al igual que HS44 inducía una respuesta tipo Th1, totalmente exclusiva, sin niveles detectables de IL-4 o IL-13, pero de un nivel equivalente a la α GC. Más aún, inducía una masiva producción de IL-12 con una cinética mucho más sostenida que α GC.

La capacidad de reconocimiento por iNKT humanas, que justificase la continuación de la caracterización funcional como posible agente inmunoterapéutico, se realizó mediante estimulación *ex vivo* de PBMCs humanas co-cultivadas con una línea celular transfectada con CD1d humano. Estos ensayos demostraron que AC11 era reconocido por iNKT humanas, induciendo su proliferación, aunque con una potencia inferior a la α GC, tal y como ocurría en ratón.

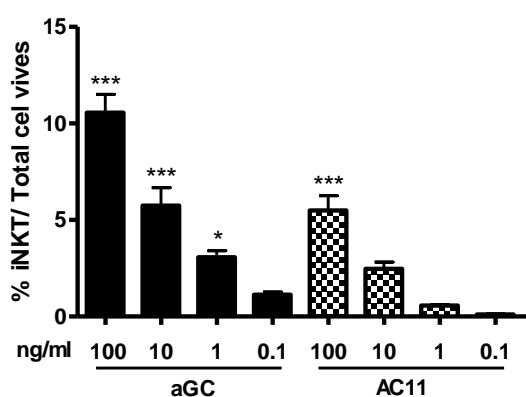


Figura 5: Resultados de la expansión de iNKT humanas con α GC y AC11 a diversas concentraciones durante 9 días de cultivo. Figura extraída de [Esteban, I.](#)

La utilidad como agente antitumoral se estudió en modelos tumorales de administración intraperitoneal de las líneas RMA y RMA-S (línea derivada de la RMA que no expresa MHC-I, por lo que es muy sensible al ataque por células NK³⁰⁷). La administración preventiva a día -3 demostró la mayor eficacia de AC11 que α GC en el control del crecimiento tumoral (**Figura 6 A y B**). La aplicación terapéutica a día+1 mostró también la superioridad de AC11 por cuanto daba un control del crecimiento tumoral, aunque inferior a la aplicación preventiva, mientras que α GC no ejercía ningún control.

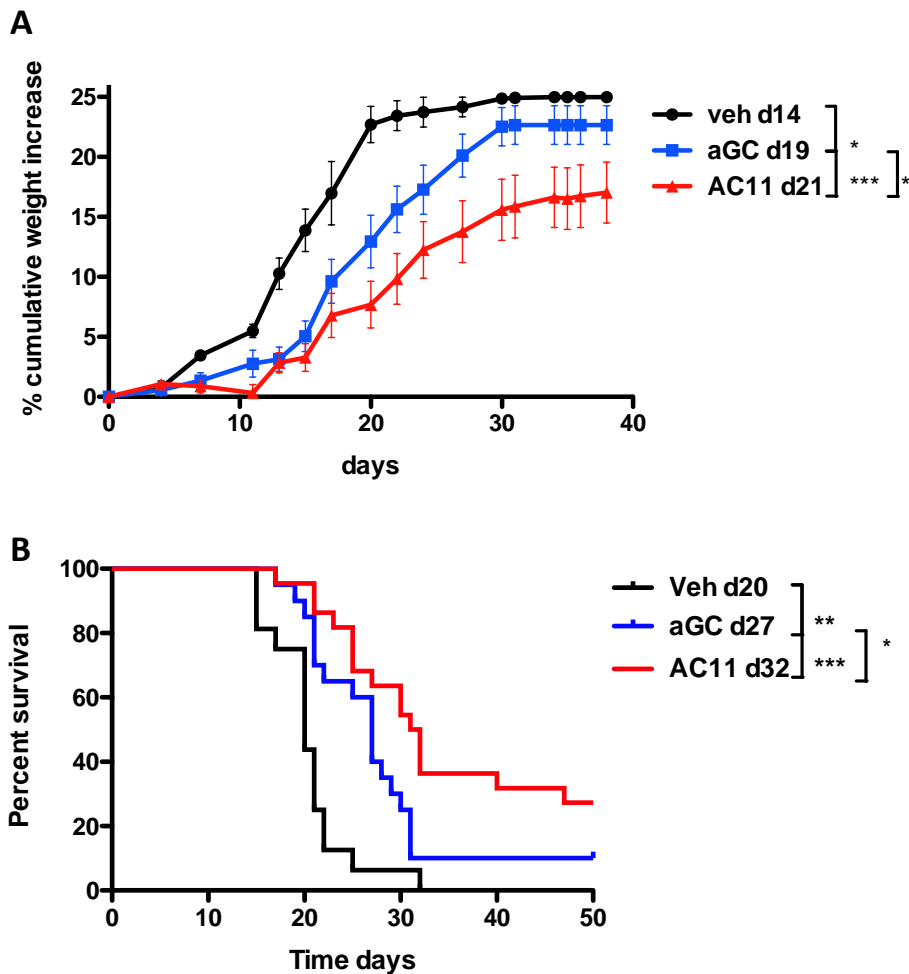


Figura 6: Resultados de los experimentos de inoculación de los tratamientos a día -3 en el modelo RMA. Los datos del gráfico **A** indican el aumento de peso respecto a su peso inicial a día 0, con media \pm SEM. El gráfico **B** representa el porcentaje de animales que no han llegado al punto final cada día que se ha realizado el seguimiento. Los tratamientos se han inoculado a 100ng/animal. Resultados de 3 experimentos independientes. Figura de [Esteban, I.](#)

Ensayos de citotoxicidad *in vivo* en este mismo modelo demostraron la superioridad de AC11 en la inducción de una respuesta inmune que eliminara las células tumorales. La administración intravenosa de los agonistas, que induce una respuesta menos eficaz en la eliminación de los tumores que la aplicación local, permitió corroborar que AC11 también inducía una respuesta más eficaz frente a RMA-S. Estos ensayos permiten analizar la implicación de poblaciones inmune efectoras en la eliminación de las líneas tumorales, mediante la depleción mediada por anticuerpos específicos de los distintos tipos celulares. Se pudo comprobar diferencias mecánicas entre aGC y AC11, de tal manera que la eliminación de las células tumorales en el caso de aGC era totalmente dependiente de las células NK, mientras que con AC11 éstas solo jugaban un papel parcial, siendo responsables de la citotoxicidad del 50% de las líneas tumorales a las dosis usadas.

Seguidamente, se realizó un estudio sobre la citotoxicidad que eran capaces de estimular los compuestos frente a las células tumorales. En estos ensayos se observó que tanto el AC11 como la α GC son capaces de

inducir una respuesta antitumoral significativa, la cual es dependiente de la vía de administración de los compuestos (**Figura 7**) (hecho que correlaciona con las observaciones de expansión de las poblaciones linfocitarias). Para comprender exactamente que poblaciones son relevantes para esta actividad, se realizaron ensayos de depleción de diferentes poblaciones, obteniendo como resultado que las células NK y los macrófagos son relevantes en las respuestas desarrolladas por ambos compuestos, pero mientras que la supresión de las NK elimina completamente la actividad de la α GC, con el AC11 se mantiene hasta un 50% de su actividad contra las células tumorales. Esta actividad NK independiente no se ha conseguido descifrar, pero es un indicativo de la diferencia en las formas de estimular el sistema inmune que tienen ambos compuestos.

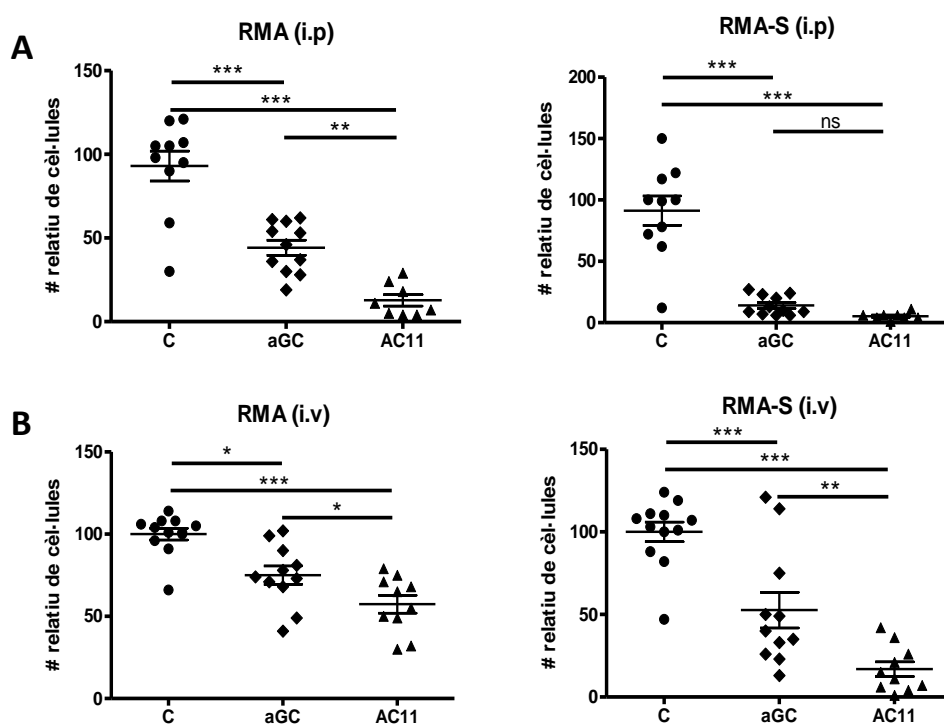


Figura 7: Eliminación de células tumorales *in vivo* generadas por 100ng de α GC o AC11 3 días antes de la inoculación de las células tumorales. Las células tumorales se marcaron antes de ser inoculadas al peritoneo con CMFDA y 24h después se recuperaron para su recuento por citometría de flujo. Se pueden observar los datos de citotoxicidad cuando la inoculación de los compuestos es intraperitoneal (**A**) o intravenosa (**B**). Figura extraída de [Esteban, I.](#)

En otra línea de investigación se quiso estudiar el efecto sinérgico de la activación de las iNKT con el tratamiento deplecionante anti-CD20 usado en pacientes de linfomas no Hodgking³⁰⁸, que a veces no tienen una respuesta duradera³⁰⁹ y no son capaces de eliminar los linfocitos B alojados en los tejidos³⁰⁹. Ensayos iniciales de depleción de linfocitos B mostraron que el uso conjunto de AC11 permitía reducir un 60% la dosis de anticuerpo deplecionante. Usando el modelo de células tumorales del ratón E μ -myc, el tratamiento conjunto AC11+anti-CD20 no demostró beneficio alguno en la pauta usada. Pero en el caso de α GC no solo no se observó beneficio alguno, sino que incluso disminuyó la eficacia del tratamiento deplecionante, efecto deletéreo con confirmado en otras aproximaciones experimentales³¹⁰. Estos ensayos pusieron de manifiesto

las diferencias de comportamiento entre el AC11 y la α GC, demostrando una mayor seguridad de la utilización de AC11 como agonista para la inducción de respuesta inmune segura.

Todos estos resultados obtenidos son los que nos han llevado a estudiar AC11 como inductor de una respuesta antitumoral específica en diversos modelos tumorales con el objetivo futuro de una posible traslación a tratamientos humanos más eficaz y segura que con los agonistas actualmente en ensayos clínicos.

2. Objetivos

Los objetivos planteados para esta tesis fueron:

- Evaluar la actividad antitumoral de AC11 en referencia a la generada por el agonista prototípico de las iNKT
 - La consecución de este objetivo busca certificar si nuestro análogo es un mejor candidato para desarrollar tratamientos en humanos dadas las evidencias reveladas en estudios previos, así como revelar posibles contraindicaciones o factores relevantes en la elaboración de un tratamiento efectivo en pacientes oncológicos a combinar con los tratamientos ya existentes.

- Analizar la respuesta *in vivo* al tratamiento con AC11 en comparación a la respuesta frente a la α GC
 - Los ensayos enfocados en este objetivo buscan el conocimiento sobre la actividad del AC11 sobre las iNKT *in vivo*, con la finalidad de conocer en detalle las diferencias con el agonista prototípico y valorar posibles factores relevantes en la actividad de las iNKT que a futuro deban ser tenidos en cuenta tanto para continuar profundizando nuestros conocimientos sobre esta población como para desarrollar tratamientos que las aprovechen eficientemente.

- Valorar la respuesta inmune específica contra antígenos tumorales
 - Con este objetivo se busca determinar si el tratamiento con AC11 es capaz de ser efectivo a largo plazo, tanto eliminando el tumor como evitando la aparición de tumores secundarios. Además, en caso de que el tratamiento no fuese capaz de eliminar completamente las células malignas, de generar una respuesta antígeno-específica se obtiene un control más eficiente de la masa tumoral, siendo este otro de los motivos que dan relevancia a la valoración de esta actividad.

3. Material y métodos

3.1. Cultivo de las líneas tumorales

Para la realización de los ensayos de esta tesis, se ha trabajado con líneas tumorales murinas de la cepa C57 BL/6J, las cuales son:

RMA: Sublínea de timoma derivada de la línea RBL-5, la cual fue inducida a través del virus de la leucemia de ratón de Rauscher. Cedida por la Dra. Pilar Lauzurica.
B16-F10: Línea de melanoma de C57 BL/6J ²⁰³ . Cedida por la Dra. Pilar Lauzurica.
B16-F10-OVA: Línea transfectante expresante de OVA de pollo citosólica derivada de la B16-F10.
EL-4: Línea celular de timoma de la cepa murina C57 BL/6J. Cedida por el Dr. Ignacio Melero.
EG-7: Línea transfectante derivada de la EL-4 la cual expresa OVA de pollo. Cedidas por el Dr. Ignacio Melero y por el Dr. Francisco Lozano.

Tabla 1: Líneas tumorales murinas

Todas las líneas han sido criopreservadas en FBS 10% DMSO a -80°C y una concentración aproximada de 10⁶ células/ml hasta el momento de su uso. La descongelación se realiza en un baño a 37°C, transfiriéndose a un tubo de 15ml de fondo cónico con 9ml de medio RPMI 1640 con GlutaMax (61870-010, Gibco), 50µM 2-β-mercaptoetanol, 1% glutamina (25030, Gibco) y 5% FBS a 4°C. Seguidamente, se centrifuga 5 min a 700 RPM, descartándose el sobrenadante y se resuspende el pellet en 10ml de medio RPMI 1640 suplementado completamente al 10% FBS. Se cultivan en flasks (RMA, EL-4 y EG-7) o en placa (B16-F10 y B16-F10-OVA) a 37°C, 5% CO₂ y un ambiente saturado de humedad.

En el caso de las líneas de melanoma, cultivadas en placa, los pases se realizan al llegar a una coalescencia superior al 60%. Tras 2 lavados con 5ml de PBS, se añaden 2ml de PBS con tripsina-EDTA (T4049, Sigma) a la concentración deseada (en función de la línea específica y el lote de tripsina usado) durante 1-2 minutos, parándose la reacción con 3ml de medio RPMI 1640 suplementado al 5% FBS. Mecánicamente con un pipeteador se acaban de levantar las células adheridas al plástico y se siembran en una nueva placa a la dilución adecuada en función de las necesidades del cultivo (mantenimiento o expansión).

3.2. Preparación de las suspensiones celulares para su administración *in vivo*

Una vez las líneas celulares han pasado 7 días en cultivo tras su descongelación y han tenido como mínimo 3 pases, se considera que el cultivo es estable y está en la fase de crecimiento exponencial. En este punto, las células se transfieren al medio de inoculación, el cual debe ser apto para mantener en buen estado la suspensión celular pero no contener ningún compuesto que pueda generar reacciones en el animal.

Células expandidas en estado óptimo observable por microscopía, son recogidas en tubos Falcon y cuantificadas con tripan blue para administrar la cantidad apropiada. Tras su centrifugación 5' a 700 RPM, se resuspenden en medio RPMI 1640 sin suplementar a 4°C. Se realiza un segundo conteo con tripan blue para poder determinar con exactitud el volumen final requerido y se añade medio hasta llegar a la concentración deseada, manteniéndose en frío hasta su administración.

3.3. Análisis de apoptosis en líneas tumorales

Se realizó un marcaje con Annexin V y PI con el objetivo de poder valorar el grado de apoptosis. Primero, se dispuso 200µl de la solución de células a estudiar en una placa de 96 pocillos con fondo en V.

Después de realizar los lavados pertinentes, para cuantificar el nivel de apoptosis conseguido, las líneas tratadas con diferentes métodos se marcaron con Annexin V a una dilución 1/100 (130-097-928, Miltenyi Biotec) en Annexin V binding buffer 15' a 4°C. A continuación, se lavó el exceso, y se resuspendieron las células en una solución de Annexin V binding buffer con PI 1/2500, y se pasó las células por el citómetro de flujo para su posterior análisis. Como controles se usaron, por un lado, células que no se han sometido a ningún estímulo y por otro, como control de necrosis, un vial con células se sometió a 3 ciclos de congelación/descongelación en N₂ líquido.

3.4. Preparación de los tratamientos estimuladores

Tanto la αGC como el AC11 son compuestos liposolubles, los cuales se han combinado una suspensión de OVA de pollo o con suspensiones celulares. Por este motivo, las soluciones siempre se han preparado con una concentración de DMSO del 2.5%. Para la preparación de dichas soluciones, se ha establecido el siguiente protocolo:

En primer lugar, se descongelan las alícuotas de DMSO, α GC y AC11 en el baño a 37°C, junto con los diluyentes correspondientes a cada experimento (PBS o RPMI sin suplementar). Alcanzada la temperatura, se dispone el DMSO en los tubos. A continuación, se hace un vórtex a los viales con los compuestos durante un mínimo de 30 segundos a 2750 RPM/min, paso que se repite después añadir cada elemento a la solución, para garantizar la homogeneidad de la solución final. Seguidamente, se adquieren los análogos del vial de stock (dada la viscosidad del solvente, se debe tener especial precaución en secar la parte exterior de la punta de la pipeta, para así minimizar el error de pipeteo) y a continuación se disponen dentro del volumen de DMSO. A continuación, se añade diluyente hasta alcanzar la mitad del volumen final. Cuando se combinan con OVA (LS003056, Worthington) o una suspensión de células apoptóticas, estos se preparan a parte a una concentración 2 veces mayor que la final y son mantenidos a 37°C. Al añadir la segunda mitad del diluyente, se usa la solución con antígenos tumorales 2x. En el caso de los experimentos en que los tratamientos se han combinado con OVA, el diluyente ha sido PBS LPS free, y cuando se han combinado con una suspensión celular, el diluyente ha sido RPMI 1640 sin suplementar. Una vez preparados los viales, se han mantenido a 37°C en un baño seco hasta su inoculación. Todos los tratamientos a animales se han inoculado con una aguja de 27G y en un volumen de 200ml/animal intraperitonealmente.

3.5. Administración de las líneas tumorales y seguimiento de su crecimiento

Los animales utilizados en estos estudios han sido ratones de la cepa C57 BL/6J, estabulados de acuerdo con la normativa establecida en el RD 53/2013 del 1 de febrero por el *Servicio de estabulario* de la Universidad Autónoma de Barcelona, con un ciclo de día y noche de 12h. Todos los procedimientos realizados en los mismos han sido previamente aprobados por el Comité de Ética, siempre procurando minimizar el número de animales a usar y el sufrimiento de estos. Por este motivo, cuando un animal ha mostrado algún síntoma de sufrimiento (falta de acalamiento, conducta de estrés o cualquier otro marcador como la presencia de heridas) ha sido eutanasiado tal y como marcan los protocolos éticos. Así mismo, tal y como establecen los protocolos de bioseguridad, al estar trabajando con líneas tumorales, consideradas como agentes carcinógenos, los animales a los que se les administra tumor son trasladados a jaulas de aislamiento con ventilación individualizada y se manipulan en cabina de seguridad biológica. La administración de las líneas tumorales se realiza con una aguja de 27G. Salvo causas de fuerza mayor, se ha trabajado con animales entre 6 y 12 semanas de edad. Los animales han sido identificados individualmente por marcas en las orejas.

Para poder seguir la evolución de los tumores, se han establecido unos criterios de punto final, de acuerdo a los estándares éticos establecidos por la Generalitat de Catalunya y aprobados en los correspondientes procedimientos animales.

- Modelo intraperitoneal RMA

Se inocular la línea tumoral en suspensión en el peritoneo (200ml/animal; 10.000 células/animal), realizándose el seguimiento del crecimiento tumoral por el aumento de peso. El día de inoculación de la línea tumoral (día 0) se ha tomado el peso de cada animal como referencia. A partir de entonces, se ha realizado un seguimiento regular del peso del animal, y al alcanzar un peso un 30% superior, se considera que el tumor supone un 25% del peso del animal (dado que está establecido que hasta un 5% de variación del peso normalmente es justificable por el crecimiento del propio animal, especialmente en edades tempranas), procediéndose a la eutanasia del mismo.

- Modelos subcutáneos

Al menos 3 días antes de la inoculación de las líneas tumorales, se rasura el pelo de la zona del flanco derecho de los animales, para visualizar correctamente el crecimiento del (modelo usado con las líneas B16-F10, B16-F10-OVA, EL-4 y EG-7). El margen de 3 días entre el rasurado y la transferencia del tumor es para minimizar el efecto que podría tener la irritación de la piel, la cual puede conllevar una ligera inflamación que puede afectar al desarrollo del tumor o a la respuesta inmunitaria contra el mismo. A día 0 se transfieren las líneas tumorales subcutáneamente en la zona rasurada (200ml/animal; 500.000 células/ animal con las líneas B16-F10, B16-F10-OVA y EG-7, 250.000 células/animal con la línea EL-4). Se verifica la inoculación subcutánea por la aparición de una pequeña burbuja en la zona del inculo, la cual se reabsorbe en las siguientes horas. En los siguientes días hasta la finalización del tratamiento, se ha revisado periódicamente todos los animales en la zona rasurada. En el caso de detectar una masa visible de células tumorales, estas se miden diariamente con un pie de rey en longitud y anchura, dos veces. Asumiendo que los tumores subcutáneos crecen de una forma esférica u ovalada (lo cual correlaciona bastante con lo observado experimentalmente) se calcula el volumen de los tumores siguiendo la siguiente formula: $\frac{1}{2} \times \text{media de medidas mayores} \times \text{cuadrado de la media de medidas menores}$.

Cuando el volumen ha superado los 4.000mm³ en el modelo EL-4 se ha considerado el punto final. En el caso de los modelos con las líneas B16-F10 y B16-F10-OVA, los tumores se ulceran, estableciéndose como punto final en estos modelos los 1.500mm³.

- Modelo intravenoso de metástasis pulmonar

Este se realizó con las líneas de melanoma B16-F10 y B16-F10-OVA. A día -7 se realizó la administración de los diversos tratamientos intraperitonealmente. A día 0 inoculan 500.000-1.000.000 células intravenosamente (línea B16-F10 y línea B16-F10-OVA respectivamente) a través de las venas caudales. Para ello, los animales se colocan bajo una lámpara de calor durante un periodo de tiempo corto, y a continuación se han colocado dentro de un cepo que permite tener la cola del animal libre, la cual se limpia con etanol y se transfieren las

células con una aguja de 27G. Se ha verificado la entrada de la suspensión celular en el torrente sanguíneo por la aparición de sangre en el interior de la jeringa. Realizada la administración, se dejaron los animales durante 14-17 días en los cuales únicamente se controló su estado de salud, al cabo de los cuales son eutanasiados por sobredosis de CO₂, recuperándose el líquido peritoneal, nódulos linfáticos y bazo para análisis por citometría, y los pulmones para realizar el conteo de tumores. Este conteo se realiza de forma manual, y en el caso de que haya un número muy elevado se corta una parte al azar de los pulmones, se cuenta esta fracción y se interpola el número total con la relación entre el peso total de los pulmones y el de la fracción contabilizada. Se establece como límite máximo los 700 tumores por órgano, ya que más allá están tan colonizados que es imposible dar un dato preciso.

- Criterios de exclusión

Los datos de un animal han sido excluidos de un experimento si este se ha desviado de la media de su grupo y se ha encontrado una explicación plausible a esta desviación. Así mismo, si ha presentado cualquier síntoma de patología no asociada al tumor (como mostrar conductas de estrés marcadas o heridas en la zona de administración) o si por algún motivo se ha hallado muerto y este fallecimiento no es explicable por la evolución normal del tumor.

3.6. Recuperación de órganos y preparación para su análisis

Para poder valorar y cuantificar la respuesta inmune generada, en algunos experimentos se han recuperado órganos linfoides secundarios y el tejido diana para el estudio por citometría de flujo de poblaciones inmunes de interés.

- Líquido peritoneal

Para la obtención del contenido celular del peritoneo la eutanasia debe realizarse con CO₂, con el fin de evitar dañar cualquier estructura, ya que el mínimo desgarro abdominal imposibilitaría la recuperación de la suspensión celular.

Después de la eutanasia, rápidamente se hace una pequeña incisión en el vientre del animal, cortando únicamente una pequeña parte de la piel, sin llegar a cortar el peritoneo. Realizada la incisión, se inoculan 5ml de PBS a 4°C (que puede contener EDTA para favorecer la liberación de las células) con una aguja de 27G y se realiza un enérgico masaje para homogeneizar la suspensión durante un mínimo de 30 segundos. Seguidamente, con una aguja de 21G se recupera 1.5-3ml de la suspensión celular, la cual se conserva a 4°C.

- Nódulos linfáticos poplíteos

Se localizan subcutáneamente tanto cerca de las extremidades anteriores como de las posteriores. Para extraerlos, sobre todo los delanteros, también es recomendable un método de eutanasia como asfixia por CO₂, ya que, si se realiza una luxación cervical, los daños ocasionados en la zona del cuello normalmente causan pequeñas hemorragias que pueden dificultar o imposibilitar la extracción.

Para su recuperación, se abre la piel del animal desde las ingles hasta el esternón y hasta cerca de los tarsos y los carpos, para seguidamente separar la piel del cuerpo, dejándola extendida bajo el animal. Después de fijarla, se identifican los nódulos a extraer, y con un instrumento afilado fino (un punzón o una aguja) se procede a separarlos de la grasa y tejido conectivo que tienen alrededor, hasta sacar una pequeña esfera que al contrario del tejido adyacente no se desmenuza en un tejido elástico. Puede darse el caso de que durante la extracción se rompa algún capilar cercano, principalmente en los nódulos axilares. En este caso, se limpian haciendo pasar un pequeño volumen de PBS por su superficie hasta quedar limpios, y se almacenan en un tubo con PBS a 4°C. Después, se disgregan en 1ml de PBS a 4°C en una placa de fondo plano, con el émbolo de una jeringa y una malla de nylon. El disgregado se recupera y se almacena en un tubo a 4°C. Habitualmente se han extraído los nódulos linfáticos poplíteos del tren inferior.

- Médula ósea

Esta se puede extraer de diversos huesos largos, aunque habitualmente se realiza con el fémur, al ser el hueso largo de mayor tamaño. En el caso de este documento, se ha extraído el fémur derecho de los animales.

Después de haber abierto la piel como se describe en la extracción de los nódulos linfáticos poplíteos, se retira con cuidado toda la musculatura adyacente. A continuación, se cortan la tibia y el peroné cerca de su epífisis para liberar la parte inferior. Seguidamente se procede a cortar todos los ligamentos del fémur con la cadera del animal, y se disloca la cabeza del fémur de su inserción para poder liberarlo. Una vez separado, se limpia todo el tejido conjuntivo y muscular que pueda haber quedado adherido y se pone el fémur con las cabezas de tibia y peroné en un tubo con PBS a 4°C. Después, para extraer las células de la médula, se cortan las dos epífisis del fémur y se hace circular 2ml de PBS a 4°C por su interior por cada extremo, y el líquido se recoge en un tubo de 15ml, el cual se centrifuga 5 min a 700 RPM/min, se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en 1ml de PBS a 4°C.

- Bazo

Este se recupera después de recuperar el líquido peritoneal y los nódulos linfáticos poplíteos, porque implica rasgar el peritoneo, lo cual imposibilita recuperar los anteriores. Con el animal colocado y abierto como se ha comentado con anterioridad, se procede a hacer una incisión vertical en el peritoneo, la cual una vez llega al esternón se extiende hacia la parte izquierda del animal. A continuación, se retira todo el sistema digestivo

con cuidado de no dañar ninguna estructura, se corta todo el tejido conectivo alrededor del bazo y se va separando con cuidado de sus estructuras adyacentes. Una vez extraído, se limpia y se mantiene en PBS a 4°C. Después, se coloca en una placa de 24 pocillos con 1ml de PBS a 4°C y se disgrega en la misma ayudado con el émbolo de una jeringa y una malla de nylon para evitar que patine (igual que con los nódulos linfáticos poplíteos). Seguidamente, se recupera el disgregado y se almacena en un tubo a 4°C.

- Pulmones

En el caso de los modelos intravenosos, el animal colocado decúbito supino y ya habiendo recuperado todos los órganos anteriormente mentados, se realiza primero una pequeña incisión en el diafragma, con el objetivo de que se deshinchen los pulmones para evitar dañarlos. A continuación, se cortan las costillas por la parte más lateral posible, y se continua el corte hasta sacar la parte frontal de las mismas junto con el esternón. Una vez retiradas, con una pinza se levantan y cuidadosamente se va cortando todas las adherencias con la cavidad torácica. Por último, se separan el corazón y el timo sin dañarlos (para evitar un sangrado masivo en la cavidad) y se corta la tráquea, con la cual se retira los pulmones de la cavidad. Una vez extraídos, se mantienen en placas con PBS a 4°C hasta realizar el conteo de tumores.

3.7. Análisis por citometría de flujo

Las suspensiones celulares de los diversos órganos se marcan en placas de 96 pocillos con fondo en V dispensándose 200µl de cada suspensión convenientemente diluidas en función de su concentración. A continuación, se centrifugan 3 min a 1.000 RPM/min. En el caso de los tejidos que tienen eritrocitos (como el bazo) se incuban con 60µl de buffer RBL (R7757, Sigma) 3 min a 4°C, parándose la lisis con 120µl de PBS, y se realiza otro lavado. Después se bloquean los receptores Fc con anti FcR (130-092-575, Miltenyi Biotec) a una concentración de 1/12.5, 15 min a 4°C. Seguidamente, se realiza otro lavado con PBS a 4°C y se marcan con una mix del panel de anticuerpos a utilizar (**Tabla 2**), durante 15 min a 4°C. Pasado este tiempo, se realiza otro lavado y se resuspenden los pellets en el volumen final de marcaje. Para excluir las células dañadas, se tiñe con DAPI (Miltenyi Biotec) o con 7AAD (Miltenyi Biotec). Dependiendo del citómetro a utilizar después de esta resuspensión, las muestras han sido traspasadas a tubos para su adquisición.

En las muestras que se marcan con tetrámero de CD1d cargado con αGC para detectar las iNKT, entre el bloqueo de los receptores Fc y el marcaje con la mix de anticuerpos, se realiza el marcaje con el mismo incubando 25 min a temperatura ambiente, y después se prosigue con el protocolo normal.

Antígeno	Clon	Fluoroforo	Casa comercial	Dilución
Tetrámero de CD1d cargado con α GC	CD1-PBS57	A488	NIIH tetramer core Facility	1/100
Tetrámero de CD1d cargado con α GC	CD1-PBS57	PE	NIIH tetramer core Facility	1/200
Tetrámero de CD1d cargado con α GC	CD1-PBS57	A647	NIIH tetramer core Facility	1/400
F4/80	BM8	FITC	eBioscience	1/200
Siglec-H	551.3D3	FITC	Miltenyi Biotec	1/25
V β 8	F23.1	FITC	Becton Dickinson	1/100
NK1.1	PK136	FITC	eBioscience	1/100
CD4	H129.19	FITC	Becton Dickinson	1/100
TCR β	REA318	FITC	Miltenyi Biotec	1/25
CD86	PO3.3	FITC	Miltenyi Biotec	1/25
CD8	53-6.7	PerCP	Miltenyi Biotec	1/25
CD11c	N418	PerCP	eBioscience	1/100
B220	RA3-6B2	PerCP	eBioscience	1/200
PD-L2	MIH37	PerCP-Vio770	Miltenyi Biotec	1/25
TCR β	H57-597	PE	eBioscience	1/400
I-Ab (MHC-II)	REA528	PE	Miltenyi Biotec	1/25
CCR6	REA227	PE	Miltenyi Biotec	1/25
CD8	53-6.7	PE	Miltenyi Biotec	1/50
CD27	LG.7F9	PE	eBioscience	1/100
CD11b	M1/70.15.11.5	PE	Miltenyi Biotec	1/800
CD14	REA934	PeVio615	Miltenyi Biotec	1/200
NK1.1	PK136	Pe-Vio770	Miltenyi Biotec	1/25
Ly6C	167.G10	Pe-Vio770	Miltenyi Biotec	1/25
CD11b	M1/70	Pe-Cy7	eBioscience	1/1600
CXCR5	REA215	Pe-Vio770	Miltenyi Biotec	1/25
TCR β	H57-597	Pe-Cy7	eBioscience	1/250
PD1	HA2-7B1	APC	Miltenyi Biotec	1/25
GR1	RB6-8C5	APC	eBioscience	1/800
CXCR3	CXCR3-173	APC	Miltenyi Biotec	1/50
CD25	7D4	APC	Miltenyi Biotec	1/25
CD19	6D5	APC-Vio770	Miltenyi Biotec	1/25
CD11b	1/70.15.11	APC-Vio770	Miltenyi Biotec	1/600
CD11c	N418	APC-Vio770	Miltenyi Biotec	1/100
CD62l	EL14-H2.100	VioBlue	Miltenyi Biotec	1/150
CD24	M1/69	VioBlue	Miltenyi Biotec	1/25
CD4	GK1.5	VioGreen	Miltenyi Biotec	1/75

Tabla 2: Anticuerpos usados en marcajes de citometría de flujo

Todas las muestras han sido analizadas en el *Servicio de Cultivos celulares (SCAC)* de la Universidad Autónoma de Barcelona. Los aparatos utilizados han sido: FACSCalibur (Becton Dickinson), FACSCanto (BD Biosciences) y CytoFLEX LX (Beckman Coulter). Los datos obtenidos han sido analizados con el software FlowJo V10 (TreeStar).

3.8. Análisis estadístico

Los datos obtenidos del crecimiento de los diversos modelos tumorales han sido analizados con el paquete de análisis de R *TumorGrowth*³¹¹, que permite hacer un análisis comparativo del crecimiento de los tumores con una *two way ANOVA*. El análisis de la supervivencia Log-rank (Mantel-Cox) test se ha realizado con el software GraphPad Prism 5 version 5.03.

El análisis estadístico de los datos de citometría de flujo y de cuantificación de metástasis pulmonares, se ha realizado mediante *one way ANOVA* y con análisis post-test-*Tukey's Multiple comparison Test* con el software GraphPad Prism 5 version 5.03. Todos los gráficos han sido realizados con este mismo software.

4. Resultados

4.1. Establecimiento del protocolo de inducción de apoptosis

Con el objetivo de inducir una respuesta antitumoral específica se han planteado dos estrategias generales. Por una parte, la utilización de líneas tumorales que expresen un antígeno modelo, en nuestro caso la OVA, que permite la inmunización antígeno-específica. Por otra parte, la utilización de células tumorales totales para la inmunización, en las que se desconocen cuáles pueden ser los antígenos asociados o específicos de tumor que puedan inducir una respuesta específica, pero que por una parte amplía el abanico de posibles antígenos y, por otra parte, se acerca más a la utilización clínica de estrategias de vacunación terapéutica actualmente en desarrollo.

En relación con esta segunda estrategia y contrariamente a lo que anteriormente se pensaba, la utilización de células necróticas como fuente antigénica para la inmunización no es la vía más efectiva para conseguir una respuesta antitumoral³¹². Por el contrario, la inducción de apoptosis (entre otras opciones), si procura una muerte antigénicamente activa capaz de generar una respuesta antitumoral eficiente^{202,313}. Diversas aproximaciones experimentales sencillas como el calor^{314,315}, el peróxido de hidrógeno³¹⁶, la radiación gamma³¹⁷ o la radiación ultravioleta³¹⁸, se han usado para la generación de células apoptóticas útiles para la inmunización.

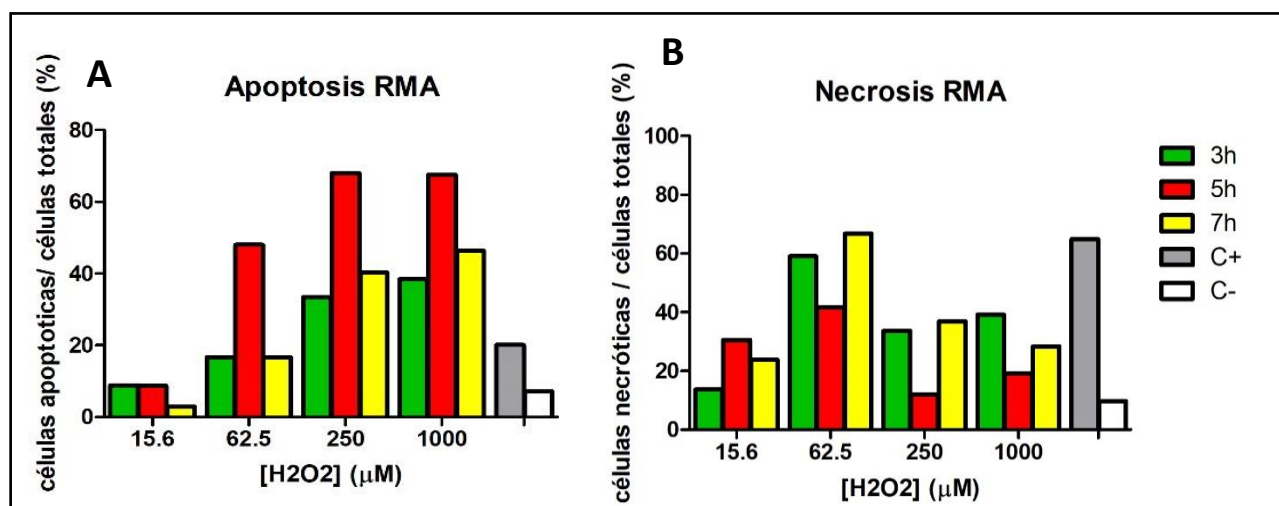


Figura 8: Análisis de la apoptosis por H₂O₂. Apoptosis analizada como se ha descrito en el apartado 3.3. No se muestra desviación dado que por limitaciones técnicas solo se analizó una muestra por condición. Dado que los marcadores de apoptosis tardan un tiempo en ser detectables, el análisis fue realizado tras una incubación O/N. Los controles positivos (células sometidas a tres ciclos de congelación en N₂) se concentraron un mínimo de 3 veces para poder obtener suficientes células para el análisis.

Nosotros hemos elegido dos estrategias que en principio serían fáciles de usar y controlables y que deberían dar resultados apropiados, como son el peróxido de hidrógeno y la radiación ultravioleta. Primero, probamos el H₂O₂, variando tanto el rango de concentraciones (15,6μM a 1mM) como el tiempo de aplicación (de 3 a 7h). En la **Figura 8** se muestra el resultado de uno de los experimentos con la línea celular RMA, cuantificando el porcentaje de células apoptóticas y necróticas obtenidas en las diversas condiciones. Se incluyen como controles tanto células sin manipular, C-, como controles positivos C+ de células necrotizadas mediante 3 ciclos de congelación/descongelación en N₂ líquido. Si bien el resultado puede ser adecuado, la repetitividad es muy baja, habiendo grandes diferencias entre distintos ensayos que impidieron establecer un protocolo suficientemente fiable para un uso adecuado en los experimentos de inmunización. Otras líneas, como B16-F10, fueron también ensayadas, con resultados también excesivamente dispares que imposibilitaron la continuación de esta estrategia. Igualmente, otras variables que podían haber influido en los resultados, como la incubación en ausencia de suero durante el tratamiento, no demostraron tener influencia alguna, sirviendo por otra parte como control de la viabilidad celular en los rangos de tiempo máximos que se utilizan durante la manipulación de la experimentación *in vivo*.

La segunda estrategia de inducción de apoptosis fue la radiación ultravioleta. Para irradiar las células, se utilizó un UV Stratalinker del *Servicio de Genómica y Bioinformática (SGB)* de la Universidad Autónoma de Barcelona.

En primer lugar, se pusieron a punto las condiciones de irradiación para la línea de melanoma B16-F10. Los ensayos de dosis respuesta revelaron que la dosis de radiación ultravioleta con la que se obtiene un mayor porcentaje de células apoptóticas está entre los 900 y los 1200 (x100μJ/cm²) (**Figura 9 A**). Dado que estas células son muy sensibles al tratamiento para despegarlas de la placa de cultivo (tripsinización y manipulación manual), se analizaron también las condiciones de mantenimiento durante 2 horas, el tiempo aproximado que transcurre entre la irradiación y la administración a animales en los ensayos de vacunación. Por ello se testaron tanto la temperatura de mantenimiento como la suplementación del medio RPMI 1640 con L-glutamina, FBS y 2-β-mercaptoetanol (el FBS en ningún caso podría formar parte del medio de inoculación) (**Figura 9 B**). Estas pruebas determinaron que la mayor proporción de células apoptóticas se obtiene tras la irradiación a un máximo de 1200 (x100μJ/cm²), y manteniendo las células a 37°C en medio sin suplemento de ningún tipo.

Análisis similares con las otras dos líneas tumorales usadas en los diversos estudios, EL-4 y RMA, determinaron que la dosis idónea era de 2400 ($\times 100\mu\text{J}/\text{cm}^2$) (**Figura 9 C**). En la línea RMA los datos revelan aproximadamente un 40% de células vivas tras el tratamiento, pero este es un artefacto debido a cambios morfológicos de las células tras su irradiación, impidiendo diferenciar células vivas de restos celulares que no incorporen nuestros marcadores, motivo por el que se cuantifica como células vivas. Dada esta problemática, se decidió analizar el número total de células apoptóticas en esta línea (**Figura 9 D**), revelándose que una radiación de 4800 ($\times 100\mu\text{J}/\text{cm}^2$) daña en exceso las células, con la consecuente pérdida de células apoptóticas, mientras que con las dosis de 1200 ($\times 100\mu\text{J}/\text{cm}^2$) y 2400($\times 100\mu\text{J}/\text{cm}^2$) se obtienen números de células apoptóticas similares. Estas evidencias determinaron que la dosis idónea para obtener un mayor número de células apoptóticas en esta línea es de 2400 ($\times 100\mu\text{J}/\text{cm}^2$).

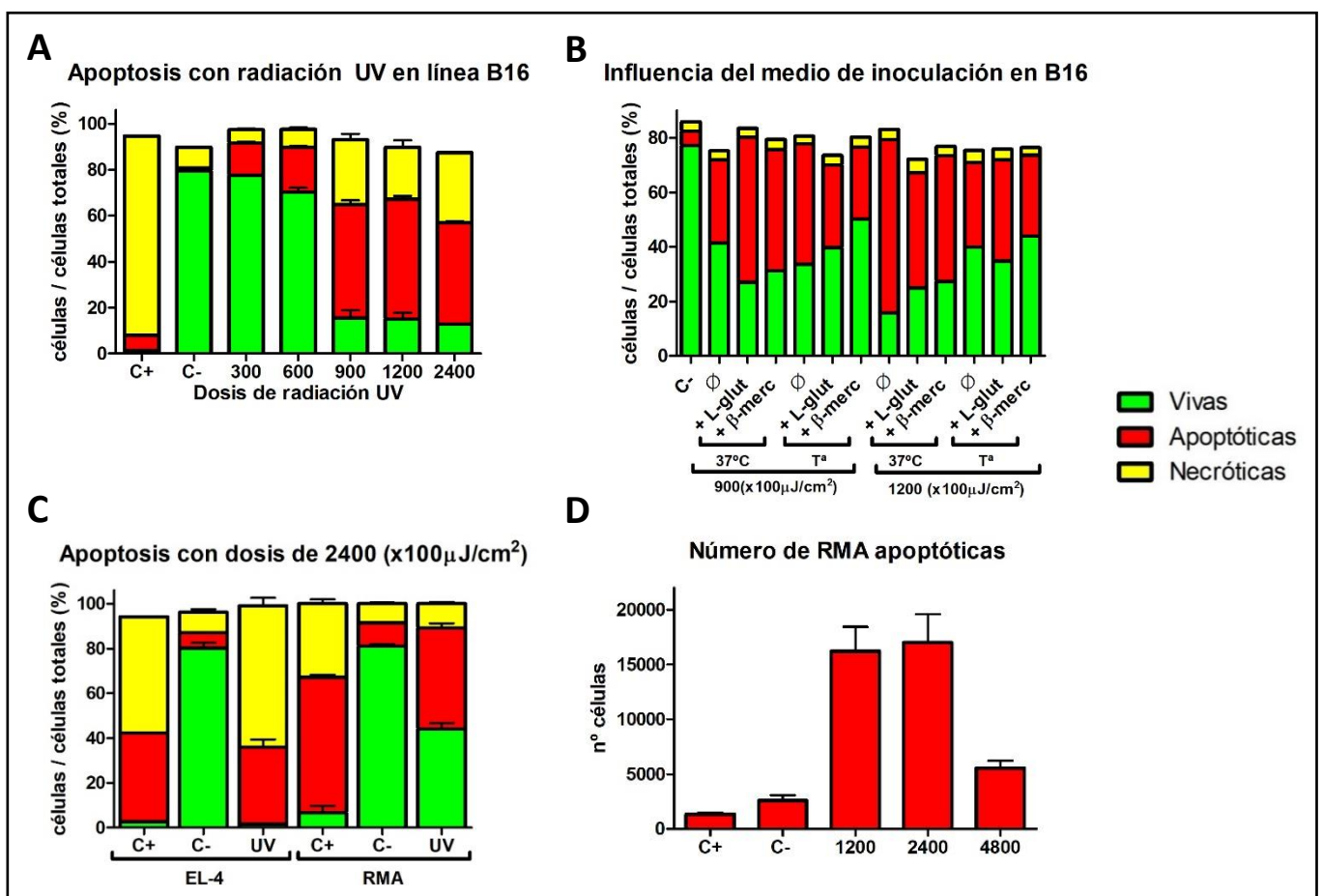


Figura 9: Análisis de la apoptosis inducida por irradiación UV. La línea B16-F10 se muestra los resultados dosis dependiente (entre 300 y 2400 ($\times 100\mu\text{J}/\text{cm}^2$)) (**A**). Se analizó la variación el efecto de la radiación UV como estimulo inductor de apoptosis en función de las condiciones en las que se mantienen las células posteriormente durante 2h. Se irradiaó con 900 y 1200 ($\times 100\mu\text{J}/\text{cm}^2$) y se incubó con medio RPMI 1640 sin suplementar (\emptyset) o el mismo con 1% de L-glutamina (+ L-glut) o 50 μM de 2- β -mercaptoetanol (+ β -merc), tanto a temperatura ambiente como a 37°C (**B**). Las líneas EL-4 y RMA se sometieron a una irradiación de 2400 ($\times 100\mu\text{J}/\text{cm}^2$) (**C**). Se representa el número total de células apoptóticas obtenidos al irradiar la línea RMA con dosis de 1200, 2400 y 4800 ($\times 100\mu\text{J}/\text{cm}^2$) (**D**). Los controles positivos (células necrotizadas) fueron concentrados un mínimo de 3 veces para poder obtener suficientes células para el análisis. Resultados con 2 o 3 réplicas, excepto del grafico **B** por limitaciones técnicas.

4.2. Modelo tumoral intraperitoneal

En este modelo, el crecimiento se mide de forma indirecta a través del peso del animal. Se ha utilizado la línea tumoral RMA. La inoculación del tumor se ha realizado por vía intraperitoneal con 10.000 células/animal. A día +3 post inoculación del tumor se ha administrado el tratamiento consistente de 100ng/animal de análogos y/o 500.000 células RMA apoptóticas intraperitonealmente³¹⁹. A partir de este día, han sido monitorizados con regularidad, y se ha interpolado el crecimiento del tumor tal (**Figura 10**).

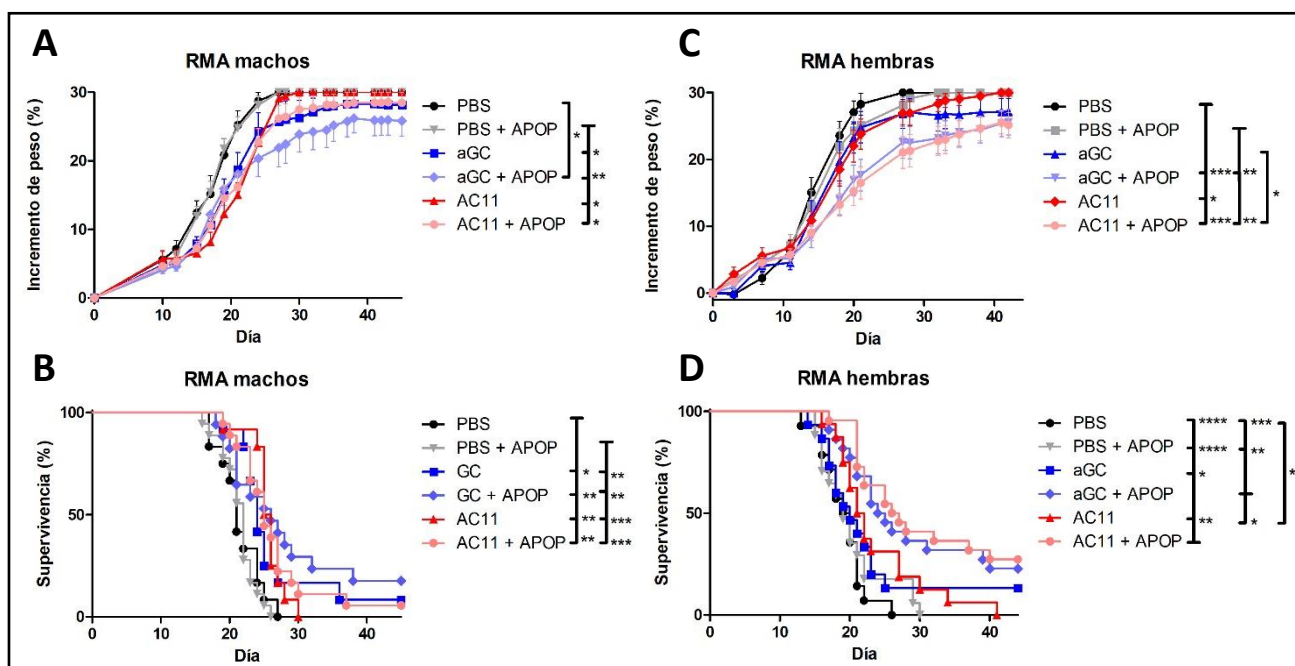


Figura 10: Evolución del modelo tumoral intraperitoneal RMA. En todos los gráficos se muestran los datos de los tratamientos simples (PBS, αGC y AC11), y combinados con células tumorales apoptóticas (PBS+APOP, αGC+APOP y AC11+APOP). Los datos del gráfico **A** indican el aumento de peso respecto a su peso inicial a día 0, con media ± SEM en machos. El gráfico **B** representa el porcentaje de machos que no han llegado al punto final cada día que se ha realizado el seguimiento. Los gráficos **C** y **D** son las mismas representaciones para las hembras. Resultados de tres experimentos independientes en machos y cuatro en hembras. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001. En **A** y **B**, N PBS, αGC y AC11=12; N PBS+APOP y AC11+APOP=18; N αGC+APOP=17. En **C** y **D**, N PBS=14; N αGC=15; N AC11=16; N PBS+APOP=17; N αGC+APOP y AC11+APOP=22.

En machos (**Figura 10 A, B**) el tratamiento con células apoptóticas no tiene ningún efecto respecto al grupo control o PBS. En el incremento de peso (**Figura 10 A**) se observa un efecto significativo de la αGC tanto ralentizando el crecimiento del tumor como aumentando la supervivencia, siendo el efecto mayor cuando este es combinado con células apoptóticas. Por su lado, el AC11 disminuye la velocidad de crecimiento del tumor, pero sin obtener diferencias significativas respecto a los controles, y consiguiendo un mejor efecto cuando se combina con células apoptóticas a partir del día 26. En cuanto a la supervivencia (**Figura 10 B**), tanto los tratamientos simples como los combinados con células tumorales apoptóticas han aumentado la supervivencia de los animales, llegando en el caso de los tratamientos combinados y la αGC a tener animales que han eliminado por completo el tumor.

En machos el tratamiento más efectivo es claramente la α GC+APOP, mientras que los demás cursan de una forma similar, diferenciándose únicamente por los animales que han sido capaces de eliminar el tumor, dando la separación observada en el gráfico. El porcentaje de animales que han sido capaces de eliminar el tumor con la α GC+APOP es del 33.3%, mientras que con los tratamientos α GC y AC11+APOP son del 12.5% y del 8.3% respectivamente. Los animales supervivientes fueron sometidos a una segunda inducción tumoral que todos los animales fueron capaces de eliminar eficazmente.

Estos resultados indican lo siguiente: el AC11 tiene un efecto antitumoral, aunque no tiene una mayor eficacia que la α GC; y que la combinación de los tratamientos con las células tumorales apoptóticas mejora la eficacia de ambos tratamientos, siendo el tratamiento con α GC+APOP el más efectivo. También podemos decir que se ha desarrollado una respuesta de memoria, ya que se ha eliminado el segundo tumor.

Este mismo protocolo se testó en hembras (**Figura 10 C, D**), con el objetivo de determinar si la actividad del AC11 se ve modificada en función del sexo. En primer lugar, el tratamiento únicamente con células apoptóticas tiene efecto gráficamente detectable (llegando a haber animales que eliminan el tumor, aunque estos son incapaces de eliminar un segundo tumor, por lo que no han desarrollado una memoria inmune y motivo por el cual no se les ha incluido en el análisis final). Probablemente el tratamiento con las células apoptóticas ha generado una pequeña inflamación, pudiendo favorecer este fenómeno la eliminación de la línea tumoral sin desarrollar una respuesta específica debido a que el lugar de inoculación y de crecimiento del tumor en este modelo son el mismo. En cuanto a los grupos con el tratamiento inmunoestimulador, se puede observar que en este caso el AC11 es al menos tan eficaz como la α GC, y cuando se combinan con las células tumorales ambos mejoran su eficiencia, siendo entonces el AC11 algo mejor que la α GC, aunque sin diferencias estadísticamente significativas.

Analizando la supervivencia (**Figura 10 D**), se observa que el AC11 por sí solo aumenta el tiempo que tardan los animales a llegar al criterio de punto final, mientras que la α GC prácticamente solapa con el grupo control salvo los animales con mayor supervivencia y los que consiguen eliminar el tumor, que si salen de la tendencia de los PBS. Al combinar nuestros análogos con las células apoptóticas se detecta un incremento de la supervivencia respecto a los tratamientos simples con ambos compuestos, llegando a tener animales supervivientes con ambos tratamientos. Además, AC11 parece tener un efecto más sostenido en el tiempo, permitiendo controlar el crecimiento del tumor. Como se ve en el gráfico, los animales con α GC que no eliminan el tumor llegan al punto final de media entre el día 20 y el 21 (20.84), en el caso de los tratados con AC11 llegan el día 28, siendo este el único grupo que ha tenido un tumor creciendo el cual ha controlado hasta el día 43. En el caso de los tratamientos combinados, también hay un aumento de la longevidad de los animales que llegan al punto final, pero al haber más supervivientes, la diferencia se ve reducida (α GC+APOP 25.65 días y AC11+APOP 26.43 días de media). Mirando únicamente los animales que han sobrevivido, α GC tiene una

supervivencia del 13.3%, α GC+APOP del 22.7% y AC11+APOP del 27.3%. Las hembras supervivientes al final de los experimentos fueron sometidas a una segunda inoculación de células tumorales o a una disección exhaustiva para realizar un análisis del sistema inmune de las mismas. De ambos análisis se ha podido deducir que los tratamientos estimuladores de las iNKT combinados con células tumorales apoptóticas son capaces de generar una respuesta antitumoral eficiente, pero los animales tratados únicamente con células apoptóticas (PBS+APOP) demostraron no ser capaces de eliminar un segundo tumor o al diseccionarlas se detectó que habían desarrollado un tumor fuera del peritoneo, pudiéndose deducir que la eliminación o control del tumor primario no fue debida al tratamiento. Por este motivo los animales PBS+APOP supervivientes fueron excluidos del análisis.

De estos resultados se extrae que AC11 es capaz de inducir una respuesta inmune antitumoral en ambos sexos, siendo sensiblemente más efectivo en hembras, mientras que la α GC tiene una efectividad similar en ambos. Además, ambos glicolípidos son capaces de generar una respuesta inmune específica, dado que cuando son combinados con células tumorales apoptóticas, la eficacia de los tratamientos aumenta significativamente. Por último, en hembras la α GC tiene un efecto binario, siendo este de eliminación total del tumor o la imposibilidad de ejercer control alguno, mientras que AC11 es capaz de inducir una respuesta que permite controlar en parte el crecimiento tumoral. Esta observación es relevante para la traslacionalidad a humanos, dado que de replicarse permitiría un mayor control del crecimiento de los tumores, eliminarlos con mayor facilidad o permitiría espaciar más los tratamientos al desarrollar una respuesta que limita el crecimiento de estos, mejorando en cualquier caso los tratamientos actuales.

Por último, otro dato relevante de estos ensayos es que tanto en machos como en hembras el tratamiento que tiene una mayor diferencia con la adición de las células tumorales apoptóticas es el AC11. Esto pone de manifiesto la inducción de una respuesta específica, mientras que la α GC muestra una diferencia de eficacia sensiblemente menor. Esto puede indicar que la respuesta antitumoral mostrada por la α GC es generada por una reacción inflamatoria generalizada en vez de por una respuesta antitumoral específica, o que la relevancia de esta respuesta inmune específica es sensiblemente menor en el caso de la α GC, correlacionando con las evidencias obtenidas con anterioridad en nuestro laboratorio¹.

4.3. Modelos tumorales subcutáneos

Con el objetivo de poder analizar la actividad de nuestro análogo fuera del peritoneo, hemos optado por los modelos tumorales subcutáneos, los cuales además permiten hacer un seguimiento directo del crecimiento del tumor, en lugar de inferirlo a través de una medida indirecta como es el caso de los modelos intraperitoneales. En todos los experimentos subcutáneos se trabajó con una dosis de 250ng/animal de compuestos y 500.000 células apoptóticas/animal o 500µg/animal de OVA, según corresponda. Todos los tratamientos han sido preparados tal y como se detalla en el apartado 3.4. El patrón de inoculación a los animales es el seguido en el modelo tumoral intraperitoneal, haciendo la inducción del tumor a día 0 e inoculando el tratamiento intraperitonealmente a día +3. El seguimiento de los tumores se realizó tal y como se explica en el apartado 3.5.

4.3.1. Modelo B16-F10

Al no disponer de un antígeno conocido contra el que desarrollar una respuesta inmune, en este modelo se ha realizado la aproximación de tratamiento con células apoptóticas (igual que en el modelo de tumor intraperitoneal) bajando la dosis de radiación ultravioleta dados los resultados expuestos en el apartado 4.1. Al ser el modelo más agresivo, a priori es más complicado observar un fenómeno de control del crecimiento tumoral tal y como se ha visto en los modelos intraperitoneales (**Figura 11**).

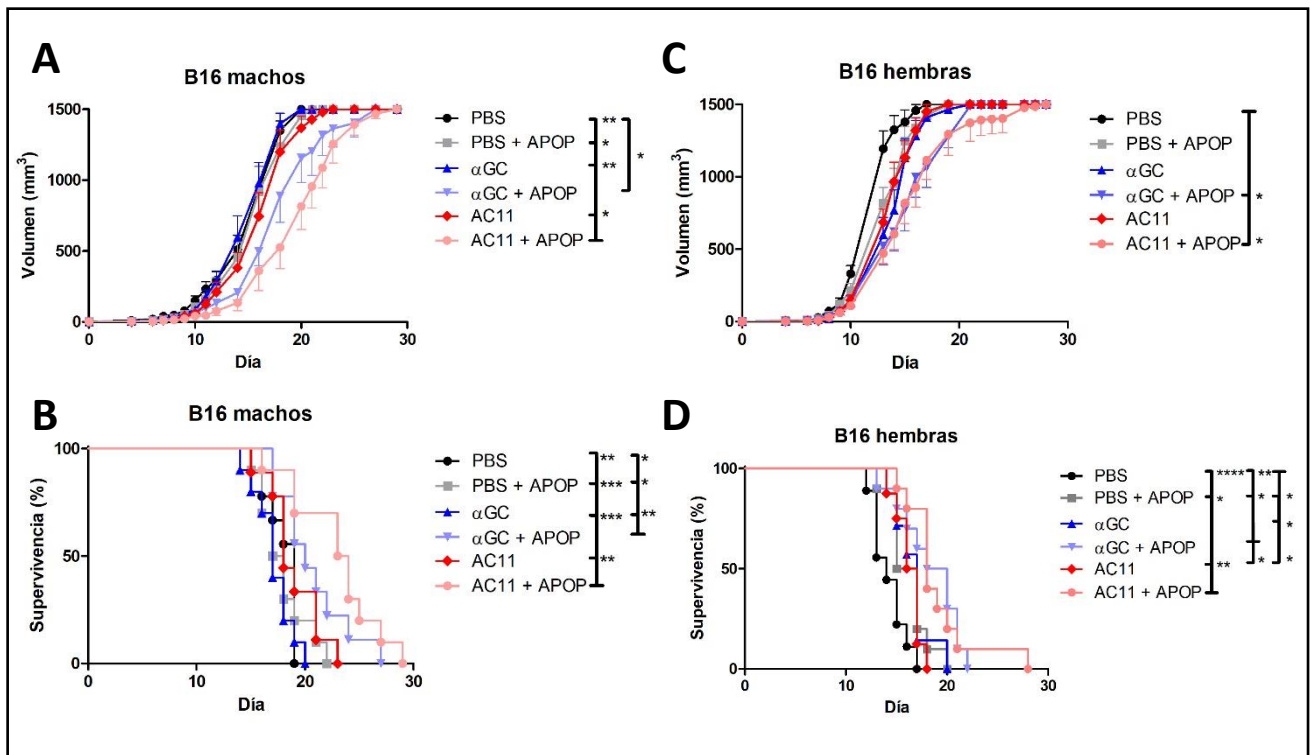


Figura 11: Evolución del modelo tumoral subcutáneo B16-F10. En todos gráficos se muestran los datos de los tratamientos simples (PBS, αGC y AC11), y los mismos combinados con células tumorales apoptóticas (PBS+APOP, αGC+APOP y AC11+APOP). Los datos del gráfico **A** muestran el volumen del tumor, con media ±SEM en machos. El gráfico **B** representa el porcentaje de machos que no han llegado al punto final cada día que se ha realizado el seguimiento. Los gráficos **C** y **D** son las mismas representaciones para hembras. Resultados de dos experimentos independientes por sexo. * p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001. En **A** y **B**, N PBS, αGC+APOP y AC11=9; N PBS+APOP, αGC y AC11+APOP=10. En **C** y **D**, N PBS=9; αGC=7; N AC11=8; N PBS+APOP, αGC+APOP y AC11+APOP=10.

En machos (**Figura 11 A, B**) el tratamiento únicamente con análogos no ha tenido ningún efecto. En cambio, al combinarlos con células tumorales apoptóticas han sido capaces de propiciar un control del crecimiento tumoral, generando una respuesta inmune específica. A pesar de ducha actividad, ningún animal ha sido capaz de eliminar por completo el tumor. Se observa que entre los días 16 y 23 el tratamiento con AC11+APOP consigue frenar las células tumorales, dando la separación en la curva de crecimiento de la **Figura 11 A** entre este y la αGC+APOP, pero posteriormente el tumor se descontrola y se juntan ambos tratamientos hasta llegar al punto final. Este efecto también se observa en la supervivencia de los animales (**Figura 11 B**), siendo la media con el tratamiento de αGC+APOP de 20 días, mientras que con el AC11+APOP sube a 24, y los demás tratamientos están alrededor de 18 días.

Estas observaciones postulan al AC11+APOP como el tratamiento más eficaz en este modelo, reforzando la hipótesis inferida de los resultados del modelo intraperitoneal y de los ensayos previos de nuestro laboratorio que la respuesta antitumoral generada por la αGC es causada principalmente por una activación de tipo principalmente inflamatoria e inespecífica, mientras que la actividad inmune propiciada por el AC11 es específica y dirigida hacia una respuesta citotóxica.

En hembras (**Figura 11 C, D**) vemos que los análogos por si solos y las células apoptóticas frenan ligeramente el crecimiento del tumor (**Figura 11 C**), pero los tratamientos combinados actúan de forma eficaz contra el

crecimiento del tumor, llegando a obtener diferencias significativas con los controles, pero no entre ellos. Analizando la supervivencia de los animales (**Figura 11 D**), vemos diferencias más notorias. Mientras que el grupo control tiene una supervivencia media de 13.5 días, los grupos con tratamientos sin combinar tienen una supervivencia media de alrededor de 16 días, y los tratamientos combinados sobreviven de media unos 19 días. Es importante destacar que, al igual que se ha observado con el modelo de tumor intraperitoneal, AC11 permite un control más duradero del tumor, mientras que la α GC tiene un efecto binario. En este caso se observa tanto en machos como en hembras, viéndose como en los animales con α GC+APOP hay un crecimiento tumoral muy agudo una vez empieza, mientras que los animales tratados con AC11+APOP son capaces de controlar el crecimiento del tumor incluso cuando ya tiene un tamaño relativamente elevado. El caso más claro es una hembra AC11+APOP, la cual teniendo un volumen tumoral de más de 1.000 mm³ fue capaz de controlar el tumor durante 4 días. En cambio, entre los animales tratados con α GC, ya sea con o sin células apoptóticas, no hay ninguno que haya sido capaz de controlar un tumor de estas dimensiones más de 2 días.

De estos resultados se extrae que AC11 genera una respuesta antitumoral específica como en los ensayos anteriores. En machos se observa una diferencia mayor entre la adición de antígenos tumorales y el tratamiento simple, hecho que puede deberse tanto a porque los tratamientos simples no han tenido ningún efecto en machos (mientras que si lo han tenido en hembras) como por el hecho de que el tumor B16-F10 en hembras ha cursado una enfermedad tan agresiva que enmascare dicho efecto. Por otro lado, este modelo, que desarrolla el tumor en un espacio diferente al de la inoculación, la α GC no ha conseguido tener un mayor rendimiento que el AC11 en ninguna de las aproximaciones probadas ni en machos ni en hembras, hecho que refuerza la hipótesis planteada en el apartado 4.2 que el efecto observado en el modelo intraperitoneal de la α GC en machos viene propiciado por una reacción inflamatoria local, la cual no deviene en el desarrollo de una mejor respuesta antitumoral. Esto no implica que la α GC no sea capaz de generar una respuesta antitumoral, si no que en los modelos intraperitoneales se debe tener en cuenta esta actividad la cual puede enmascarar el efecto antitumoral específico. Por otro lado, AC11 es más consistente con su actuación tanto a nivel de control del crecimiento tumoral como aumentando la supervivencia de los animales, y también es consistente con el efecto que tiene al combinarse con antígenos tumorales, tanto en el modelo RMA como en el B16-F10, denotando que el efecto antitumoral que se ha observado en ambos modelos es específico.

4.3.2. Modelo B16-F10-OVA

Se trabaja con una línea de melanoma teóricamente idéntica al usado en el apartado anterior expresando OVA ligada a GFP. En este modelo hemos combinado los tratamientos estimuladores de las iNKT con 500µg de OVA de pollo (**Figura 12**).

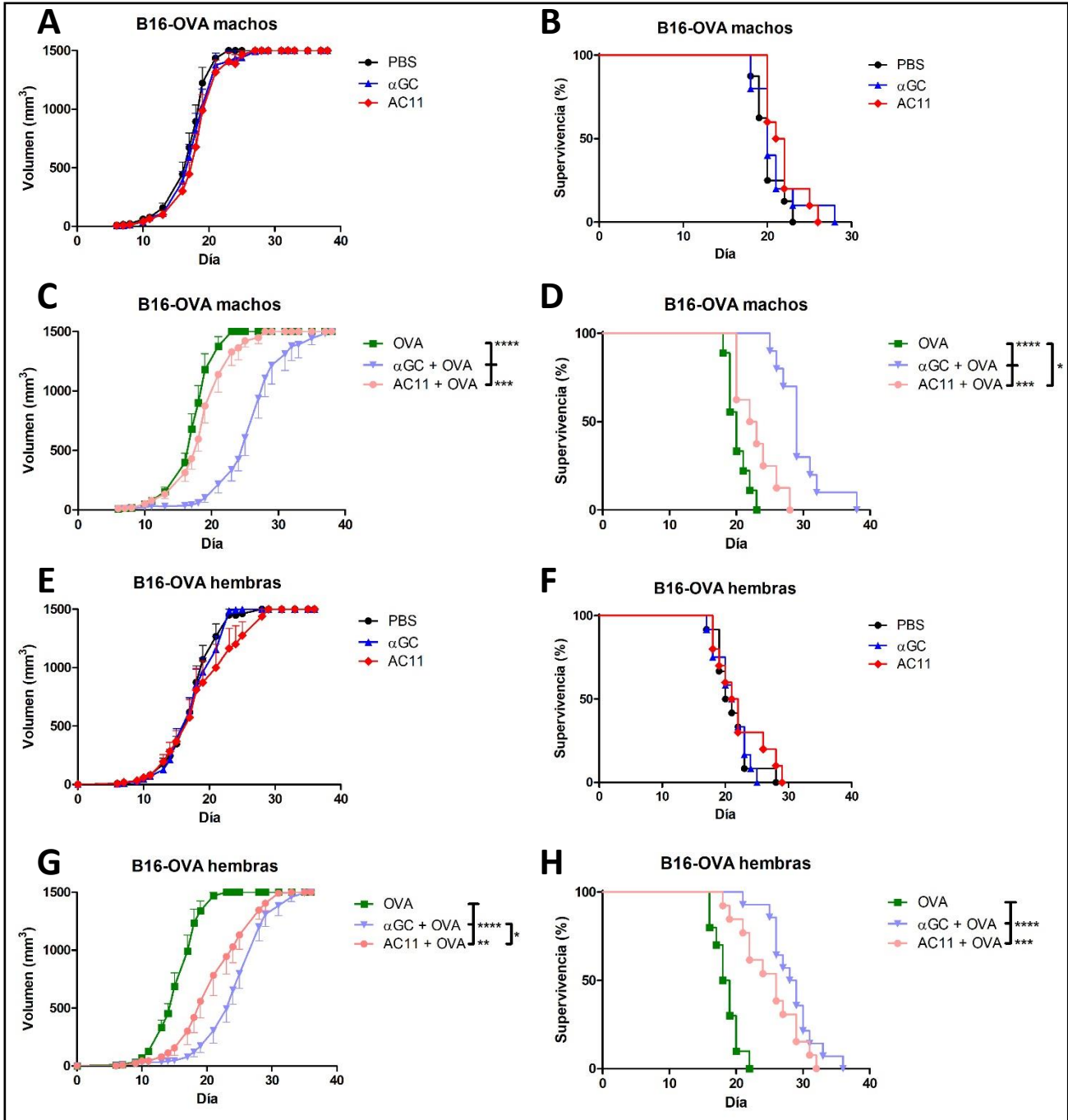


Figura 12: Evolución del modelo tumoral subcutáneo B16-F10-OVA. En los gráficos **A**, **B**, **E**, y **F** se muestran los datos de los tratamientos simples (PBS, αGC y AC11), mientras que en los gráficos **C**, **D**, **G** y **H** se muestra el resultado de los tratamientos combinados con OVA (OVA, αGC+OVA y AC11+OVA). Los datos de los gráficos **A** y **C** muestran el volumen del tumor, con media ±SEM en machos. Los gráficos **B** y **D** representan el porcentaje de machos que no han llegado al punto final cada día que se ha realizado el seguimiento. En hembras se ha representado los datos de la misma forma, siendo los gráficos **E** y **G** la representación del volumen tumoral ±SEM y **F** y **H** la supervivencia. Resultados de dos experimentos independientes en machos y tres en hembras. * p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001. En **A** y **B**, N PBS=8; N αGC y AC11=10. En **C** y **D**, N OVA=9; N αGC+OVA=10; N AC11+OVA=8. En **E** y **F**, N PBS y αGC=12; N AC11=10. En **G** y **H**, N OVA=10; N αGC+OVA=14; N AC11+OVA=13

En machos (**Figura 12 A-D**) los tratamientos sin combinar no tienen efecto alguno en el crecimiento del tumor (**Figura 12 A, B**). Al combinar los tratamientos inmunoestimuladores con OVA, solo la α GC es capaz de frenar el crecimiento tumoral (**Figura 12 C y D**), hecho que contrasta con las observaciones del anterior modelo, donde el tratamiento más efectivo era el AC11+APOP (**Figura 11 A y B**). A pesar de este desplazamiento de la curva hacia la derecha, el comportamiento de la α GC parece ser inespecífico, dado que solo retrasa el inicio del crecimiento tumoral 8-10 días, pero una vez este inicia, cursa una enfermedad de cinética similar a los animales control (**Figura 12 C**).

Focalizándonos en la supervivencia (**Figura 12 B y D**), los PBS y los OVA tienen una supervivencia media idéntica (20 días), valor que el tratamiento con los análogos ha aumentado ligeramente (entre 1-1.5 días) (**Figura 12 B**), a pesar de no modificar la curva de crecimiento del tumor. Por otro lado, los análogos combinados con OVA han logrado aumentar la supervivencia significativamente, siendo en el caso del AC11+OVA una supervivencia media de 26.7 días, y en el caso de la α GC+OVA de 29.6 (**Figura 12 D**). En el caso de la α GC+OVA se observa un animal que tuvo una supervivencia sensiblemente mayor, y aunque sobrevivió 38 días, hasta el día 23 post inoculación del tumor no se le pudo detectar el mismo, de lo que se infiere que en 15 días pasó de no tener ningún tumor detectable a llegar al punto final.

En hembras (**Figura 12 E-H**), se observa que el tratamiento con AC11 es capaz de controlar ligeramente el crecimiento tumoral a partir de los 600mm³, separándose así de la tendencia de los demás tratamientos simples (**Figura 12 E**). En cuanto a los tratamientos con ambos compuestos combinados con antígenos tumorales (**Figura 12 G, H**) son efectivos retrasando la detección del tumor. Una vez se detecta, siguen la misma tendencia que la observada en los tratamientos simples, siguiendo la α GC+OVA una curva de crecimiento similar al control desplazada hacia la derecha, mientras que el AC11+OVA controla el crecimiento del tumor, haciendo que a pesar de que los tumores se detecten antes que, con el tratamiento clásico, al llegar a volúmenes altos ambas curvas converjan.

En la supervivencia (**Figura 12 F, H**), se observan las mismas tendencias observadas en la evolución del volumen del tumor en los animales tratados únicamente con los tratamientos inmunoestimuladores (**Figura 12 F**). Por su lado, en la supervivencia de los tratamientos combinados con antígenos tumorales (**Figura 12 H**) el AC11+OVA ha cursado de forma similar al AC11 y por último la α GC+OVA aumenta la supervivencia de los animales, llegando todos al punto final de forma súbita y en un lapso muy corto, en lugar de las muertes escalonadas observadas con el AC11+OVA.

Poniendo todos los datos en conjunto, de este modelo se puede extraer la α GC y su combinación con OVA tienen prácticamente el mismo efecto ambos sexos, siendo el efecto del tratamiento simple prácticamente nulo y el combinado es capaz de frenar el crecimiento tumoral inicial, pero una vez este empieza a crecer lo hace de forma incontrolada de forma similar a los controles. Por el contrario, el AC11 en hembras controla el

tumor cuando este ya ha mostrado cierto crecimiento, y su combinación con OVA mejora su eficacia en hembras, frenando el crecimiento inicial del tumor, pero sin cambiar la dinámica observada con el tratamiento únicamente del análogo, mientras que en machos no ha tenido efectos relevantes. Estos resultados apuntan hacia la misma dirección que los obtenidos con los otros modelos, en los que se podía inferir que la α GC da una respuesta inespecífica y que solo permite un control inicial del tumor, si este se descontrola la α GC no tiene ningún efecto; mientras que el AC11 tiene una respuesta más consistente, específica y no tan dependiente de una respuesta inflamatoria, lo cual permite mantener bajo control ligeramente el tumor en fase de crecimiento. También la diferencia entre el efecto del AC11 en machos y en hembras pone de manifiesto la diferencia un dimorfismo sexual de este tratamiento.

4.3.3. Modelo B16-F10-OVA con células tumorales apoptóticas

Debido a los resultados observados en los apartados 4.3.1 y 4.3.2 se puede inferir que el origen de los antígenos contra los que desarrollar una respuesta tumoral puede ser relevante, visto que la combinación de nuestros tratamientos con las diversas fuentes de antígenos resultan en tratamientos de distinta eficacia, motivo por el que se testó la aproximación de vacunación con células tumorales apoptóticas en el modelo B16-F10-OVA (**Figura 13**). Se eligió la misma dosis de radiación ultravioleta para inducir apoptosis determinada con la línea B16-F10 a pesar de que esta no pudo ser testada debido a que tiene la expresión de OVA ligada a GFP, proteína que emite en la misma longitud de onda que la Annexin V.

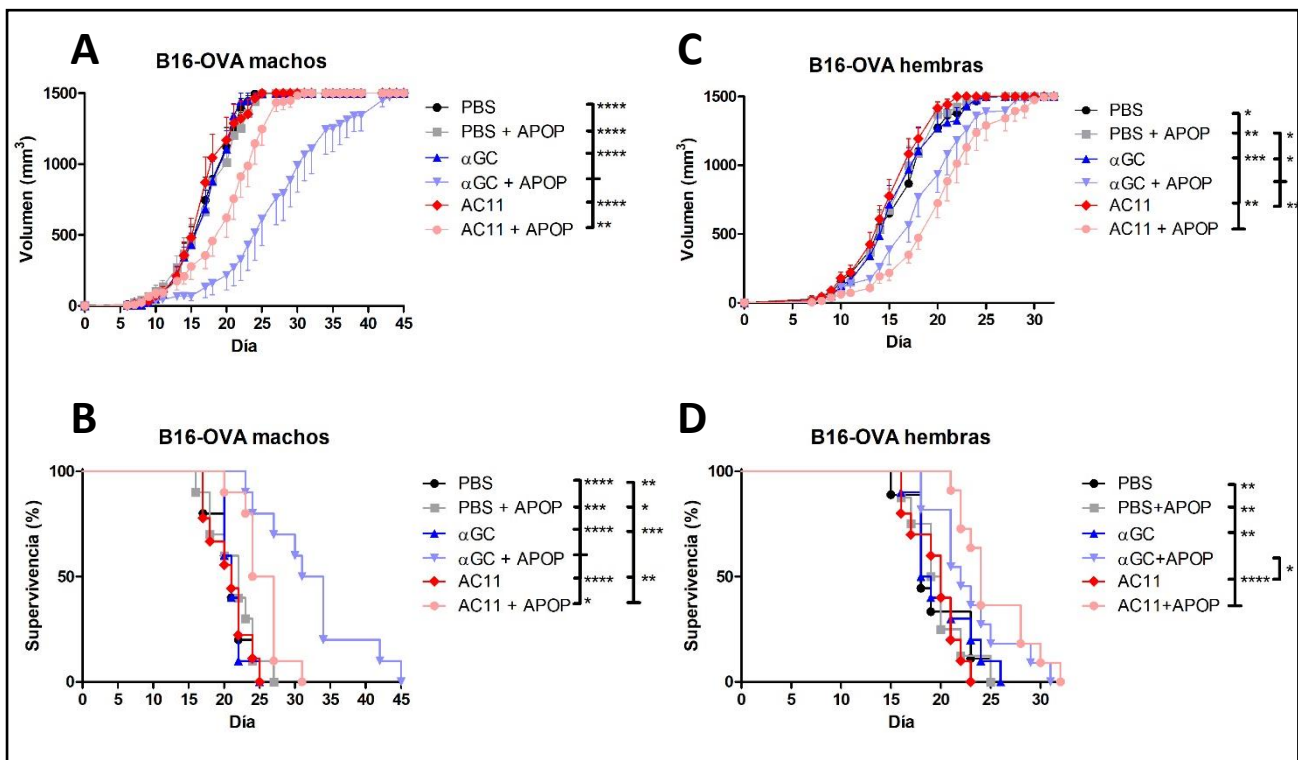


Figura 13: Evolución del modelo tumoral subcutáneo B16-F10-OVA tratado con células apoptóticas: En todos gráficos se muestran los datos de los tratamientos simples (PBS, α GC y AC11), y los mismos combinados con células tumorales apoptóticas (PBS+APOP, α GC+APOP y AC11+APOP). Los datos del gráfico **A** muestran el volumen del tumor, con media \pm SEM en machos. El gráfico **B** representa el porcentaje de machos que no han llegado al punto final cada día que se ha realizado el seguimiento. Los gráficos **C** y **D** son las mismas representaciones para hembras. Resultados de dos experimentos independientes por sexo. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. En **A** y **B**, N PBS, PBS+APOP, α GC, α GC+APOP y AC11+APOP=10; N AC11=9. En **C** y **D**, N PBS y PBS+APOP=9; N α GC, y AC11=10; N α GC+APOP y AC11+APOP=11.

Observando los datos de machos (**Figura 13 A, B**) los únicos tratamientos efectivos han sido los tratamientos combinados, mientras que los análogos por si solos han cursado una enfermedad similar a los controles, siendo estos resultados a grandes rasgos de la misma línea que los dos modelos de melanoma previamente comentados. En cuanto al crecimiento tumoral (**Figura 13 A**), el AC11+OVA es capaz de frenar ligeramente el crecimiento del tumor, efecto no apreciable en el gráfico. Esto se infiere de la evidencia que los animales con este tratamiento llegaron al punto final tras varios días con tumores de un tamaño relativamente alto ($>700\text{mm}^3$). En cambio, la α GC+APOP es capaz de frenar el crecimiento inicial del tumor de forma mucho más efectiva, pero una vez inicia el crecimiento, lo hace de forma similar a los controles. Este efecto no se visualiza correctamente en el gráfico debido a un solo animal que por algún motivo tuvo un tumor que creció notablemente más lento que los demás de su grupo, no es la tendencia general del tratamiento.

En el análisis de la supervivencia (**Figura 13 B**), se observa una tendencia similar, siendo parecida entre los tratamientos simples con una supervivencia media de alrededor de 21 días, mientras que los tratamientos combinados aumentan la supervivencia media hasta 25.5 días en el caso del AC11+APOP y 32.5 días en el caso de la α GC+APOP. En este experimento las muertes con α GC combinado con antígenos son mucho más

escalonadas que en los modelos anteriores, pero un análisis más exhaustivo de los datos ha revelado que los animales han perdido el control del tumor en dos rangos de días, del 25 al 32, y del 34 en adelante. Pero, en cuanto pierden el control, salvo el animal anteriormente mencionado todos llegan al punto final relativamente rápido (3-5 días). Los animales tratados con AC11+APOP han llegado al punto final de forma muy agrupada, hecho que dificulta la visualización del efecto de control del crecimiento tumoral anteriormente comentado.

Los resultados observados en hembras (**Figura 13 C, D**) revelan que ningún tratamiento simple ha tenido efectos significativos, pero ambos tratamientos combinados han tenido un efecto relevante, dando diferencias visibles, pero no estadísticamente significativas. En el volumen tumoral (**Figura 13 C**), se observa que tanto la α GC+APOP como el AC11+APOP son capaces de frenar el crecimiento del tumor inicialmente, pero mientras que el efecto de la α GC+OVA es sencillamente posponer el inicio del crecimiento exponencial del tumor, pero una vez este empieza el tratamiento deja de ser eficaz, el AC11+APOP tiene un efecto en el crecimiento inicial del tumor y en volúmenes elevados controla ligeramente el crecimiento del tumor, diferencia difícilmente visualizable debido a su cercanía a valores máximos graficados.

Analizando la supervivencia en hembras (**Figura 13 D**), los tratamientos simples no tienen ninguna diferencia destacable ni entre ellos ni con el grupo control, situándose todos entre los 18 y los 20 días de supervivencia. El tratamiento con α GC+APOP alarga ligeramente la supervivencia media, hasta los 22 días, pero no hay ningún cambio en la forma en la que llegan al volumen máximo. En cambio, el tratamiento con AC11+APOP, además de alargar la supervivencia media hasta los 24 días, se puede discernir que llegan al final en dos bloques. Los primeros en llegar al límite del experimento son aquellos que al rebasar los 800mm³ no han sido capaces de controlar el crecimiento del tumor y han pasado el volumen máximo como los demás tratamientos. En cambio, el segundo bloque, que llegan al punto final pasado el día 28, son aquellos que han controlado un tumor de volumen considerable, motivo por el cual se observa ese lapso relativamente largo sin animales llegando al punto final.

Con todo lo comentado, de este modelo podemos inferir que solo los tratamientos combinados han sido capaces de generar una respuesta antitumoral. En el caso de los machos, ambos compuestos han tenido una respuesta cualitativamente similar, frenando el tumor en estadios iniciales, pero siendo poco eficientes en cuanto el tumor muestra un crecimiento exponencial. A nivel cuantitativo, el mejor tratamiento con diferencia ha sido la α GC+APOP. En el caso de las hembras, a nivel cualitativo vemos un efecto similar con ambos compuestos al combinarlos con células tumorales apoptóticas, aunque el AC11+APOP permite un mejor control del tumor en volúmenes altos. Estadísticamente no hay diferencias significativas entre α GC+APOP y AC11+APOP, pero gráficamente se observa que el AC11+APOP es ligeramente mejor. En el caso de poder dejar crecer el tumor hasta un volumen mayor, probablemente se observaría una mayor diferencia entre los análogos, por la conducta que tienen ambos a los volúmenes máximos con los que trabajamos, pero no se

puede realizar dicha aproximación por motivos éticos, ya que estos tumores dan problemas de ulceraciones y hemorragias con volúmenes superiores a 1.000 mm³.

Combinando los datos de esta aproximación con los de los experimentos descritos en el apartado 4.3.2, es posible determinar si la fuente de los antígenos es capaz de modificar la respuesta inmune generada tanto con el AC11 como con la α GC, separando los resultados por sexos (ya que como hemos visto reiteradamente en los experimentos, hay un ostensible dimorfismo sexual) (**Figura 14**).

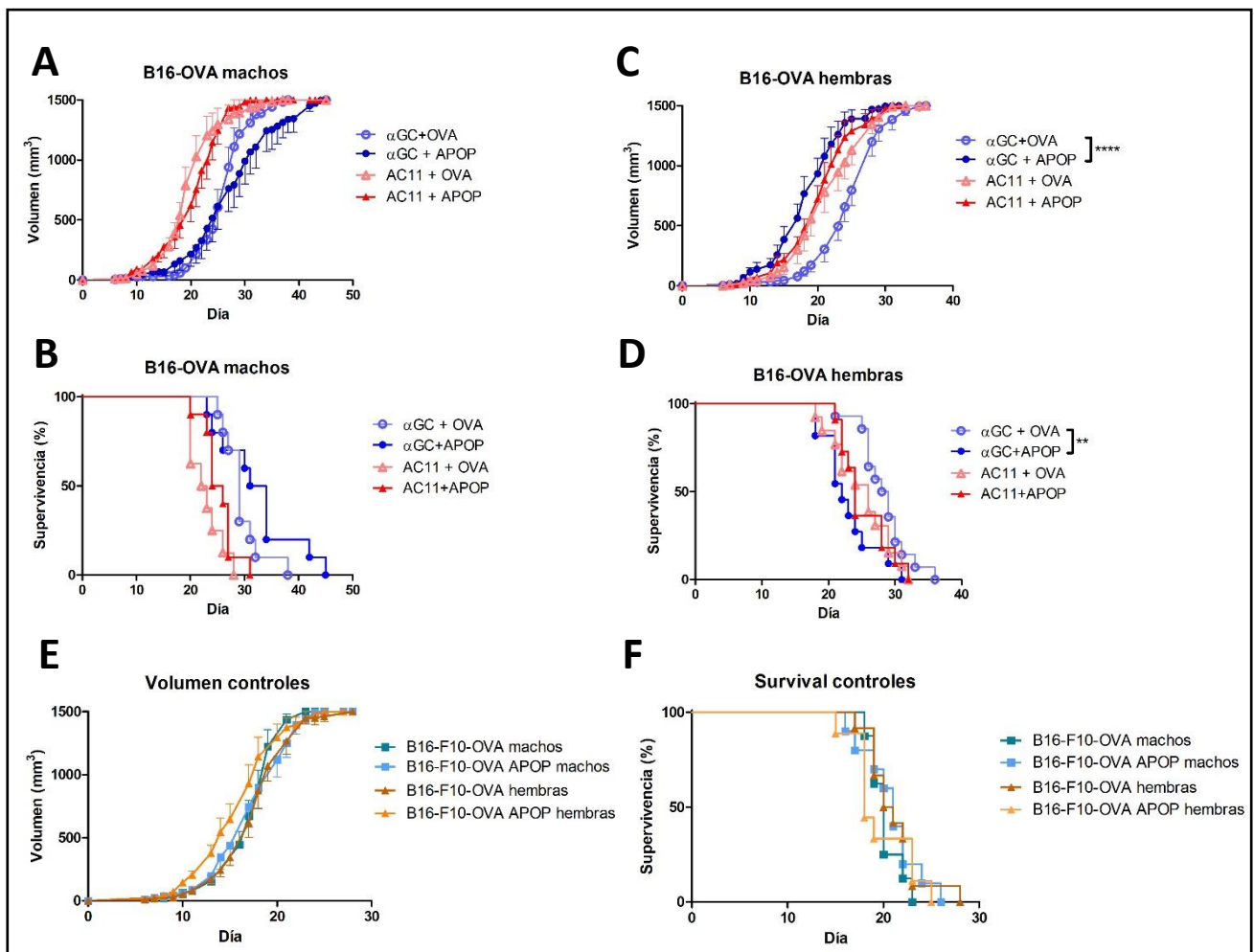


Figura 14: Comparativa entre los tratamientos combinados con células apoptóticas o con OVA en ambos sexos. En este gráfico se muestran los resultados de los tratamientos con los dos métodos para combinarlos con antígenos tumorales tanto en machos como en hembras. Los datos del gráfico **A** muestran el volumen del tumor, con media \pm SEM en machos. El gráfico **B** representa el porcentaje de machos que no han llegado al punto final cada día que se ha realizado el seguimiento. Los gráficos **C** y **D** son las mismas representaciones para hembras, y los **E** y **F** con los grupos PBS de cada modelo. Resultados de tres experimentos independientes con el modelo B16-F10-OVA en hembras y dos experimentos distintos en el resto de modelos. ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$. En **A** y **B**, N α GC+OVA, α GC+APOP y AC11+APOP=10; AC11+OVA=8. En **C** y **D**, α GC+OVA=14; AC11+OVA=13; y α GC+APOP y AC11+APOP=11. En **E** y **F**, N B16-F10-OVA machos=8; B16-F10-OVA APOP machos=10; N B16-F10-OVA hembras=12; N B16-F10-OVA APOP hembras=10. Solo se muestran las diferencias estadísticas relevantes.

Empezando con el análisis de machos (**Figura 14 A, B**), no hay diferencias significativas entre las formas de administrar antígenos tumorales con el tratamiento AC11. Con α GC, el OVA da una peor respuesta antitumoral, tanto en la evolución del volumen del tumor (**Figura 14 A**) como en la supervivencia (**Figura 14 B**), pero sin obtener diferencias significativas en ninguno de los casos. En cambio, en hembras (**Figura 14 C, D**),

el AC11 da una respuesta relativamente estable con ambas aproximaciones, pero la respuesta observada con la α GC es muy diferente entre las aproximaciones. En la evolución del tumor (**Figura 14 C**), con α GC los tumores empiezan a crecer sensiblemente antes con las células apoptóticas que con OVA y pasada la detección no hay diferencias reseñables en cuanto a la cinética de crecimiento, pero si miramos la supervivencia (**Figura 14 D**), se puede discernir que con el tratamiento con células apoptóticas hay unas muertes más escalonadas, en contraposición al tratamiento con OVA, en el cual el momento de punto final está bastante agrupado, aunque la supervivencia en sí es mayor.

De estos resultados se extrae que la respuesta antitumoral inducida por AC11 no varía según el antígeno con el que se combine, mientras que en el caso de la α GC sí que se afecta su resultado por la forma de proveer los antígenos tumorales, especialmente en hembras. Una posible explicación de este efecto puede ser la especificidad de la respuesta inducida. Mientras que AC11 induce una respuesta de tipo Th1 estable, motivo por el cual el tratamiento se ve poco afectado por la forma en la que se administran los antígenos tumorales; la α GC genera una respuesta muy inespecífica, lo cual puede implicar una susceptibilidad mayor a la forma de proveer los antígenos. Este efecto se ve más acentuado en hembras probablemente porque la respuesta de tipo Th1 mediada por iNKT en ratones C57 BL6/J es altamente dependiente de estrógenos, los cuales están prácticamente ausentes en los machos de esta cepa¹⁷. Estos motivos pueden ser una posible explicación de la diferencia observada entre las diversas formas de administrar los antígenos con la α GC en hembras.

La falta de diferencia entre las aproximaciones para proveer los antígenos al sistema inmune que se observan con el AC11 pone de manifiesto su eficiencia en generar una respuesta antitumoral, y el hecho de que sea eficaz incluso en machos demuestra que la respuesta Th1 que genera, a parte de estar mediada por IFN γ tiene otras vías alternativas de activación, probablemente a través de células del compartimento mieloide. Para garantizar que los efectos observados son debidos a los tratamientos, se ha analizado la evolución de los controles (PBS) entre el modelo B16-F10-OVA y el B16-F10-OVA-APOP, y no se ha encontrado ninguna diferencia (**Figura 14 E, F**).

4.3.4. Modelo EL-4

Dados los resultados obtenidos en el modelo de linfoma intraperitoneal (RMA) y en modelos de melanoma subcutáneos (B16-F10, B16-F10-OVA), se testó nuestros análogos en un modelo de linfoma subcutáneo. La línea tumoral seleccionada para realizar el ensayo fue la EL-4, una línea de linfoma que tiene tendencia a crecer adherida (al contrario de la RMA, que crece principalmente en suspensión), por lo que es idónea para realizar este tipo de ensayos. A pesar de esta diferencia de comportamiento, estas dos líneas tumorales tienen un patrón de expresión similar de moléculas relacionadas con las NK (como NKRP1C, NKRP1A), CD16-32, Thy-1, CD5, CD45, CD45R, etc. Además, ambas tienen el mismo reordenamiento de la cadena beta del TCR²²⁸, por lo que se puede afirmar que son dos líneas de linfoma que proceden de un origen común³²⁰. La inducción del

tumor en este modelo se realizó con 250.000 células por animal, y la dosis de radiación utilizada fue de 2400 ($\times 100 \mu\text{J}/\text{cm}^2$). Los experimentos se realizaron únicamente con machos por falta de disponibilidad de animales (Figura 15).

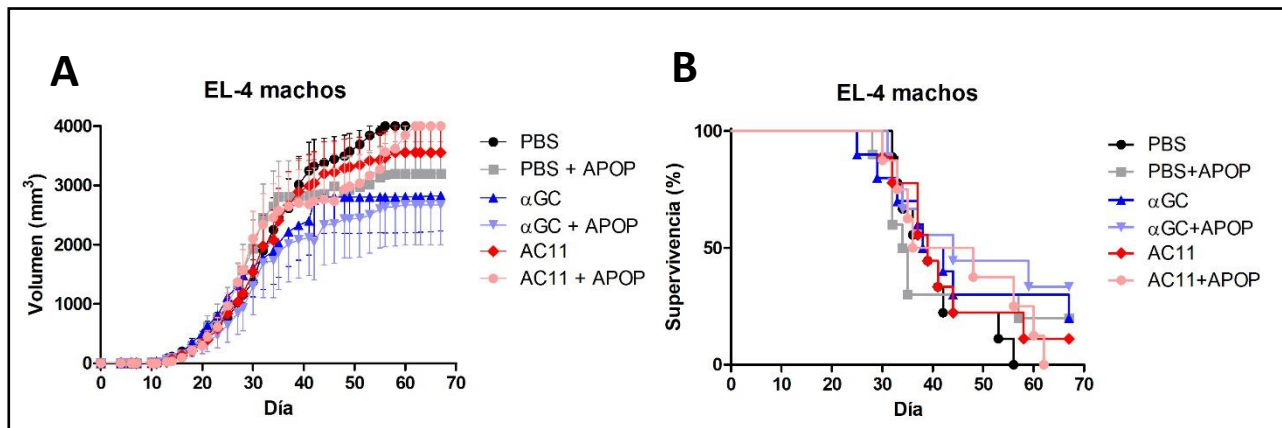


Figura 15: Evolución del modelo tumoral subcutáneo EL-4. En todos gráficos se muestran los datos de los tratamientos simples (PBS, αGC y AC11), y los mismos combinados con células tumorales apoptóticas (PBS+APOP, αGC+APOP y AC11+APOP). Los datos del gráfico A muestran el volumen del tumor, con media \pm SEM. El gráfico B representa el porcentaje de machos que no han llegado al punto final cada día que se ha realizado el seguimiento. Resultados de dos experimentos independientes. N en PBS, αGC+APOP y AC11=9; N PBS+APOP y αGC=10; N AC11+APOP=8. Solo se muestra los datos de animales supervivientes que han sido capaces de controlar una segunda inducción de la enfermedad.

Observando la evolución del volumen del tumor (Figura 15 A), todos los tratamientos sin células apoptóticas cursan una curva de crecimiento similar, separándose únicamente por la supervivencia de los animales. En cambio, los tratamientos combinados con células apoptóticas son capaces de modificar la curva de crecimiento tumoral, alrededor de los 2.500 mm³ en el caso del AC11+APOP y alrededor de los 3.000 mm³ en el caso de la αGC+APOP. En el caso del PBS+APOP se observa un fenómeno similar, pero es un artefacto generado por un animal al cual le empezó a crecer el tumor al día 35, aunque pasado ese día siguió una cinética de crecimiento similar a los controles. En cuanto a la supervivencia (Figura 15 B), la αGC muestra una caída aguda al pasar el día 37. Comentar que el último animal muerto de este grupo se halló muerto con un tumor relativamente pequeño días después de que se cortara el seguimiento de los tumores, pero debido a que llevaba un tiempo considerable con un tumor detectable, no se consideró justificable excluirlo y se le asignó como punto final el último día del experimento. Por contra, tanto los PBS como con los animales tratados con AC11 vemos una dinámica similar de muertes entre los días 30 y 45, salvo excepciones que retuvieron ligeramente el crecimiento tumoral hasta el día 56 y 58 respectivamente. En cuanto al tratamiento con células apoptóticas, vemos que los PBS+APOP llegan al punto final entre los días 28 y 35, con excepción de dos animales, uno que llegó al día 58 y otro que sobrevivió al experimento y a un segundo trasplante tumoral. La αGC+APOP tiene una supervivencia similar, aunque algo más espaciada en el tiempo, ya que el lapso en el que se concentran las muertes es entre el día 32 y el 44, pero en cuanto a dinámica se observa el mismo patrón, concentración de la mayor parte de las muertes en un lapso definido, un animal que sobrevive sensiblemente más que los demás y uno que sobrevive a la enfermedad. El AC11+APOP es el grupo que más destaca, en el

cual la mitad de los animales mueren entre los días 30 y 37, pero el resto sobreviven hasta al menos el día 48, momento en el cual empiezan a llegar al punto final de forma escalonada.

De estos resultados se extrae que el AC11+APOP es el único tratamiento que controla el crecimiento tumoral, aunque solo de forma temporal. En cuanto a los demás tratamientos, la α GC+APOP y el PBS+APOP tienen un animal respectivamente que eliminó el tumor y fue capaz de sobrevivir a una segunda implantación tumoral, pero una vez más el resultado que se observa es binario, no son capaces de generar una respuesta que permita controlar el crecimiento tumoral de forma sostenida. El AC11 por sí solo parece tener un efecto nulo, lo cual coincide con lo visto en los demás modelos utilizados en machos. En general, esta tendencia del AC11 combinado con antígenos de ser capaz de controlar el tumor a volúmenes altos mientras que la α GC solo es capaz de eliminar el tumor o no tiene ningún control sobre el mismo se repite en las observaciones de los demás modelos realizados, lo cual da robustez a los resultados obtenidos.

4.3.5. Modelo EG-7

Otra aproximación que se decidió utilizar para poder verificar la actividad de nuestros compuestos se basó en el uso de un modelo de timoma subcutáneo con un antígeno conocido, similar al modelo B16-F10-OVA. En este caso usamos la línea tumoral EG-7, una línea derivada de la EL-4 transfectada con el plásmido pAc-neo-OVA, el cual lleva una copia del gen de la ovoalbúmina. Con el objeto de realizar la inmunización, nuestros compuestos se han administrado con 500 μ g de OVA. La inducción de la enfermedad se realizó en el caso de las hembras con 1.000.000 células de la línea cedida por el Dr. Ignacio Melero, y en el caso de los machos se realizó con 500.000 células de la línea cedida por el Dr. Francisco Lozano (**Figura 16**). Esta variación se realizó porque hubo un lapso muy grande entre la realización de los experimentos de machos y de hembras, se detectó que la línea cedida por el Dr. Ignacio Melero se derivó imposibilitando su uso, motivo por el cual se usó la línea cedida por el Dr. Francisco Lozano adaptando el número de células a los protocolos utilizados en su laboratorio.

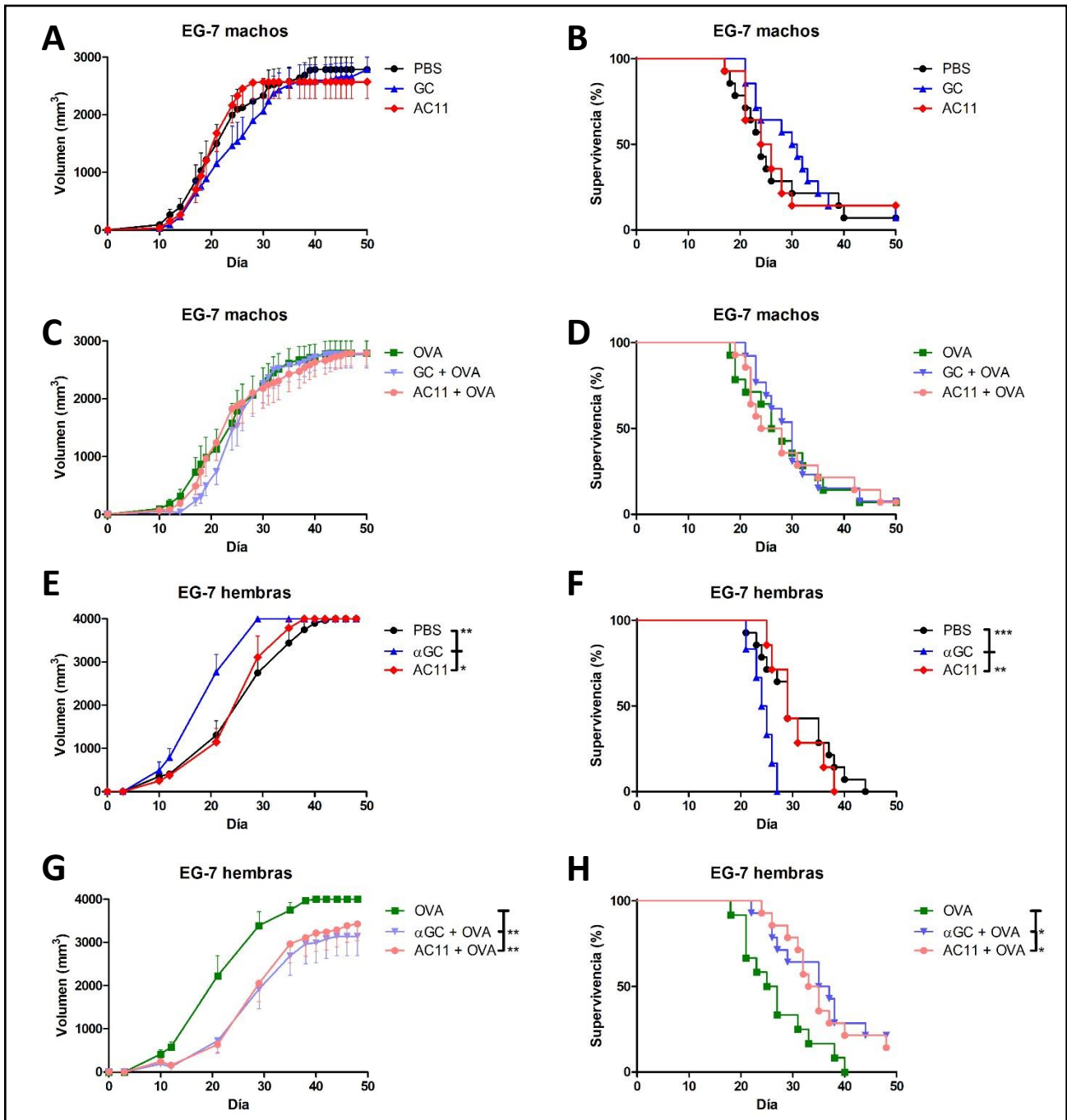


Figura 16: Evolución del modelo tumoral subcutáneo EG-7. En los gráficos **A**, **B**, **E** y **F** se muestran los datos de los tratamientos simples (PBS, α GC y AC11), mientras que en los gráficos **C**, **D**, **G** y **H** se muestra el resultado de los tratamientos combinados con OVA (OVA, α GC+OVA y AC11+OVA). Los datos de los gráficos **A** y **C** muestran el volumen del tumor, con media \pm SEM en machos. Los gráficos **B** y **D** representan el porcentaje de machos que no han llegado al punto final cada día que se ha realizado el seguimiento. En hembras se ha representado los datos de la misma forma, siendo los gráficos **E** y **G** la representación del volumen tumoral \pm SEM y **F** y **H** la supervivencia. Resultados de tres experimentos independientes en machos y dos en hembras. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. En **A** y **B**, N PBS=14; N α GC y AC11=14. En **C** y **D**, N OVA y AC11+OVA=14; N α GC+OVA=13. En **E** y **F**, N PBS=14; N α GC=6; N AC11=7. En **G** y **H**, N OVA=12; N α GC+OVA y AC11+OVA=14.

En el caso de los machos (**Figura 16 A-D**) prácticamente no hay efecto alguno ni en el volumen tumoral (**Figura 16 A y C**) ni en la supervivencia de los animales (**Figura 16 B y D**). No se observa ninguna tendencia clara, aunque aparentemente, como se ha visto en varios modelos, a volúmenes altos (por encima de 2.000mm^3) se detecta que todos los tratamientos siguen una tendencia similar excepto el AC11+OVA (**Figura 16 C**), el cual aplana ligeramente su curva de crecimiento. Esto correlaciona con el resto de modelos utilizados, aunque no hay ningún dato que nos permita afirmar que este efecto es real.

En cuanto a las hembras, los tratamientos simples (**Figura 16 E, F**) el PBS y el AC11 cursan una enfermedad similar, mientras que el αGC empeora el curso de la enfermedad, tanto en volumen (**Figura 16 E**) como en la supervivencia (**Figura 16 F**). Esto puede deberse a un agotamiento de los linfocitos que dificulte el desarrollo de una respuesta eficaz, tal y como ha sido reportado en la bibliografía²⁶⁴. El hecho que el tumor se implante en lugar distinto a la zona de inoculación (a diferencia del RMA) y más agresivo que los otros tumores subcutáneos utilizados (B16-F10 y B16-F10-OVA) puede que favorezca la visualización de este efecto. Los tratamientos combinados con antígenos tumorales (**Figura 16 G, H**), mejoran el curso de la enfermedad respecto al grupo control, sin diferencias significativas entre ellos. Esto es indicativo que ambos generan una respuesta dirigida contra las células tumorales de forma eficaz, finalizando los experimentos con uno o más animales supervivientes (**Figura 16 H**).

En este modelo se hace patente el dimorfismo sexual de la actividad de las iNKT, teniendo un efecto muy bajo o nulo en machos, pero siendo muy efectivas en hembras. También se infiere que dependiendo del tipo de tumor o la línea tumoral son más o menos sensibles a nuestros tratamientos inmunoestimuladores. Hay que recalcar que el tratamiento con αGC no solo no mejora la progresión de la enfermedad, por el contrario, puede incluso llegar a empeorar el curso de esta, efecto que puede deberse a una respuesta inmune poco eficiente o a un agotamiento del sistema inmune. Por el contrario, el AC11 en ningún momento supone un empeoramiento del curso de la enfermedad, lo cual indica que nuestro análogo es más seguro que el agonista prototípico.

4.4. Modelos de metástasis pulmonares

Este modelo tumoral ha sido realizado con las líneas de melanoma B16-F10 y B16-F10-OVA. Aunque no se puede monitorizar la evolución de la enfermedad de forma directa o indirecta durante su curso, es un modelo ampliamente usado por mimetizar un proceso patológico de metástasis, creciendo por la superficie de los pulmones. Este modelo, igual que los procesos de metástasis habitualmente observados en pacientes, es sensible a una respuesta de tipo citotóxico³²¹, ya sea dado porque las NK de los pulmones estimulen la respuesta secretando INF γ ³²², o a través de una respuesta de los linfocitos T³²³.

4.4.1. Modelo B16-F10-OVA

Se trató a los animales con los compuestos estimuladores de las iNKT combinados con OVA. Dado que todos los animales se eutanasiaron el mismo día, se aprovechó para realizar un análisis del sistema inmune, pero es importante tener en cuenta que estamos hablando de efectos a muy largo plazo (24 días después de la inoculación de los tratamientos). En este experimento se recuperaron el bazo y los nódulos linfáticos poplíteos. Se trató a los animales con 250ng de α GC o AC11, dosis que se eligió dados los resultados obtenidos con los modelos subcutáneos en los que se ha utilizado esta misma línea tumoral (**Figura 17**). El tratamiento se realizó a día -7, para permitir el establecimiento de la memoria inmune y garantizar que los efectos observados en el modelo son debidos a esta y no a procesos inflamatorios inespecíficos. A día 0 se inoculó 10^6 células tumorales por vía intravenosa tal y como se ha detallado en el apartado 3.5, y se ha mantenido los animales estabulados hasta el día +17, cuando se han eutanasiado y recuperado los pulmones, el bazo y los nódulos linfáticos poplíteos para su análisis.

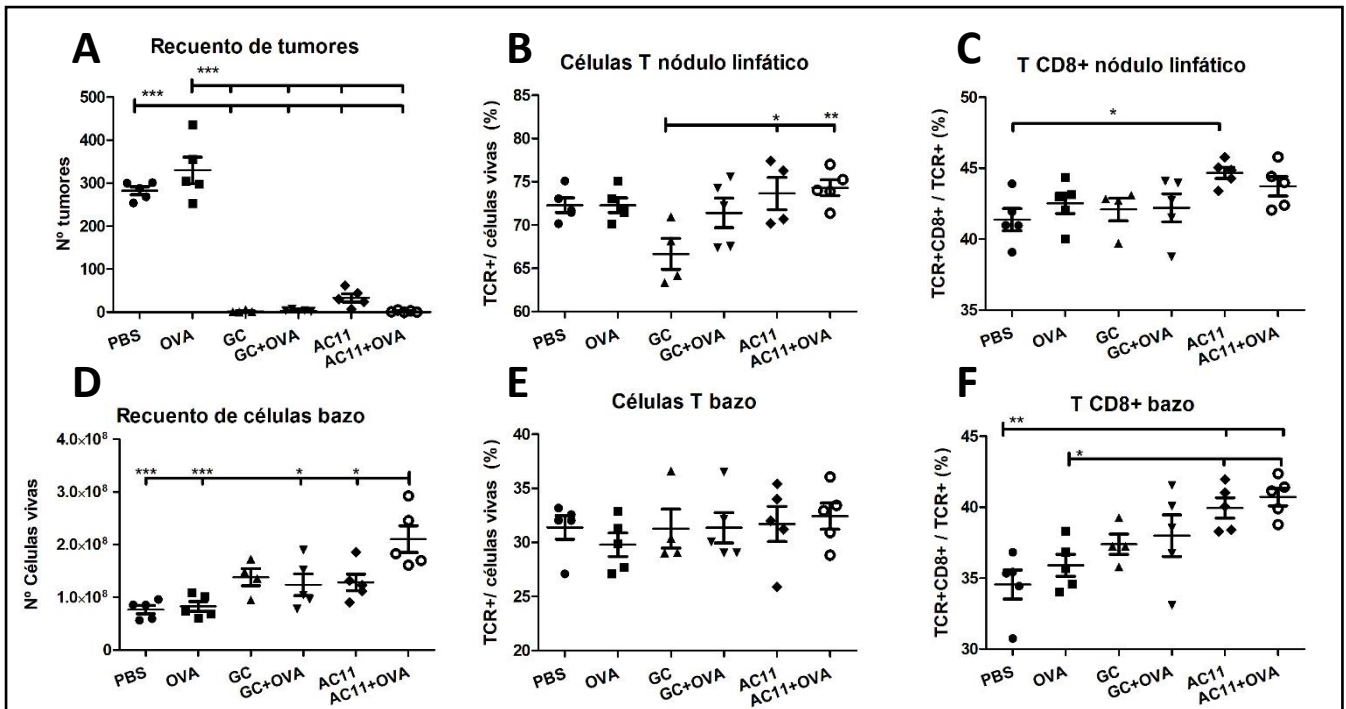


Figura 17: Resultados obtenidos en el modelo de metástasis pulmonar con la línea B16-F10-OVA intravenoso. Se visualizan tanto los resultados del recuento de tumores en los pulmones (**A**) como del análisis de citometría de flujo realizado (**B-F**). Los porcentajes de las poblaciones se representan con el número de células de interés respecto al total de células vivas de la muestra (**B, E**) o respecto al total de linfocitos T (**C, F**). El recuento total de células total se ha interpolado a través de la adición de 15.000 beads en cada muestra (**D**). N = 5 animales/grupo excepto la α GC = 4. En los análisis por citometría de flujo se ha excluido una muestra AC11 por problemas en el marcaje. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Observando el recuento de metástasis (**Figura 17 A**) todos los tratamientos inmunostimuladores han eliminado prácticamente todos los tumores. El único en el que se han encontrado unos pocos tumores es con el AC11, pero un número irrisorio en comparación a los controles. Analizando el sistema inmune, en el nódulo linfático (**Figura 17 B, C**) vemos por un lado que la α GC reduce el porcentaje de linfocitos T, efecto que parece neutralizarse al combinarse con OVA. En cuanto al AC11, vemos que genera un ligero aumento del porcentaje de linfocitos T, principalmente T CD8⁺ (**Figura 17 C**). En cuanto al bazo (**Figura 17 D-F**) se observa que ambos compuestos aumentan la celularidad de este órgano de forma similar, pero mientras que la α GC no varía su efecto al combinarse con OVA, el AC11 casi duplica el número de células al combinarse (1.25×10^8 células de media con AC11 respecto a 2.05×10^8 células de media con AC11+OVA) (**Figura 17 D**). A pesar de este aumento en números absolutos, vemos que los porcentajes de linfocitos T en el bazo no se ven alterados (**Figura 17 E**) pero sí la proporción de T CD8⁺, aumentando ligeramente con α GC, y significativamente con AC11, sin diferencias destacables entre los tratamientos simples o combinados con antígenos tumorales (**Figura 17 F**).

Estos resultados indican que ambos compuestos son capaces de desarrollar una respuesta antitumoral en este modelo, siendo a priori el tratamiento más eficaz la α GC. Pero, mientras que este no modifica su comportamiento de forma significativa al combinarse con OVA, el AC11 mejora su eficacia y además tiene un aumento de celularidad del bazo sensiblemente mayor en cuanto se combina con el antígeno tumoral. Estas evidencias junto con la deriva de los linfocitos hacia un fenotipo citotóxico, apuntan que el AC11 es capaz de

generar una respuesta antitumoral más específica, lo cual lo hace un mejor candidato para un tratamiento antitumoral, especialmente si pensamos en la traslacionalidad a humanos.

4.4.2. Modelo B16-F10

Dados los resultados obtenidos con el modelo intravenoso expresante de OVA, se decidió hacer una nueva aproximación. Primeramente, se redujo la dosis de compuestos inmunoestimuladores de 250ng/animal a 100ng/animal, para poder ver diferencias entre el tratamiento simple y administrando antígenos tumorales. Además, con los resultados de los modelos subcutáneos, se decidió usar la línea B16-F10 en lugar de la B16-F10-OVA, la cual al ser más agresiva permitirá ver aún con más claridad la diferencia entre los tratamientos. Al estar trabajando con esta línea celular se optó por proveer los antígenos con células tumorales apoptóticas, usando el protocolo de inducción de apoptosis comentado anteriormente, con una dosis de radiación UV. Por último, en ensayos previos se vio que esta línea tumoral, al tener un crecimiento más acelerado, de dejarse 17 días de lapso entre la inoculación del tumor y la eutanasia, las metástasis aumentan de tamaño hasta el punto de que se entorpece el recuento, por lo que se estableció como día de punto final y recuperación de órganos el 14 post inoculación de las células tumorales y se inocularon 0.5×10^6 células tumorales. En este caso se recuperaron los pulmones para realizar el conteo y el bazo, los nódulos linfáticos poplíteos y el líquido peritoneal para realizar un análisis del sistema inmune (**Figura 18**).

Durante la disección de los animales, se observó ciertos patrones en los tratamientos. Todos los animales tratados únicamente con células apoptóticas presentaban colonias tumorales en el peritoneo y por la superficie de los riñones. Lo mismo sucedió con un animal por grupo de tratamientos simples y con un PBS. Esto posiblemente es consecuencia de la agresividad de la línea B16-F10, lo cual ha posibilitado que esta crezca en otros tejidos a parte del pulmonar. Solo con esta observación ya se puede deducir que los tratamientos inmunoestimuladores combinados con células apoptóticas han tenido algún efecto, dado que son los únicos tratamientos en los que no se ha encontrado ningún animal con esta patología.

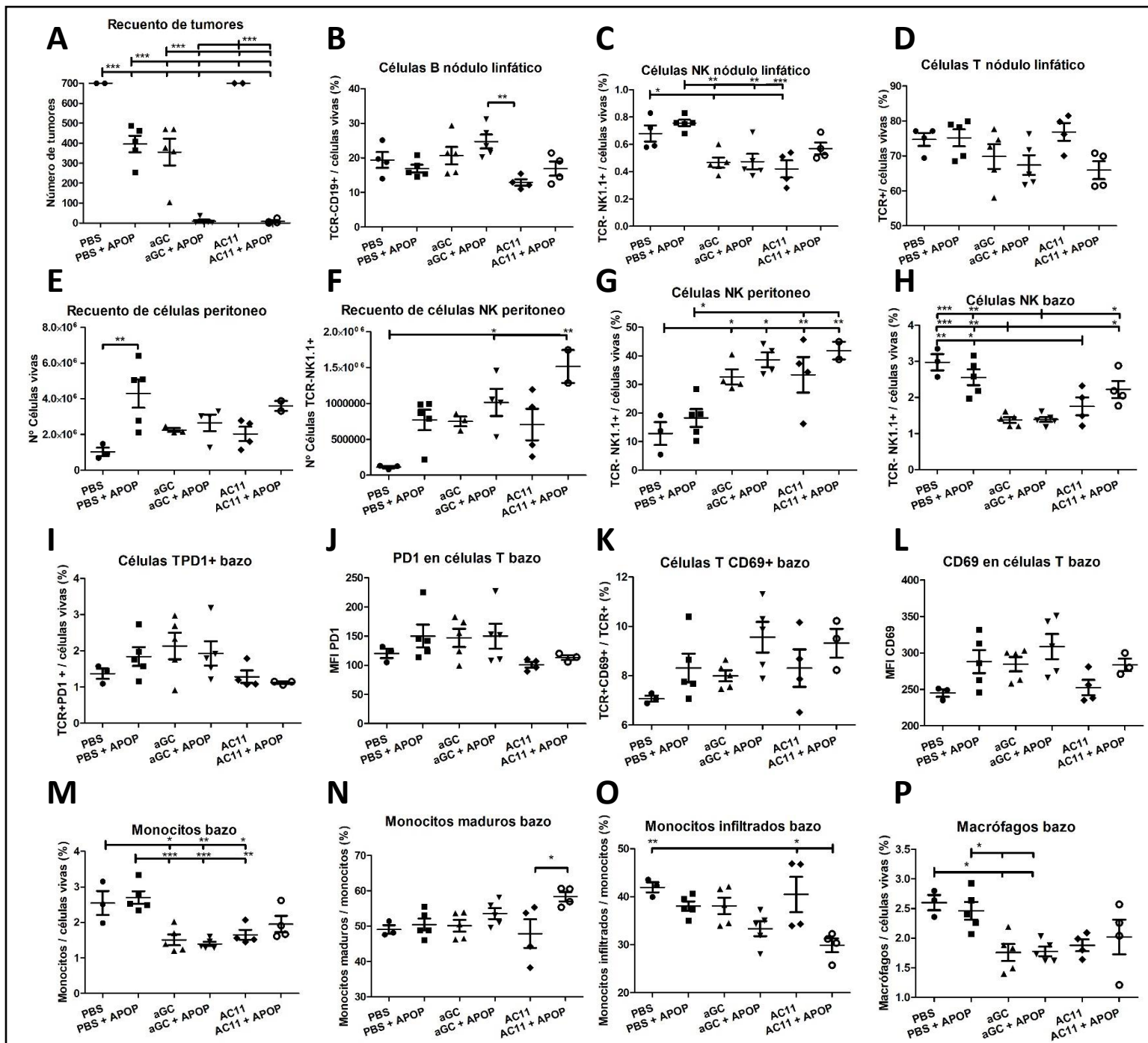


Figura 18: Resultados obtenidos en el modelo de metástasis pulmonar con la línea B16-F10. Se visualizan tanto los resultados del recuento de tumores en los pulmones (A) como del análisis de citometría de flujo realizado (B-P). Los porcentajes de las poblaciones se representan con el número de células de interés respecto al total de células vivas de la muestra (B-D, G-I, M, P) o respecto al total de su población (K, N, O). La expresión de PD1 o de CD69 están representados con la intensidad de fluorescencia media o *mean fluorescence intensity* (J, L). El recuento total de células total se ha interpolado a través de la adición de 15.000 beads en cada muestra (E, F). N = 4 animales por grupo en PBS, AC11 y AC11+APOP; N = 5 animales/grupo en PBS+APOP, αGC y αGC+APOP. En la citometría de flujo se han excluido las muestras que han dado discrepancias no aducibles a los tratamientos. * p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Pasando a los resultados cuantitativos (**Figura 18**), primero se puede observar que el tratamiento con células apoptóticas tiene un cierto efecto, reduciendo el número de metástasis pulmonares de 700 a 400, efecto similar al tratamiento con α GC. En cuanto al tratamiento con únicamente AC11, no tuvo ningún efecto en el número de metástasis. Por último, podemos ver claramente como la combinación de los tratamientos con células apoptóticas es capaz de eliminar de forma muy eficiente las metástasis tumorales (**Figura 18 A**). En cuanto a los análisis por citometría de flujo (**Figura 18 B-P**) en el nódulo linfático vemos que con el tratamiento con α GC aumenta ligeramente el porcentaje de linfocitos B, siendo este aumento mayor cuando se combina con células apoptóticas, mientras que con el AC11 se reduce, aunque se observa el mismo aumento al combinarlo con células apoptóticas (**Figura 18 B**). Los tratamientos inmunoestimuladores reducen la riqueza de células NK, salvo el tratamiento de AC11 con células apoptóticas, en el cual se revierte este efecto que observado tanto en el tratamiento simple como en ambos tratamientos con α GC (**Figura 18 C**). En cuanto a los linfocitos T, con todos los tratamientos se reduce el número relativo de estos de forma muy ligera, efecto que se neutraliza en el AC11, pero no en el AC11+APOP (**Figura 18 D**). En este órgano no se han observado cambios en los números absolutos de ninguna de las poblaciones estudiadas ni en el total de células del mismo (datos no mostrados).

En el peritoneo (**Figura 18 E-G**), tanto las células apoptóticas como los tratamientos inmunoestimuladores aumentan la celularidad de este órgano, sin diferencias significativas entre tratamientos (**Figura 18 E**). Este aumento de celularidad correlaciona el aumento de células NK, siendo este consistente con todos los tratamientos, pero con tendencias ligeramente diferentes en números absolutos (**Figura 18 F**). Este cambio de tendencias se puede corroborar cuando se observan los números relativos, en los que podemos ver que los tratamientos con α GC y AC11 aumentan sensiblemente la concentración de estas células, sin diferencias significativas entre tratamientos ni en la combinación de estos con células apoptóticas (**Figura 18 G**).

Por último, en el bazo (**Figura 18 H-P**) observamos los resultados opuestos en cuanto a porcentaje de células NK. Vemos que con los tratamientos hay una reducción del porcentaje de estas, y en este órgano sí que se observan ligeras diferencias entre los tratamientos, siendo la reducción mayor con α GC. En cuanto a la combinación de los compuestos con células apoptóticas, con la α GC no tiene casi ningún efecto, mientras que con el AC11 esta combinación hace aumentar ligeramente la población de células NK hasta poder acercarse a los valores del grupo control (**Figura 18 H**). En cuanto al agotamiento de los linfocitos T, con los tratamientos con células apoptóticas, con α GC o con α GC+APOP se observa un aumento del agotamiento similar. En cambio, el AC11 genera menos agotamiento, aunque la diferencia es relativamente pequeña, efecto notable tanto en el número de linfocitos T PD1⁺ (**Figura 18 I**) como en intensidad de expresión de PD1 (**Figura 18 J**) en ambos tratamientos con AC11. Los tratamientos simples estimulan la expresión de CD69, y al combinarlos con las células apoptóticas aumenta más su expresión. El efecto es similar entre ambos compuestos, y se puede observar tanto en número de linfocitos T CD69⁺ (**Figura 18 K**) como en intensidad de expresión (**Figura 18 L**).

Pasando al compartimento mieloide, observamos que tanto la α GC como el AC11 reducen el número de monocitos en el bazo, pero mientras que el primero no se ve afectado por la adición de células apoptóticas, el AC11 aumenta la concentración de monocitos al combinarlo con una fuente de antígenos tumorales (**Figura 18 M**). En cuanto al fenotipo de estas células, vemos que los tratamientos simples prácticamente no afectan a la preponderancia de ambos fenotipos, mientras que los tratamientos combinados propician una reducción del número de monocitos infiltrados o inmaduros (Ly6C⁺/GR1⁺) (**Figura 18 O**) y aumente respectivamente el de monocitos maduros (Ly6C⁻/GR1⁻) (**Figura 18 N**). También se observa un efecto en los macrófagos, reduciendo su número relativo con ambos compuestos, y este solo tiene tendencia a recuperarse con el tratamiento AC11+APOP (**Figura 18 P**).

En resumen, los tratamientos combinados con células apoptóticas tienen mayor efectividad que los tratamientos simples, por lo que se puede determinar que se ha desarrollado una respuesta inmune específica contra el tumor, siendo el tratamiento con una mejoría más notable el AC11. Pasando al análisis por citometría de flujo, y teniendo en cuenta que estos análisis se están realizando tras un lapso desde la inoculación de los tratamientos realmente largo, podemos observar cómo los efectos de los compuestos. Se detecta que AC11 tiene un efecto similar o ligeramente mejor en todos los efectos de tipo citotóxico (células NK, maduración de los monocitos y linfocitos T) y genera un fenotipo de agotamiento ligeramente menor con una activación similar. Pero, los resultados más relevantes son por una parte que no estimula la respuesta de tipo Th2, lo cual se puede observar con la falta de estimulación de los linfocitos B y correlaciona con lo observado en estudios anteriores¹, y por otra parte vemos que la α GC se ve relativamente poco afectado al combinarse con células apoptóticas, mientras que el AC11, además del efecto que se observa en el recuento de tumores, vemos efectos en las poblaciones del sistema inmune que permanecen 21 días después del tratamiento. Esto indica que el efecto de la α GC es agudo, pero no es sostenido en el tiempo, mientras que el AC11 da una respuesta más específica y los efectos de esta se mantienen con el paso del tiempo.

4.5. Diferencias en la respuesta inmune entre sexos

Los resultados obtenidos en el laboratorio demostraron que la α GC genera una respuesta inmune muy intensa, pero de tipo Th0. En cambio, algunos de los análogos aminociclitolos testados dan una respuesta dirigida, como el HS44³⁰⁴ y el AC11^{1,306}, dando una respuesta de tipo Th1 como hemos ido viendo en los modelos tumorales. Estos efectos se observaron *in vitro*, con cultivos de hibridomas de iNKT e *in vivo* tanto con el análisis de citocinas y quimioquinas séricas como IL-4, INF γ o CXCL9 y con la expansión de iNKT, linfocitos T, linfocitos B y sus fenotipos de activación y anergia. También se observó que el AC11 es capaz de expandir las iNKT humanas, usando PBMCs de un donante sano¹. Estos análisis previamente mentados se realizaron únicamente con hembras de la cepa C57 BL6/J, y dadas las evidencias encontradas en los resultados de diferencias entre sexos y a las evidencias bibliográficas¹⁷, se decidió realizar un ensayo de estimulación del sistema inmune con 100ng de ambos compuestos y a día +4 se recuperó el bazo (Figura 19), el líquido peritoneal (Figura 20), los nódulos linfáticos poplíteos (Figura 21) y la médula ósea (Figura 22) para su análisis. Se usó este lapso y dosis porque en experimentos realizados con anterioridad se demostró que son las condiciones con las que ambos compuestos dan una diferencia más notable¹.

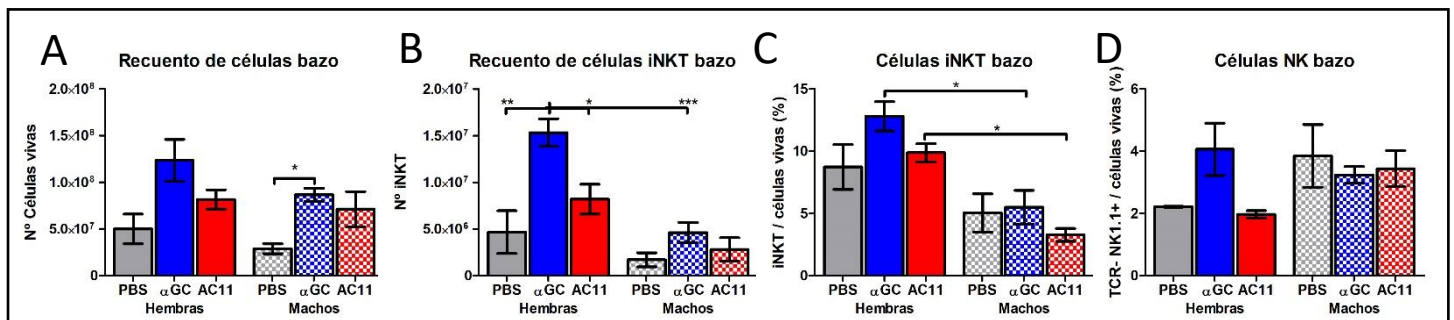


Figura 19: Comparativa de resultados obtenidos en machos y hembras a día +4 post inoculación de compuestos en bazo. Análisis realizados por citometría de flujo. En colores sólidos se representan los resultados en hembras, y a cuadros los resultados en machos. Los porcentajes de las poblaciones se representan con el número de células de interés respecto al total de células vivas de la muestra (C, D). El recuento total de células se ha interpolado tras la adición de 15.000 beads en cada muestra (A, B). Se muestra un ejemplo del marcaje para visualizar las iNKT en cada sexo y cada tratamiento en este órgano. Solo se muestran las diferencias estadísticas de las comparativas relevantes. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001. N = 3 animales por grupo en PBS y α GC hembras; N = 4 en AC11 hembras N = 6 animales/grupo en machos. Se han excluido las muestras que han dado discrepancias no aducibles a los tratamientos.

En bazo ambos compuestos han generado un aumento de la celularidad en los dos sexos, a pesar de que la única diferencia significativa se observa entre la α GC y el PBS en machos. En esta misma línea, parece que el agonista prototípico aumenta más la celularidad que el AC11 (Figura 19 A). En hembras las iNKT aumentan su número total con la inoculación de ambos compuestos, mientras que en machos no se han expandido con ninguno, dando una diferencia entre sexos que llega a ser significativa en el caso de la α GC con el tratamiento homólogo en machos (Figura 19 B), diferencia que también se observa al analizar esta misma población respecto al total de células del órgano, obteniéndose diferencias significativas entre sexos (Figura 19 C). En cuanto a las células NK, se puede ver como el único tratamiento que tiene algún efecto sobre estas es la α GC y únicamente en hembras, aunque sin llegar a obtener significancia estadística (Figura 19 D).

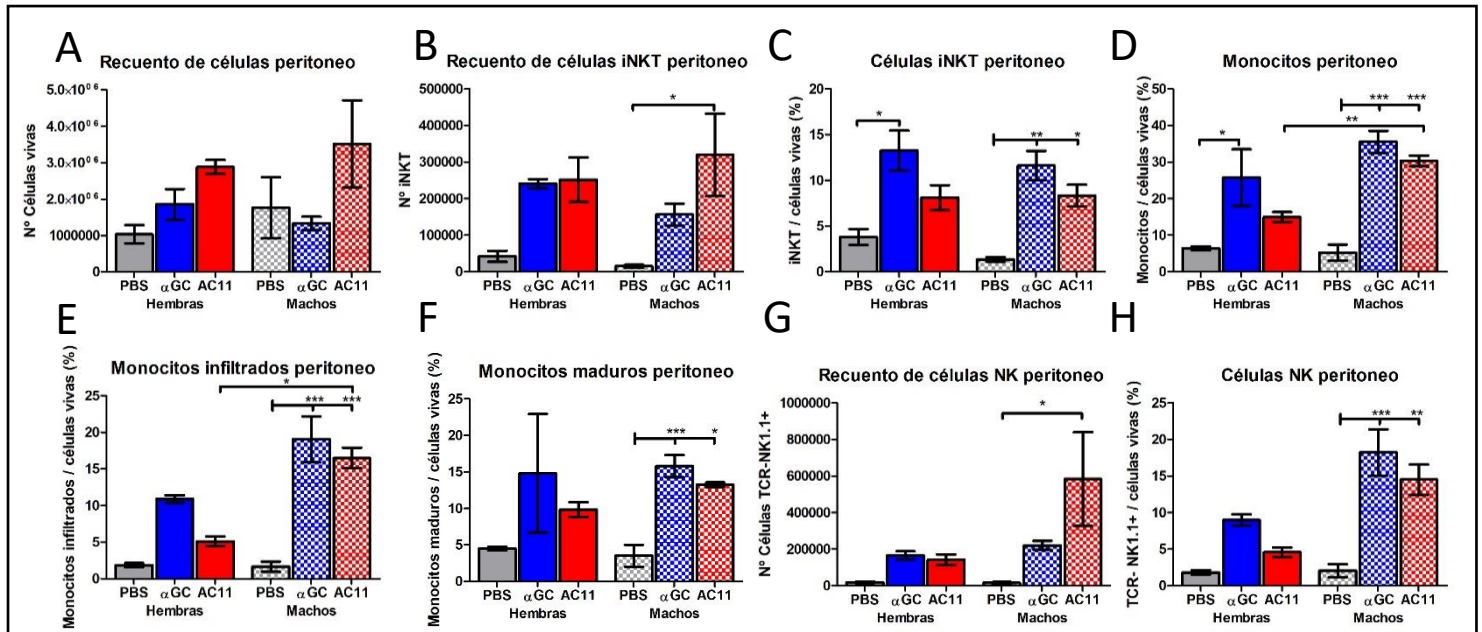


Figura 20: Comparativa de resultados obtenidos en machos y hembras a día +4 post inoculación de compuestos en líquido peritoneal. Análisis realizados por citometría de flujo. En colores sólidos se representan los resultados en hembras, y a cuadros los resultados en machos. Los porcentajes de las poblaciones se representan con el número de células de interés respecto al total de células vivas de la muestra (C-F, H). El recuento total de células se ha interpolado tras la adición de 15.000 beads en cada muestra (A, B G). Solo se muestran las diferencias estadísticas de las comparativas relevantes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. N = 3 animales por grupo en PBS y α GC hembras; N = 4 en AC11 hembras N = 6 animales/grupo en machos. Se han excluido las muestras que han dado discrepancias no aducibles a los tratamientos.

Analizando el peritoneo, en hembras ambos compuestos aumentan la celularidad, siendo mayor con AC11. En machos ninguno de los compuestos ha tenido un efecto significativo (Figura 20 A). Observando las iNKT absolutas, estas se expanden con ambos compuestos en ambos sexos, siendo el efecto mayor con el AC11 (Figura 20 B). En cambio, porcentualmente han aumentado más con α GC que con AC11 en ambos casos, teniendo los dos compuestos un efecto similar (Figura 20 C). Observando el compartimento mieloide, ambos tratamientos aumentan la proporción de monocitos en machos de forma significativa, mientras que en hembras solo lo consigue el agonista prototípico, aunque el AC11 también aumenta la proporción de esta población. Además, se observa que la α GC tiene un efecto bastante similar entre sexos, mientras que el AC11 aumenta significativamente más los monocitos en machos (Figura 20 D), y un efecto similar se puede observar en los porcentajes de monocitos infiltrados (Figura 20 E) y en la maduración de estos (Figura 20 F). En cuanto a las NK, ambos tratamientos aumentan su porcentaje en ambos sexos. En números absolutos, ambos compuestos en hembras tienen un efecto similar, mientras que en machos el AC11 tiene un efecto más potente (Figura 20 G). Pasando a los porcentajes, tienen un efecto similar en cada sexo, aumentando ambos las NK, pero siendo ligeramente más efectivo el agonista prototípico. Entre sexos, aunque no se ve una diferencia significativa, se intuye que en machos aumenta más la proporción de esta población, similar a la observación en valores absolutos (Figura 20 H).

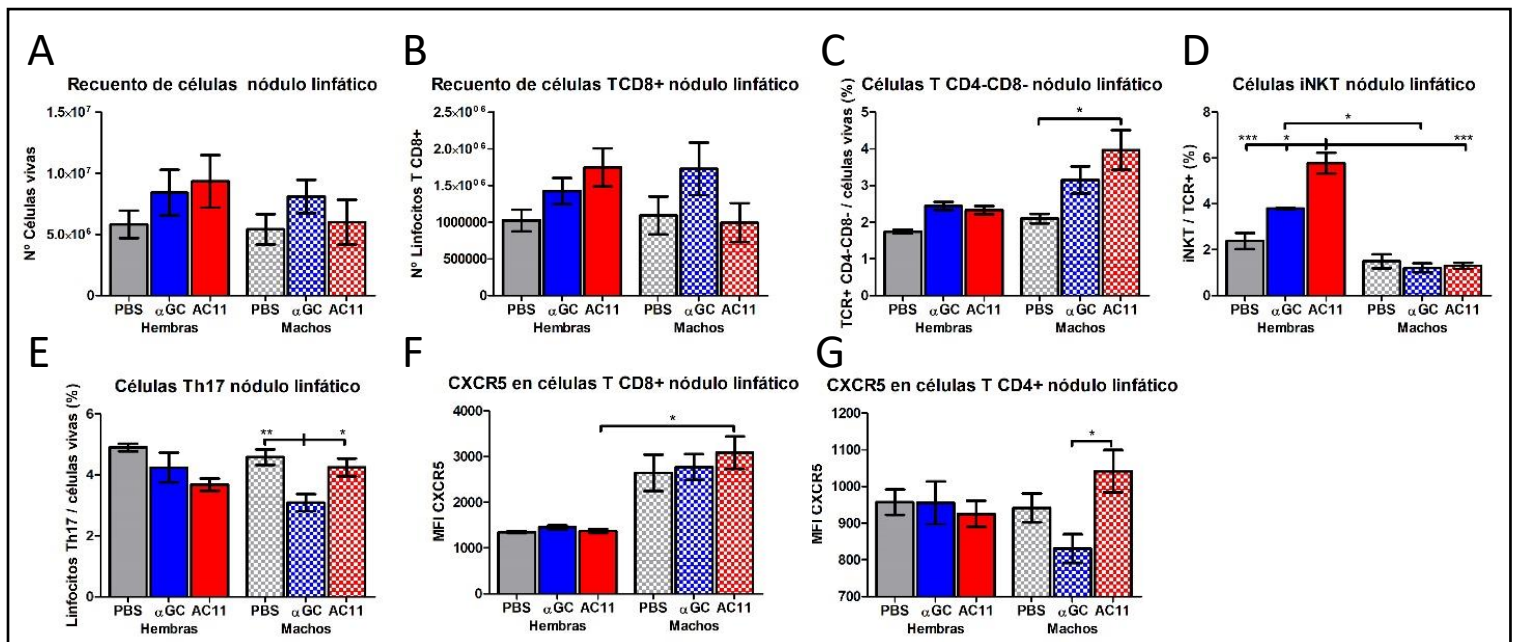


Figura 21: Comparativa de resultados obtenidos en machos y hembras a día +4 post inoculación de compuestos en nódulos linfáticos poplíteos. Análisis realizados por citometría de flujo. En colores sólidos se representan los resultados en hembras, y a cuadros los resultados en machos. Los porcentajes de las poblaciones se representan con el número de células de interés respecto al total de células vivas de la muestra (C-E). El recuento total de células se ha interpolado tras la adición de 15.000 beads en cada muestra (A, B). La expresión de CXCR5 está representada con la intensidad de fluorescencia media o mean fluorescence intensity (F, G). Solo se muestran las diferencias estadísticas de las comparativas relevantes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. N = 3 animales por grupo en PBS y α GC hembras; N = 4 en AC11 hembras N = 6 animales/grupo en machos. Se han excluido las muestras que han dado discrepancias no aducibles a los tratamientos.

Pasando a los resultados obtenidos de los nódulos linfáticos poplíteos, no muestran cambios significativos en el número de células ni hay diferencias significativas entre sexos. A pesar de eso, es detectable una tendencia con el AC11 a aumentar la celularidad únicamente en hembras (**Figura 21 A**). En cuanto a los linfocitos T CD8⁺ en números absolutos siguen la misma tendencia que la observada en la celularidad (**Figura 21 B**), pero en cambio vemos que los linfocitos T doble negativos en hembras apenas modifican su proporción, pero en machos se expanden de forma significativa con AC11, pasando de alrededor de un 2% a un 3.1% con α GC y llegando a cerca del 4% con AC11 (**Figura 21 C**). En cuanto a las iNKT, en hembras aumentan su proporción con ambos compuestos, siendo este sensiblemente mayor con AC11, obteniendo un 5.78% frente al 3.80% de la α GC y el 2.38% del PBS. En machos, por el contrario, no hay ningún efecto de los tratamientos en esta población, y los controles tienen valores similares a los de las hembras (**Figura 21 D**). fijándonos en los Th17, en hembras no se afectan significativamente, aunque hay una tendencia a reducir su proporción con los tratamientos, siendo el más acusado el AC11. Por el contrario, en machos se puede ver como el AC11 no tiene ningún efecto, mientras que la α GC ha reducido sensiblemente su proporción (**Figura 21 E**). Por último, en cuanto a activación de los linfocitos, vemos que en machos los TCD8⁺ tienen una mayor expresión de CXCR5, la cual no se ve afectada por ningún tratamiento (**Figura 21 F**), mientras que en los T CD4⁺ en hembras tampoco se ve ningún efecto reseñable, pero en machos se puede observar como con α GC hay una ligera reducción de la expresión de CXCR5, y con AC11 aumenta esta misma (**Figura 21 G**).

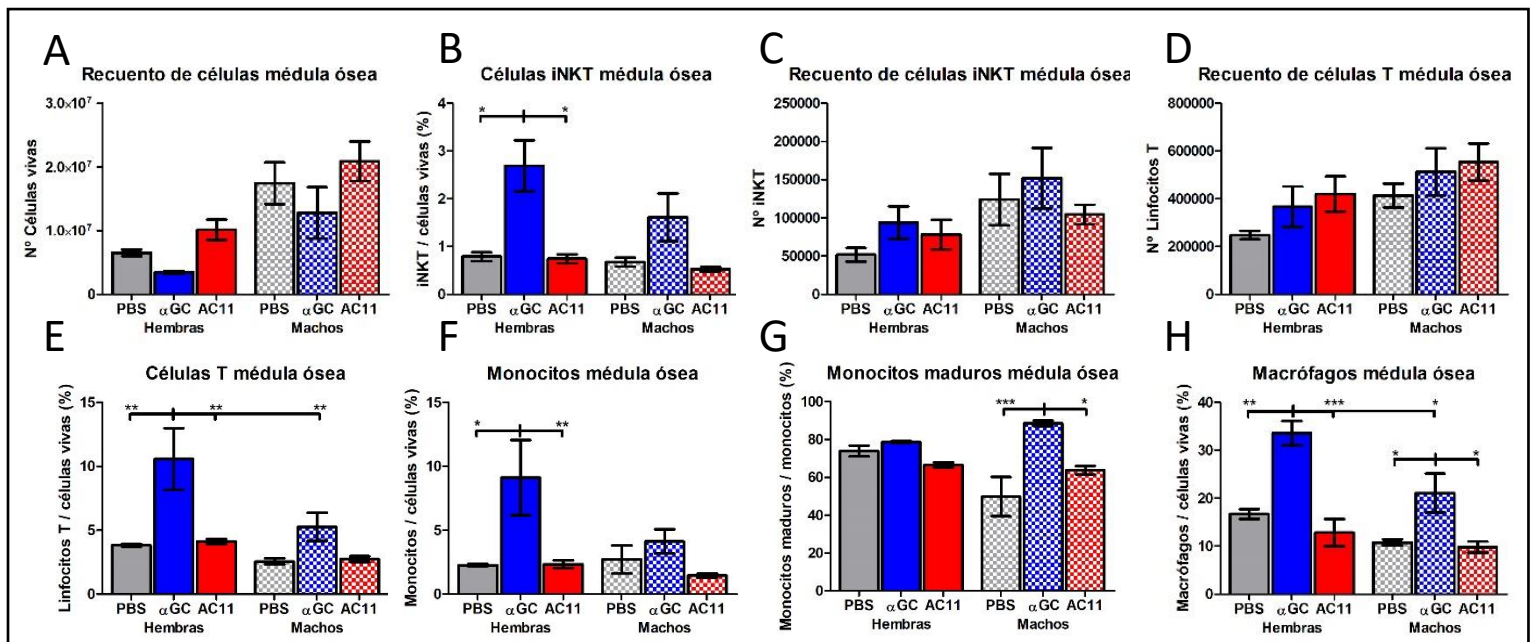


Figura 22: Comparativa de resultados obtenidos en machos y hembras a día +4 post inoculación de compuestos en médula ósea. Análisis realizados por citometría de flujo. En colores sólidos se representan los resultados en hembras, y a cuadros los resultados en machos. Los porcentajes de las poblaciones se representan con el número de células de interés respecto al total de células vivas de la muestra (B, E-H). El recuento total de células se ha interpolado añadiendo 15.000 beads en cada muestra (A, C, D). Solo se muestran las diferencias estadísticas de las comparativas relevantes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. N = 3 animales por grupo en PBS y α GC hembras; N = 4 en AC11 hembras N = 6 animales/grupo en machos. Se han excluido las muestras que han dado discrepancias no aducibles a los tratamientos.

Centrándonos en los resultados de la médula ósea, en el recuento de células total se observa un patrón similar en ambos sexos: los animales tratando con α GC tienen una celularidad menor y los tratados con AC11 un poco mayor, sin llegar en ningún caso a diferencias estadísticas significativas (Figura 22 A). Fijándonos en las iNKT, el AC11 no ha tenido ningún efecto en ambos sexos, mientras que la α GC ha aumentado notablemente el porcentaje de estas, llegando a triplicar su porcentaje en hembras (Figura 22 B). Pero, en valores absolutos no ha habido ningún cambio significativo con los tratamientos (Figura 22 C). En cuanto a los linfocitos T, en números absolutos ambos tratamientos aumentan ligeramente este valor en ambos sexos (Figura 22 D), pero si se ponen en relación a las células del órgano, presentan el mismo patrón que las iNKT (Figura 22 E), el cual se replica en los monocitos (Figura 22 F) y los macrófagos (Figura 22 H). Además, tanto con los linfocitos T como con los macrófagos se ha obtenido diferencias de efectos entre sexos con la α GC, aumentando la preponderancia de las poblaciones en hembras (Figura 22 E, H). Por último, vemos que dentro de los monocitos el fenotipo no se ve alterado en hembras, pero en machos los tratamientos modifican la maduración de estos, mostrando el AC11 un ligero aumento de esta, el cual es mucho más acusado con α GC (Figura 22 G).

En resumen, de estos datos se puede extraer que la respuesta a ambos compuestos es claramente diferente entre sexos. En machos con ambos compuestos se observa una menor expansión de las iNKT en bazo; en peritoneo se observa una expansión mayor de monocitos y NK; en nódulos linfáticos poplíteos se observa una expresión mayor de CXCR5 en los linfocitos T CD8⁺; y en médula ósea se observa una mayor expansión de

células en general. Esto por sí solo ya indica que el sexo es relevante en la estimulación de las iNKT, pero además cada compuesto tiene un comportamiento distinto. En bazo, la α GC expande mucho más las iNKT que el AC11 en hembras, mientras que en machos prácticamente no tiene efecto en dicha población. También se puede ver como únicamente la α GC aumenta la proporción de células NK en hembras, mientras que en machos no modifica su porcentaje. En el peritoneo, el AC11 aumenta la celularidad en ambos sexos, mientras que la α GC la aumenta en machos, pero la reduce en hembras. En cuanto a las iNKT de dicho compartimento ambos las expanden y en proporciones similares, siendo el efecto del agonista prototípico ligeramente mayor. También se observa una mayor expansión de NK y monocitos en machos con ambos compuestos, sin diferencias entre ellos. En los nódulos linfáticos poplíteos ambos compuestos son incapaces de aumentar las iNKT en machos, mientras que en hembras las expanden, siendo el más efectivo el AC11. Por último, en médula ósea se observa que solo la α GC expande las iNKT, los linfocitos T, los monocitos y los macrófagos, siendo este efecto mayor en hembras, y aumenta la maduración de los monocitos en machos.

Estos resultados pueden ser la explicación de porque nuestros compuestos funcionan mejor en hembras, en especial el AC11. Los datos mostrados con este experimento indican que las células que son responsables de la actuación con nuestros compuestos, las iNKT, en machos solo se ven estimuladas en el lugar de inoculación, en el cual se ve una expansión similar a la de las hembras. En los otros compartimentos, nuestro análogo no estimula las iNKT, y el agonista prototípico tiene un efecto menor. Esto no implica que no haya ninguna respuesta en machos, porque como se muestra en los resultados obtenidos, las células del compartimento mieloide como las NK o los monocitos se ven expandidas. Este efecto probablemente sea dado por la reducida capacidad de las iNKT de activar una respuesta citotóxica por la falta de estrógenos¹⁷, pero sin afectar a otras vías de actuación.

4.6. Ensayo con análogos glucosilados del α -S-galactosilceramida

Durante la elaboración de esta tesis, se nos proporcionó unos análogos glucosilados del α -S-galactosilceramida descritos por Zhang²⁸⁷, los cuales se produjeron con el mismo objetivo que los análogos aminociclitolos, generar una respuesta de las iNKT dirigida hacia una actividad específica y efectiva. Estos análogos, denominados XZ, derivan de un compuesto que genera una respuesta de tipo Th2²⁸³, y que a priori tiene una mejor interacción al presentarse a las iNKT^{284,285}. La principal problemática del estudio de este compuesto es la falta de respuesta por las iNKT murinas^{284,286}, hecho que dificulta enormemente el obtener datos de estos compuestos para poder desarrollar tratamientos que en un futuro puedan acabar ayudando a pacientes. Por este motivo, en el grupo que desarrolló dichos compuestos testaron su actividad frente a iNKT expandidas de sangre humana en cultivo con líneas tumorales de HeLa que expresan CD1d para garantizar la presentación del compuesto. En estos ensayos vieron que los denominados XZ7 y XZ11 eran capaces de estimular las iNKT, aunque con concentraciones 100 veces mayores que el agonista prototípico solo obtenían aproximadamente un 30% de degranulación de las iNKT (determinado por la expresión de CD107a), mientras que la α GC obtenía valores del 80%. A pesar de dar una estimulación mucho menos intensa, sí que demostraron ser específicos, generando una respuesta de IFN γ el XZ7 y de IL-4 el XZ11²⁸⁸. Por este motivo, decidimos realizar un ensayo para ver la actividad generada en ratones inoculando intraperitonealmente 500ng (**Figura 23**) o 2 μ g (**Figura 24**) de estos compuestos y analizando las poblaciones del sistema inmune de bazo y peritoneo a día +4.

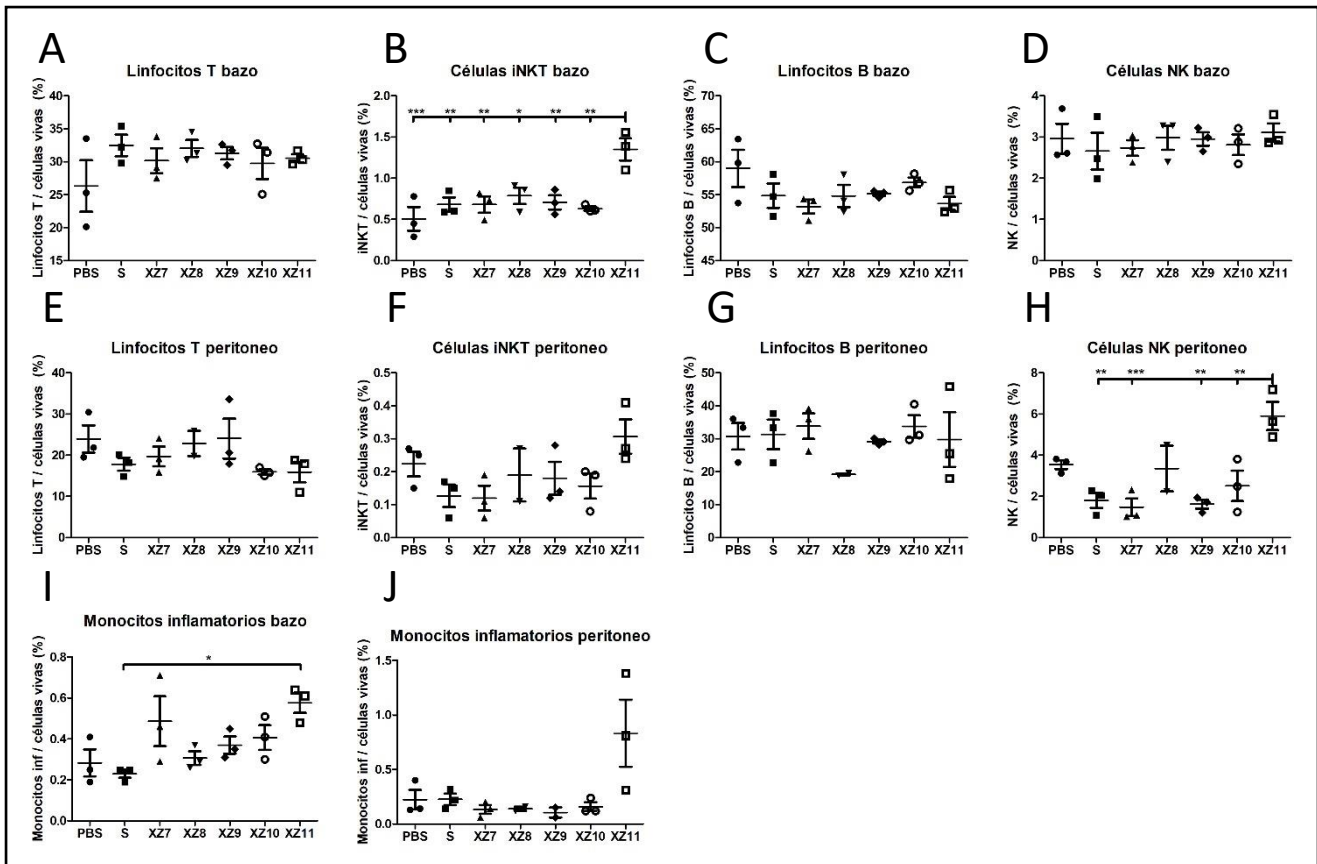


Figura 23: Análisis de las poblaciones del sistema inmune con los análogos XZ a 500ng/animal a día +4. Análisis realizados por citometría de flujo. Los porcentajes de las poblaciones se representan con el número de células de interés respecto el total de células vivas. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. N = 3 animales por tratamiento. Se han excluido las muestras que han dado discrepancias no aducibles a los tratamientos.

Analizando la respuesta inmune a 500ng (**Figura 23**) tanto el α -S-galactosilceramida (en los gráficos rotulado como "S") como los compuestos XZ7 a 10 no generan ninguna respuesta relevante en ninguno de los dos órganos a nivel de linfocitos T, B o iNKT, mientras que el XZ11 es capaz de estimular de forma significativa las iNKT en el bazo, y en el peritoneo también aumentan ligeramente, sin llegar a ser significativo (**Figura 23 A-C, E-G**). En cuanto a las NK, el XZ11 aumenta su número relativo en el lugar de administración, y el XZ8 también parece estimular esta población en peritoneo (**Figura 23 H**), mientras que en el bazo no se ven afectadas (**Figura 23 D**). Por último, se hizo un análisis del compartimento mieloide, en el que se detectó que el XZ11 estimula los monocitos inflamatorios tanto en bazo (**Figura 23 I**) como en peritoneo (**Figura 23 J**), aunque no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. En este último análisis otro compuesto que parece tener un efecto relevante es el XZ7, pero únicamente en el bazo y nuevamente sin obtener diferencias significativas.

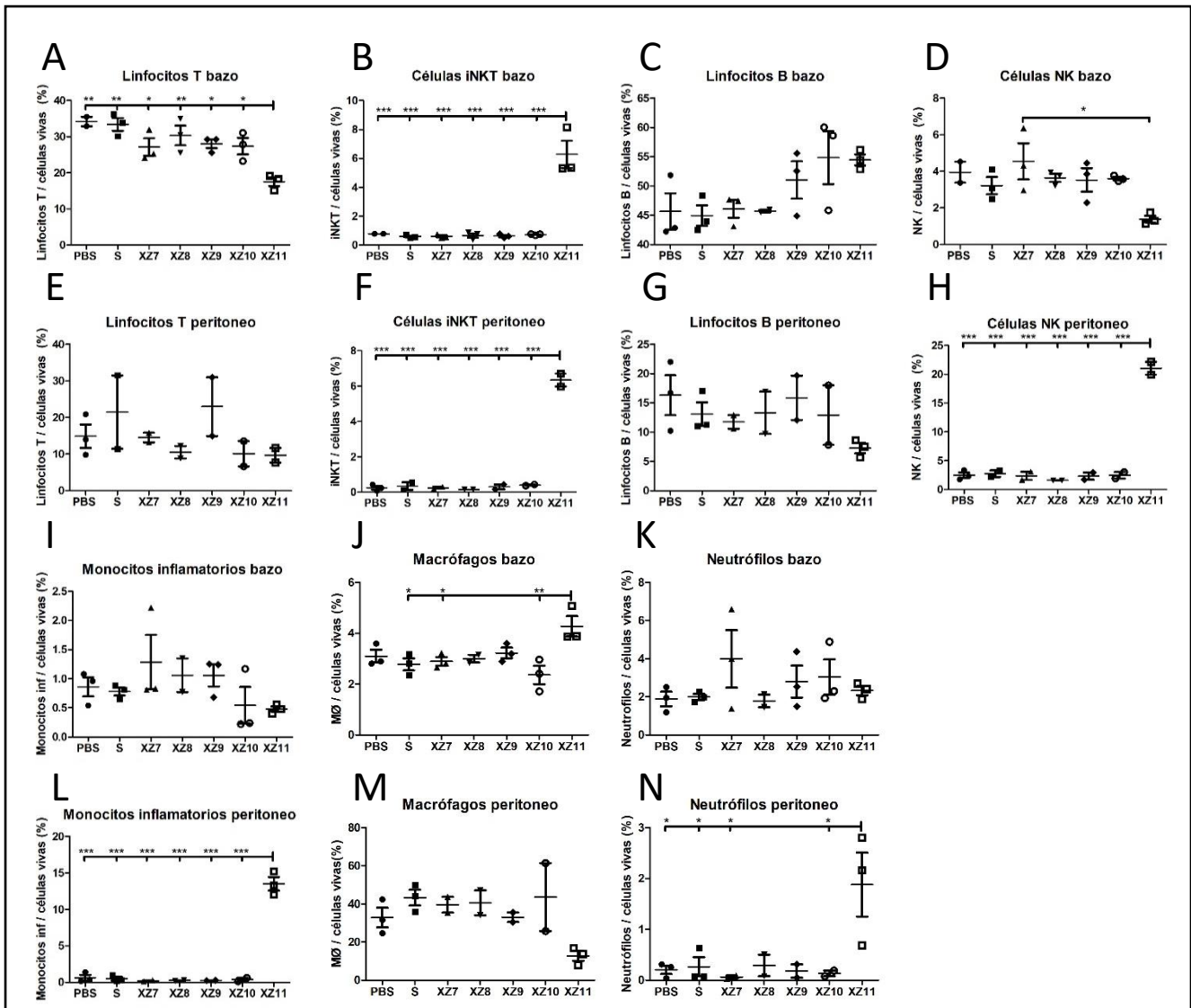


Figura 24: Análisis de las poblaciones del sistema inmune con los análogos XZ a $2\mu\text{g}/\text{animal}$ a día +4. Análisis realizados por citometría de flujo. Los porcentajes de las poblaciones se representan con el número de células de interés respecto el total de células vivas. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. N = 3 animales por tratamiento. Se han excluido las muestras que han dado discrepancias no aducibles a los tratamientos.

Dados los resultados obtenidos en el experimento de 500ng , se testó la actividad de estos compuestos a una concentración 4 veces mayor, para corroborar la actividad de los compuestos que demostraron tener efecto a dosis menores y para ver si algún otro compuesto tiene efecto sobre la actividad de las iNKT murinas (**Figura 24**). En el compartimento linfoide, el XZ11 ha tenido efectos más significativos en las iNKT tanto en bazo como en peritoneo, aumentando su porcentaje en ambos casos de forma clara (**Figura 24 B, F**). También vemos una reducción significativa de la preponderancia de linfocitos T en bazo con el XZ11 (**Figura 24 A**), aunque en peritoneo no llega a darse un cambio tan drástico con ninguno de los compuestos (**Figura 24 E**). Fijándonos en la respuesta humoral, los XZ9, 10 y 11 aumentan ligeramente el porcentaje de linfocitos B en bazo, aunque sin llegar a ser un aumento significativo (**Figura 24 C**). Por el contrario, en peritoneo los compuestos XZ9 y 10 no tienen ningún efecto sobre los linfocitos B, mientras que el XZ11 reduce ligeramente esta población, sin llegar a obtenerse diferencias estadísticamente significativas (**Figura 24 G**). Pasando ahora a las NK, podemos ver

como el compuesto XZ11 en bazo reduce ligeramente la preponderancia de esta población, obteniéndose diferencias significativas únicamente con el grupo que obtuvo valores más altos de estas células (**Figura 24 D**). En cambio, en peritoneo vemos un aumento de estas células muy importante, pasando del 2.49% al 21.05% de media, siendo este el único compuesto que aumenta de forma significativa esta población (**Figura 24 H**).

En cuanto al compartimiento mieloide (**Figura 24 I-N**), en bazo hay efectos relevantes más allá de un ligero aumento de los macrófagos con el XZ11 (**Figura 24 J**), mientras que los monocitos y los neutrófilos se mantienen en rangos similares con todos los compuestos (**Figura 24 I, K**). A pesar de esto, en peritoneo observamos un claro aumento de los monocitos inflamatorios (**Figura 24 L**), una reducción de los macrófagos que no llega a ser significativa (**Figura 24 M**) y un aumento de los neutrófilos (**Figura 24 N**).

De estos resultados se extrae que el único compuesto de esta batería de análogos del α -S-galactosilceramida que tiene actividad sobre las iNKT murinas es el XZ11, y esta actividad esta derivada hacia una respuesta tipo Th2, como la reportada en iNKT humanas en cultivo. Los demás compuestos, no han desarrollado ninguna respuesta significativa, ni a 500ng ni a 2 μ g. Por lo que el único compuesto que podría ser candidato a usarse en modelos de enfermedades animales sería el XZ11, pero dado que la respuesta frente a este compuesto es de tipo humoral, no sería una respuesta eficiente frente a los modelos animales tumorales usados en los experimentos con el compuesto AC11. Además, remarcar que se ha trabajado con dosis mucho más elevadas que las utilizadas con nuestros compuestos, en el caso de los análisis análogos a los mostrados en estos experimentos serian 5 o 20 veces mayores las utilizadas con los análogos XZ.

5. Discusión

En la actualidad, existe una problemática a nivel social derivada de las patologías oncológicas, debido a su alta morbilidad y a la letalidad de estas. Esta situación ha causado que durante mucho tiempo el trabajo de diversos grupos de investigación se haya enfocado en conocer mejor esta enfermedad y así ser capaces de desarrollar un tratamiento contra la misma. Pero, con el paso de los años, la comunidad científica ha comprendido que lo que conocemos como “cáncer” engloba un grupo muy amplio de enfermedades caracterizadas únicamente por un crecimiento celular que no puede ser controlado de forma natural, pero esta masa evita su eliminación por parte del sistema inmune a través de mecanismos muy diversos. El problema reside precisamente en este último factor, el cual propicia que dos patologías clínicamente iguales evadan el sistema inmune de formas completamente independientes. Debido a estas características, nunca se ha conseguido desarrollar un tratamiento específico contra las células causantes de la enfermedad, motivo por el cual los tratamientos clásicos se dirigen hacia actividades genéricas de las células tumorales como generar una citotoxicidad contra las células que se dividen activamente (quimioterapia) o directamente intentando dañar o eliminar la masa de células (radioterapia o cirugía). Este tipo de tratamientos tienen como inconvenientes tanto los graves efectos secundarios (como son alopecia, disfunciones digestivas, anemia, inmunodepresión, hemorragias, hepatotoxicidad e incluso trastornos cognitivos entre otros) como una efectividad limitada, dado que son muchos los casos en los que no son capaces de erradicar las células malignas. Básicamente todos los tejidos con una alta tasa de recambio (como son mucosas, epitelios, capilar y los hematopoyéticos) y los tejidos encargados de la eliminación de fármacos en sangre (hepático y renal) se ven altamente afectados por estos tratamientos.

Por todas estas razones comentadas, diversos investigadores han centrado su trabajo en intentar desarrollar tratamientos inmunoestimuladores para que el sistema inmune del paciente pueda eliminar la propia masa tumoral, desarrollando tratamientos que intentan evitar la evasión del sistema inmune por parte del tumor y tratamientos que intentan estimular directamente la actividad del sistema inmune³²⁴. Dentro de los tratamientos inmunoestimuladores, las iNKT han cobrado relevancia debido a que pueden estimular un amplio abanico de respuestas del sistema inmune de forma rápida y eficiente, lo cual las ha postulado como dianas para los tratamientos antitumorales. Además, que esta población responda frente a glicolípidos es otro factor interesante dado que al no estar estos sometidos a tanta presión selectiva en la población tumoral, existe la posibilidad que las células malignas presenten variaciones en este tipo de antígenos los cuales puedan ser reconocidos por las iNKT tras ser activadas.

Estos factores proponen a las iNKT como unas buenas candidatas para desarrollar una respuesta inmune frente a diversas patologías, pero su bajo número y el poco conocimiento que tenemos sobre las mismas siempre ha dificultado la investigación sobre este tipo de tratamientos. Aún con todo, con el agonista prototípico usado para estimular esta población, la α GC, ya se pudo determinar el potencial de estas células para terapias inmunoestimuladoras en modelos animales^{144,241-243,245-248}. Pero, ensayos posteriores con el mismo revelaron que el principal problema de este compuesto es la estimulación de todas las respuestas de las iNKT, generando una respuesta de tipo Th0²⁶⁴. Por este motivo, diversos grupos de investigación, entre los cuales está el nuestro, han intentado a lo largo de los años desarrollar tratamientos que puedan estimular a esta población a desarrollar la respuesta deseada. En esta línea, se desarrollaron los análogos aminociclitoles de la α GC, en entre los cuales destacaron el HS44³⁰⁴ y el AC11¹ entre otros, los cuales demostraron ser capaces de estimular una respuesta de tipo Th1 por parte de las iNKT¹. Obtenidos estos resultados, se comprobó que AC11 fuese capaz de estimular las iNKT humanas, se estudió con más detalle la respuesta inmune generada por este compuesto y su diferencia con la α GC, demostrándose su actividad en algunos modelos tumorales. Con toda esta información previa, los estudios realizados en el presente documento se han focalizado en la evaluación del AC11 como tratamiento inmunoestimulador en un contexto similar al hallado al administrarlo a pacientes humanos y al estudio de su respuesta generada, haciendo especial énfasis en las diferencias de respuesta entre sexos dadas las características de este tratamiento, y se ha intentado corroborar si la respuesta generada por nuestro compuesto es específica contra antígenos tumorales.

5.1. AC11 es capaz de estimular una respuesta antitumoral específica

Como se puede observar en todos los modelos animales usados, la combinación de nuestro compuesto con antígenos tumorales mejora sustancialmente la efectividad del tratamiento inmunoestimulador tanto en los modelos de crecimiento tumoral como en los modelos de metástasis pulmonar. Este efecto se observa en ambos sexos en todos los modelos, con la única excepción del EG-7 en machos. El haber obtenido el mismo resultado en modelos tan diferentes conceptualmente es motivo para poder asegurar que este no es debido a un efecto estocástico, si no que se trata de una actividad que consistentemente es capaz de generar nuestro análogo combinado con antígenos tumorales, permitiendo al sistema inmune del animal controlar un tumor relativamente avanzado o incluso puede llegar a eliminar completamente el tumor, como se hace patente en el modelo de tumor intraperitoneal RMA.

Pese a que los resultados obtenidos son o similares o ligeramente peores que los obtenidos con el agonista prototípico, la tendencia de estos resultados es esperanzadora, debido a que AC11 es un compuesto que genera menor agotamiento que la α GC y no da las complicaciones que se pueden observar con el mismo¹.

Esto demuestra que es un gran candidato para combinarse con tratamientos clásicos para dar una respuesta antitumoral específica, pudiendo controlar el crecimiento tumoral y, en caso de conseguir eliminar el mismo, obtener una memoria inmunológica de forma que se pueda prevenir la aparición de un tumor secundario.

5.2. El potencial de AC11 como tratamiento a largo plazo

Tal y como se ha ido detallando en diversas ocasiones a lo largo de este documento, uno de los principales problemas de la α GC radica en el hecho que al estimular las iNKT de forma tan potente, genera una respuesta de tipo Th0²⁶⁴, la cual no es eficiente a largo plazo y además provoca un estado de anergia funcional en las iNKT²⁶⁶. Estos dos factores son los principales responsables de las limitaciones terapéuticas de este compuesto, hecho que ha llevado, entre otras líneas de investigación, al desarrollo de diversos compuestos análogos al α GC que sean capaces de evitar esta problemática, sintéticos o hallados en otros organismos^{1,76,120-122,273,274,279,283,298,302,304-306}.

En esta línea, AC11 ha demostrado en estudios anteriores ser capaz de desarrollar una respuesta antitumoral, desarrollar citotoxicidad contra células tumorales e inducir un nivel de anergia mucho menor¹. Asimismo, en los estudios realizados en este documento ha demostrado ser capaz de desarrollar una respuesta inmune específica y eficiente. Además, en los análisis de los modelos de metástasis pulmonares se observa que el efecto de nuestro tratamiento se sostiene a lo largo del tiempo, pudiendo llegarse a detectar hasta tres semanas después de su inoculación. La combinación de estos resultados hace de AC11 un gran candidato para desarrollar tratamientos a largo plazo, ya que la generación de una respuesta inmune específica y duradera conllevarían a un tratamiento más efectivo que no la inmunoestimulación inicial por si sola, y el menor grado de anergia funcional permitirían por un lado una mejor actuación de las iNKT y por otro el que estas puedan volver a ser estimuladas en un lapso más corto, en caso de ser necesario. Con estas evidencias se puede concluir que AC11 es un candidato para tratamientos a largo plazo tanto por la actividad antígeno específica como por la posibilidad de dar repetidas estimulaciones sin que estas pierdan excesiva eficacia.

5.3. AC11 es capaz de controlar el crecimiento tumoral en estadios avanzados de la enfermedad

Otra diferencia reseñable entre la actividad del agonista prototípico y nuestro análogo se puede visualizar en la cinética de crecimiento de los tumores al tratar a los animales con los distintos compuestos. Por un lado, la

α GC tiene una acción muy aguda, pero si esta actividad no es capaz de eliminar la colonia maligna, en cuanto finaliza este lapso de inflamación aguda, el tumor tiene una cinética de crecimiento similar a la observada con los animales sin tratar, como deduce incluso en los modelos en que este tratamiento ha aumentado claramente la supervivencia de los animales. Esta afirmación se extrae de que en la mayoría de modelos los efectos del tratamiento con α GC es desplazar la curva del crecimiento tumoral hacia la derecha, pero no varía la forma en que este crece por norma general.

En contraposición, AC11 ha demostrado ser capaz de generar una respuesta inmune sostenida a lo largo del tiempo. Esta afirmación se sustenta en el hecho que al combinarse con antígenos tumorales (ya sean antígenos expresados en la línea tumoral como el OVA o células tumorales apoptóticas) no tiene como único efecto el retraso en el inicio del crecimiento del tumor, además se puede observar como el tratamiento varía la cinética de crecimiento del mismo, viéndose como un tumor que con los demás tratamientos llega rápidamente al punto final, con AC11 + antígenos tumorales se mantiene con un crecimiento ralentizado hasta un punto muy avanzado (efecto observable principalmente en los modelos subcutáneos).

Este resultado lleva a la conclusión que la respuesta desarrollada tras el tratamiento con AC11 al combinarse con antígenos tumorales no solo es bastante eficiente, también es específica contra las células tumorales, motivo por el cual, a parte del estallido de actividad en el momento de inoculación del tratamiento, tenemos un efecto sostenido a lo largo del tiempo, motivo por el cual se pueden ver efectos del mismo semanas después del tratamiento.

5.4. La respuesta generada por AC11 a través de las iNKT es de tipo Th1

Ya se tenían evidencias previas de esta actividad al haber analizado la secreción de citocinas después del tratamiento con nuestro compuesto *in vitro*³⁰⁶ e *in vivo*¹. Pero, a estos resultados le podemos sumar el hecho de que AC11 por sí solo no ha sido efectivo en machos en ninguno de los modelos. Este hecho, combinado con el que en los ratones C57 BL/6 J la respuesta de IFN γ mediada por las iNKT es dependiente de estrógenos¹⁷ (hormona prácticamente ausente en los machos de esta cepa murina), es una prueba más que la respuesta inducida tras la estimulación de las iNKT es de tipo Th1 mediante IFN γ . Otra observación de efectos diferenciales entre machos y hembras que respalda dicha teoría se encuentra en como AC11 por sí solo es capaz de generar una respuesta en hembras en los modelos RMA, B16-F10-OVA subcutáneo e intravenoso y B16-F10 subcutáneo, mientras que en machos el tratamiento sin combinar con antígenos tumorales ha sido muy poco efectivo, con la excepción del modelo RMA, en el cual el tratamiento es inoculado en la misma

cavidad en la que crece el tumor donde la activación de las iNKT puede tener un efecto relevante independiente de IFN γ .

Por contra, la α GC por sí solo ha demostrado tener efecto en machos en el modelo RMA y en el EG-7, aunque en ningún caso llega a ser significativo. Visto esto, también hay que recalcar otra diferencia entre la actuación de ambos compuestos, viéndose como el agonista prototípico al combinarse con los diversos antígenos tumorales mejora su eficacia de forma similar en ambos sexos, mientras que AC11 mejora sustancialmente más su efecto en hembras, mientras que en machos o no mejora su eficacia (como en el caso de los modelos RMA y ambos modelos en los que se combina los tratamientos con antígeno liofilizado) o mejoran en menor medida la eficacia del tratamiento (en los modelos combinados con células apoptóticas). Una posible explicación de esta efectividad de la α GC en machos al combinarse con antígenos tumorales puede venir dada precisamente por esta falta de respuesta Th1 a través de IFN γ . Al estar ausente dicha actividad, también se evitan los mecanismos de inactivación de la respuesta Th2, mecanismos que son en parte responsables de la respuesta Th0 observada con el agonista prototípico para estimular las iNKT²⁶⁴. Esta combinación de factores puede permitir establecer una respuesta de tipo Th2 eficiente que, a pesar de no ser la respuesta adecuada para combatir el crecimiento de tumores sólidos, sí que es posible que pueda afectar a los mismos con la generación de anticuerpos específicos contra estos. En cambio, en el modelo RMA, como el tumor se genera en el lugar de la inmunoestimulación y además es un tumor en suspensión, podemos observar cómo en machos incluso el tratamiento con α GC por sí solo ya tiene un efecto, siendo el único modelo en el que se puede ver una actividad antitumoral de la α GC por sí solo a parte de los modelos intravenosos.

5.5. AC11 es capaz de generar respuesta citotóxica con una respuesta reducida a IFN γ

Con los resultados obtenidos, se denota que tanto cuantificando las poblaciones linfocitarias a día +4 post tratamiento como en los ensayos de respuesta antitumoral, AC11 ha demostrado tener actividad en ambos sexos. Hemos podido comprobar cómo se estimulan las iNKT en el lugar de inoculación tanto en machos como en hembras, y en dicho compartimento podemos observar actividad en ambos sexos. Pero, al analizar otros órganos del sistema inmune, vemos que la actividad de AC11 en machos es prácticamente inexistente, hecho que correlaciona con la disminución de la efectividad de nuestro análogo en machos.

Analizando la respuesta en machos, nuestros datos indican que se da principalmente a la activación de monocitos y células NK, las cuales se ven estimuladas únicamente en el lugar de inoculación, el peritoneo. Esto correlaciona con la observación que AC11 en machos solo tiene efecto sin combinarse con antígenos tumorales en el modelo de tumor intraperitoneal. Dicha actividad parece darse a pesar de la respuesta

reducida a IFN γ en machos, hecho que correlaciona con la evidencia hallada tras la depleción de las células NK, la cual implica una pérdida total de la actividad citotóxica del agonista prototípico, pero solo una pérdida parcial de la actividad de AC11¹. De esto se deduce que la actividad de nuestro agonista puede ser a través de otras vías que no impliquen la estimulación de células NK, motivo por el cual se sigue observando actividad en machos

5.6. El dimorfismo sexual es relevante en el estudio de la respuesta inmune

Durante mucho tiempo, los estudios de inmunoestimulación *in vivo* publicados han sido realizados en hembras, aunque generalmente el sexo en el que se realizan los ensayos no era más que un apunte en el apartado de material y métodos en caso de que los autores lo quisieran hacer constar. Pero, de un tiempo a esta parte se ha demostrado la importancia de dicho factor, el cual ha resultado ser muy relevante tal y como se ha demostrado tanto en la bibliografía como en el presente estudio. En el caso de nuestros ensayos, este factor ha demostrado ser relevante ya que la respuesta desarrollada después de la estimulación de las iNKT es significativamente distinta dependiendo del sexo¹⁷, e incluso la proporción relativa de esta población se ha visto que varía dependiendo del sexo en humanos³²⁵.

Este dimorfismo también es detectable en las células que efectuaran la respuesta sucesiva a las iNKT. Se ha observado que frente a infecciones víricas como HCMV y SARS-CoV-2, los machos desarrollan una patología más severa^{326,327}, a pesar de que presentan un mayor número de células NK. Este fenómeno puede ser debido a que las NK de machos desarrollan una respuesta disminuida a IFN γ por una regulación epigenética a través de UTX, gen ubicado en el cromosoma X que evade la inactivación aleatoria de uno de los cromosomas X en hembras para que ambos sexos tengan la misma dotación cromosómica³²⁸ y la expresión del cual está ligada a la sensibilidad de las células NK a IFN γ . Al tener una doble expresión de este gen, las hembras cuentan con unas células NK hipersensibles a esta citoquina, por lo que son capaces de desarrollar una respuesta más efectiva frente a infecciones al desarrollar una respuesta de tipo Th1³²⁹. Solo con estos datos ya se infiere que en la respuesta desarrollada por las iNKT el sexo puede ser un factor relevante dado que parte de su actividad se da mediante la liberación de IFN γ . Esta actividad se puede ver afectada por la producción de IFN γ ¹⁷, por la proporción de las iNKT³²⁵, por la sensibilidad de las demás células implicadas en la respuesta generada a las citoquinas producidas por las iNKT³²⁹ o por una combinación de todas estas diferencias.

En el caso de nuestro estudio, no hemos analizado las citoquinas secretadas después de la estimulación de las iNKT, pero se han analizado las poblaciones mayoritarias del sistema inmune. En dicho análisis, hemos podido observar el dimorfismo sexual de las iNKT, siendo una población más preponderante en hembras en el bazo y

que tras su estimulación tanto con el agonista prototípico como con AC11, estas aumentan su proporción en hembras mientras que no se modifican prácticamente sus porcentajes en machos. También hemos podido observar un mayor número de células NK y monocitos en machos después de la estimulación de las iNKT, efecto que solo se observa en el peritoneo. Ambas observaciones correlacionan perfectamente con los hallazgos observados por otros autores previamente comentados.

Debido a que compuesto AC11 estimula las iNKT a desarrollar una respuesta de tipo Th1, este tiene una actividad muy reducida en machos. La comprensión de este punto es de vital importancia tanto para comprender los resultados obtenidos en estos ensayos, como para la traslacionalidad de los mismos en humanos. En este caso no es un factor especialmente problemático en el apartado de la traslacionalidad, dado que en humanos ambos sexos producen una cantidad suficiente de estradiol como para que se den los procesos de estimulación de las iNKT de tipo Th1 mediados por IFN γ (al contrario de lo observado en los ratones C57 BL/6 J), pero aun así es un factor que a tener en cuenta en caso de usar este compuesto en humanos. A pesar de esto, si nuestro compuesto llega a ser administrado a humanos, sería relevante analizar los niveles de estradiol del paciente, y en caso de que este tuviese unos niveles bajos de dicha hormona, considerar el complementar el tratamiento inmunoestimulador con un tratamiento hormonal para que el primero fuese efectivo u optar por otros tratamientos que no viesan su eficacia ligada a esta.

5.7. Diferencias en los modelos de melanoma B16-F10

Tal y como se comenta en el apartado 3.1, entre las líneas tumorales murinas utilizadas en nuestros estudios se encuentran línea celular B16-F10 y una línea transfectada derivada que expresa OVA (B16-F10-OVA). Debido a que la segunda línea deriva de la primera y únicamente se seleccionó las células que incorporaron el gen de OVA, ambas deberían tener un comportamiento similar tanto en cultivo como en el desarrollo de la enfermedad. Durante la realización de los experimentos se detectó que en cultivo tenían unas dinámicas de crecimiento claramente distintas (presentando la línea B16-F10-OVA un crecimiento sensiblemente más lento que su línea parental), lo cual nos hizo sospechar que en animales con alta probabilidad presentan un comportamiento similar, esperándose un crecimiento más lento por parte de los tumores inducidos con la línea B16-F10-OVA. Para corroborar dicha hipótesis, se realizó un análisis de la inducción de la enfermedad con ambas líneas celulares, inoculando 500.000 células/animal utilizando los animales control a los que se había inducido el crecimiento de un tumor con cada una de las líneas (**Figura 25**).

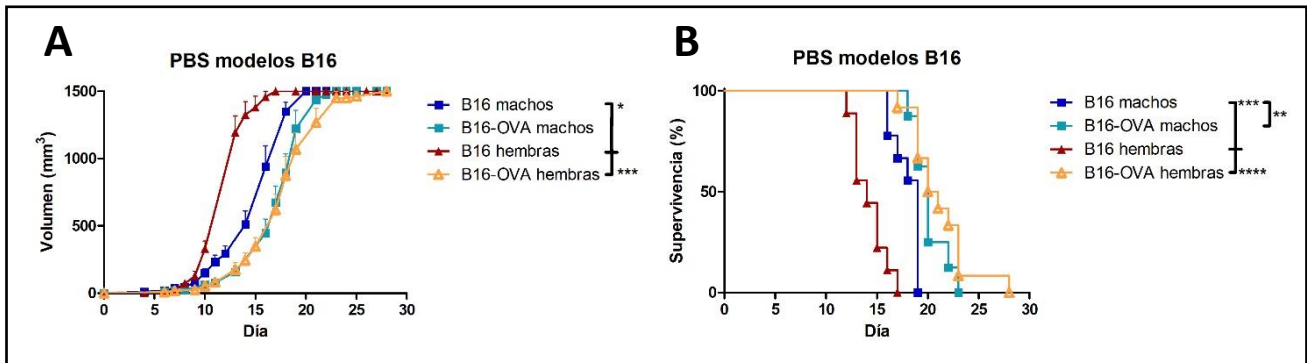


Figura 25: Comparativa de crecimiento de los modelos tumorales B16-F10 y B16-F10-OVA. Se muestra el pull de resultados de los grupos control de cada modelo, juntando los animales de los modelos B16-F10-OVA y B16-F10-OVA con células apoptóticas. Los datos del gráfico **A** muestran el volumen del tumor, con media \pm SEM. El gráfico **B** representa el porcentaje de animales que no han llegado al punto final cada día que se ha realizado el seguimiento. Datos extraídos de dos experimentos independientes de B16-F10 machos y de B16-F10 hembras; cuatro experimentos independientes de B16-F10-OVA machos; y cinco experimentos independientes de B16-F10-OVA hembras. Solo se muestran las diferencias estadísticas relevantes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. N B16-F10 machos=9, B16-F10-OVA machos=18, N B16-F10 hembras=10, N B16-F10-OVA hembras=21.

Tal y como se podía sospechar de las observaciones realizadas *in vitro*, los modelos B16 y B16-OVA tienen una dinámica de crecimiento diferente, teniendo el modelo transfectado una curva de crecimiento desplazada hacia la derecha, lo cual correlaciona con la observación realizada anteriormente *in vitro*. Además, esta comparativa también revela una diferencia notable en cómo reaccionan frente a este tumor los diferentes sexos. Como se puede observar, donde se ve más diferencias entre ambos es en el modelo B16-F10, en el cual las hembras llegan al punto final significativamente antes que los machos, mientras que con el modelo que expresa OVA las diferencias no son significativas ni en el volumen (**Figura 25 A**) ni en la supervivencia (**Figura 25 B**) entre sexos. Con esto, se puede especular que la diferencia de comportamiento del tumor entre sexos puede venir determinada por la velocidad de crecimiento, siendo los más rápidos los que muestran una diferencia mayor entre sexos (controlados ligeramente mejor por los machos), mientras que los que crecen con una cinética más lenta son controlados de forma similar por ambos sexos. Esta hipótesis se ve respaldada tanto por el hecho de que el B16 difiere mucho entre los sexos mientras que los OVA no; como en que la mayor diferencia entre el modelo con y sin OVA sea precisamente en las hembras, sexo en el que el modelo B16 crece de forma más agresiva. La diferencia en la respuesta frente a los tumores puede ser consecuencia de los perfiles de respuesta predominante que muestran cada sexo. Se ha reportado que en el cáncer colorrectal las hembras presentan una mayor infiltración de T CD8⁺ y CD4⁺, mientras que en los machos hay un mayor incremento de citoquinas inflamatorias³³⁰. De estos resultados se extrae a su vez que el modelo ideal para hacer una comparativa de la respuesta antitumoral mediada por nuestro compuesto entre ambos sexos es el B16-OVA, dado que es el modelo que presenta un dimorfismo sexual menor. Por este motivo, las diferencias detectables serán debidas en su mayor parte a los efectos de los tratamientos en ambos sexos y no debidas a la diferente respuesta de los sexos frente al tumor en sí, a pesar de que se debería hacer una transformación dado que, aunque similares, no cursan exactamente de la misma forma.

5.8. AC11 tiene un efecto más consistente y específico en modelos de melanoma subcutáneo

Con las observaciones realizadas en el apartado 5.7., podemos deducir que la comparativa directa entre los efectos de los tratamientos no es viable, dado el dimorfismo sexual y a su vez hay un efecto dependiente del modelo muy elevado. Por este motivo, para poder determinar las diferencias entre los efectos de los distintos tratamientos, se ha realizado una normalización respecto a sus respectivos grupos controles, para poder así valorar la diferencia que supone cada tratamiento respecto a su control, minimizando así la variabilidad que se introduce con los propios modelos (**Figura 26**). Debido a que los tratamientos simples son exactamente iguales en los modelos B16-OVA y B16-OVA con células tumorales apoptóticas, se ha unido los datos de los animales de ambos modelos para realizar el análisis.

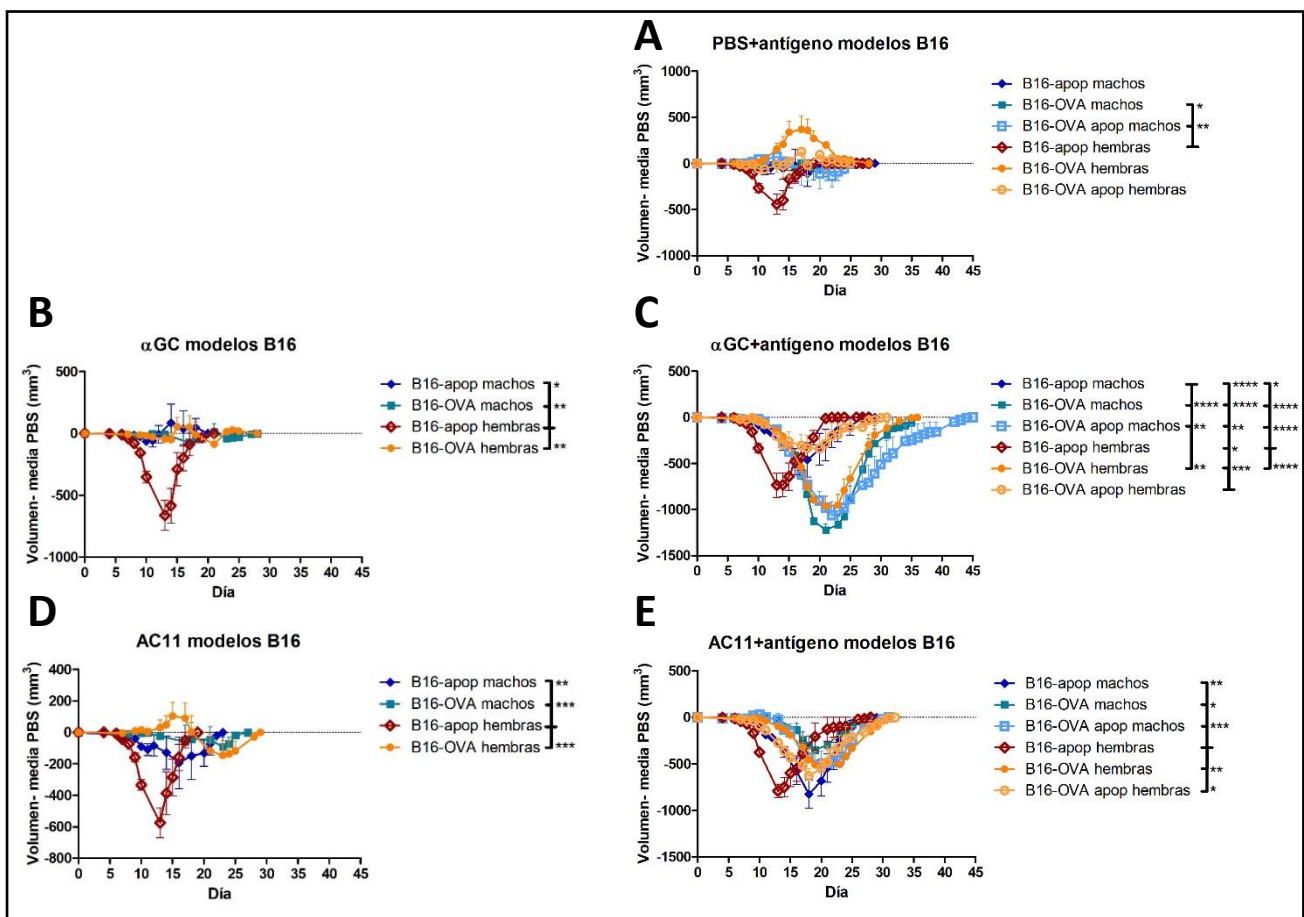


Figura 26: Análisis del efecto de los tratamientos dependiendo de sexo y de modelo. Se muestra el efecto de los tratamientos normalizados por la evolución de su respectivo control, restando a el valor de cada animal la media del control en esa misma medición. En el caso de los tratamientos simples (α GC y AC11), se han puesto en conjunto los resultados de los modelos B16-OVA y B16-OVA con células apoptóticas, dado que estos tratamientos son idénticos. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

En primer lugar, se puede observar que los tratamientos únicamente con antígenos no presentan excesiva efectividad (**Figura 26 A**), encontrándose solo una diferencia entre las B16-apop hembras y los modelos B16-

OVA de machos, pero no con su tratamiento homólogo en machos ni con los otros tratamientos en hembras. Además, vemos que se alejan relativamente poco de la media de sus controles, por lo que se puede deducir que estos tratamientos tienen un efecto leve (si es que lo tienen), y sobre todo es bastante estable entre los sexos.

En cuanto al tratamiento con α GC (**Figura 26 B**), solo se observa efectos en las hembras del modelo B16-F10-apop. Esto es indicativo que el tratamiento únicamente con α GC no es especialmente eficaz, dado que solo ha tenido efecto en el mismo modelo en el que ha habido un efecto del tratamiento únicamente con antígenos. En los demás modelos, en ningún momento se separan claramente del 0 (implicando que cursan similarmente a sus controles), y tal y como veníamos viendo en el análisis de los modelos individualizados. También se observa que el efecto de este tratamiento solo es detectable en etapas tempranas del crecimiento tumoral y no se sostiene a lo largo del tiempo, es un efecto agudo. En comparación, con el tratamiento inoculando AC11 (**Figura 26 D**) podemos observar que a nivel de diferencias estadísticas, los resultados son exactamente los mismos que con la α GC, aumentando las significancias, pero analizando los datos con más detalle se puede denotar cómo en todos los modelos ha conseguido que en algún momento tengan un volumen tumoral claramente menor al de los controles, e incluso se puede ver como en los modelos B16-F10-OVA con hembras, en cierto punto estaban con un volumen mayor al de los controles, y después fueron capaces de controlar el crecimiento tumoral, cruzando el eje que representa la media de volumen de los controles. Además, el efecto es sostenido en el tiempo, tal y como lo indica la cantidad de días que se pasan los animales tratados con AC11 con un volumen menor que el de los controles. Además, el efecto del tratamiento se da en un momento más avanzado en el tiempo, lo cual correlaciona con que la respuesta generada sea específica, en lugar de una respuesta debida a una inflamación generalizada puntual.

Pasando al tratamiento inmunoestimulador clásico combinado con antígenos tumorales (**Figura 26 C**) se puede visualizar como claramente ha sido un tratamiento eficaz en todos los modelos, agrupándose los datos en 3 bloques diferenciables. Por un lado, vemos que B16-OVA, B16-OVA-apop en machos y B16-OVA en hembras se diferencian de sus controles de una forma idéntica, siendo los grupos en los que ha habido mayor efecto. Por otro lado, tenemos los B16-apop de machos y B16-OVA-apop de hembras en los que se ve un efecto más ligero, iniciando de forma similar a los tres modelos anteriores, pero al llegar a la diferencia aproximada de 500mm³ dejan de ser efectivos y vuelven a acercarse a sus respectivos controles hasta el punto final. Por último, el B16-F10-apop en hembras que tiene un efecto intermedio entre los dos grupos a nivel de intensidad, pero cuyo efecto se da unos 5-10 días antes que los demás.

Por último, los tratamientos con AC11 + antígenos tumorales (**Figura 26 E**) se puede ver que tienen un efecto mucho más consistente, aunque se observan diferencias significativas de todos los grupos respecto al modelo B16-apop en hembras, esta diferencia es debida a que el efecto del tratamiento es observable unos días antes,

pero tanto la amplitud de la diferencia respecto a los controles como la forma en la que se diferencian los diversos tratamientos respecto a sus controles son muy similares. De esto se extrae que el efecto de AC11 combinado con antígenos tumorales ha sido mucho más consistente que el observado con el agonista prototípico.

Con todas estas observaciones en conjunto, podemos concluir por un lado que el tratamiento con α GC no ha sido muy efectivo, con la excepción de esta desviación que se ha introducido en las hembras del modelo B16-apop, que parecen ser debidas más a un empeoramiento agudo de sus controles (como es observable en la **Figura 25**), pero que a parte de ese pico no tiene ningún efecto significativo. En cambio, AC11 tiene un efecto leve pero más consistente entre modelos. En cuanto a los tratamientos combinados, con el estimulador tradicional de las iNKT se pueden llegar a observar tanto diferencias entre sexos como entre las diversas formas de proveer los distintos antígenos tumorales, mientras que con AC11 la respuesta es mucho más consistente y no depende del modelo usado. De esto se desprende que AC11 genera una respuesta antitumoral mucho más específica y que no se ve tan modulada por la forma en la que se proveen los distintos antígenos tumorales, mientras que la α GC, al generar una respuesta más inespecífica, sí que es más sensible a diferentes factores como la forma de proveer los antígenos.

5.9. El efecto pernicioso de la α GC que no se observa en ningún caso con AC11

Como se ha podido observar, los tratamientos inmunoestimuladores de las iNKT por si solos pueden tener un efecto leve o ningún efecto sobre el crecimiento tumoral, en todos los modelos tumorales en ambos sexos. Pero, con el tratamiento con α GC hemos hallado un efecto cuanto menos curioso. En el modelo EG-7, las hembras tratadas con el agonista prototípico únicamente no solo no mejoran el curso de la enfermedad, si no que cursan una patología notablemente más agresiva (**Figura 16 E**) y llegan al punto final significativamente antes (**Figura 16 F**). Este resultado puede tener una explicación basándonos en las evidencias bibliográficas y las características del tumor. Por un lado, sabemos que la α GC, a parte de estimular de una forma muy eficiente a las iNKT, las lleva a desarrollar una respuesta tanto Th1 como Th2 o Th17, dando la respuesta denominada como Th0 y a una anergia funcional de las mismas²⁶⁴. Además, sabemos que este efecto debe ser más notorio en hembras, ya que como se ha denotado anteriormente, en machos la respuesta de IFN γ mediada por iNKT se ve claramente disminuida¹⁷ y la respuesta de las células receptoras de dicho estímulo también está reducida en machos^{326,327,329}. Esto, combinado con el hecho que el tumor EG-7 se ha implantado en un compartimento distinto al lugar de inoculación del tratamiento hace de este modelo un candidato para ser sensible a este efecto.

El otro modelo de linfoma subcutáneo es el EL-4, y en este también parece que la α GC por sí solo tiene un efecto perjudicial sobre el crecimiento tumoral, aunque en este caso al no ser tan acusado no llega a ser significativo (**Figura 15**), además que este modelo solo se ha podido probar en machos, sexo en el cual el efecto contraproducente del tratamiento clásico debería ser menos acusado por las evidencias bibliográficas mentadas. El otro modelo de linfoma utilizado, el RMA (**Figura 10**), al ser intraperitoneal puede ser más sensible al estallido inflamatorio generado por la α GC tras su inoculación, enmascarando así el efecto de esta anergia funcional que parece notorio en los modelos de linfoma. En los modelos de mieloma no se observa este efecto perjudicial del tratamiento, pero puede ser debido que al ser tumores que crecen sensiblemente más rápido sea imposible ver estas diferencias de efectos.

Remarcar también que en cuanto el tratamiento tradicional se administra junto antígenos tumorales, ya sea OVA o células tumorales apoptóticas, cualquier tendencia perniciosa del mismo se revierte. La explicación más plausible es que al tener antígenos contra los que desarrollar una respuesta inmune, a pesar de acabar con una anergia funcional de las iNKT el efecto inicial de la gran estimulación de las iNKT, aunque inespecífica, sea suficiente para que los otros compartimientos del sistema inmune actúen frente a dicho antígeno, enmascarando así el efecto pernicioso observado.

Aunque esta explicación no es más que una elucubración basada en los hechos mostrados en nuestros experimentos y las evidencias bibliográficas, estos resultados evidencian que la α GC puede tener un efecto adverso por sí solo, mientras que nuestro compuesto, al inducir una respuesta más específica, en ningún modelo ha llegado a mostrar un efecto negativo en el desarrollo de la enfermedad, solo ha tenido efectos neutros o positivos, postulándolo así como un compuesto mucho más seguro que el tradicional.

5.10. Comparativa de AC11 con los análogos XZ

A lo largo de la elaboración de esta tesis, a parte del análogo aminociclitol AC11, también se ha tenido la oportunidad de analizar la actividad de los análogos tioglicosilados denominados XZ, los cuales derivan del α -S-galactosilceramida. A pesar de haberse probado en condiciones similares (inoculación intraperitoneal en hembras y extracción a día +4 de órganos para su posterior análisis por citometría de flujo), al haberse analizado con distintos paneles de marcaje y distintos citómetros se ha decidido no hacer una comparativa directa entre ellos con el objeto de no introducir desviación debido a factores no derivados de la actuación de los compuestos. El único análogo de esta batería de compuestos con una actividad significativa es XZ11. Este compuesto, a 500ng (una concentración 5 veces mayor que la utilizada con AC11) solo ha sido capaz de estimular ligeramente las iNKT de bazo y aún de forma más sutil en el peritoneo, generando estas un leve

aumento de las NK peritoneales y de los monocitos con fenotipo inflamatorio. Cuando aumentamos la concentración de este compuesto hasta 2µg, se vio un aumento claro de las iNKT en bazo y peritoneo, un aumento de las NK del peritoneo y un fenotipo inflamatorio de los monocitos en el peritoneo.

Comparativamente vemos que AC11, con 100ng (una dosis 5 o 20 veces menor que la testada con los análogos XZ) ha estimulado de forma notoria las iNKT especialmente en el peritoneo (aunque no se obtiene diferencias significativas debido a que el agonista prototípico las ha estimulado de forma aún más significativa) y sobre todo que este tratamiento en hembras, a parte de estimular las células de la respuesta innata como son monocitos, también estimula los linfocitos T CD8+ en el nódulo linfático. También estimula las NK, pero tal y como se demostró en estudios previos de nuestro laboratorio, la depleción de esta población no implica una pérdida total de la actividad de nuestro compuesto¹.

Por lo que, a falta de testar los análogos XZ para ver su capacidad de inducción de una respuesta antitumoral, en comparación a AC11, estos análogos requieren para inducir una respuesta de las iNKT detectable una dosis 20 veces mayor y esta conlleva una menor activación de otros compartimentos del sistema inmune. Estas evidencias nos permiten afirmar que AC11 es más eficiente al estimular las iNKT con una dosis mucho menor, y a su vez es capaz de generar una respuesta más eficaz al verse una estimulación a consecuencia de la actividad de las iNKT hacia células de la respuesta inmune adaptativa. Dados estos resultados también podemos afirmar que probablemente AC11 genera una mejor respuesta antitumoral que los análogos XZ.

6. Conclusiones

Con todos los resultados expuestos en esta tesis, se llega a las siguientes conclusiones:

1. AC11 genera una respuesta antitumoral específica al administrarlo junto a antígenos tumorales.
2. Una reducida respuesta a IFN γ implica una pérdida parcial de la actividad de nuestro análogo, dificultando la respuesta Th1 característica de AC11.
3. AC11 permite controlar el crecimiento tumoral en estadios avanzados de la enfermedad.
4. El dimorfismo sexual frente al AC11 es relevante, y a futuro se debe tener en cuenta para el desarrollo de terapias inmunoestimuladoras efectivas, combinándolas con tratamientos hormonales para paliar estos efectos de ser necesario.
5. AC11 estimula a las iNKT de forma muy eficiente en comparación a otros análogos de la α GC como los análogos XZ.
6. Un tratamiento inmunoestimulador que caracterizado por una respuesta genérica como la α GC es más sensible a la forma de vehiculación de los antígenos que un tratamiento específico como el AC11.
7. Las diferencias entre modelos tumorales que clásicamente se han asumido como homólogos pueden ser relevantes, por lo que es especialmente relevante analizar los mismos para poder hacer una comparación correcta entre estos.
8. AC11 no ha demostrado tener ningún efecto contraproducente, mientras que el agonista prototípico ha mostrado que sin combinar con antígenos en algunas condiciones puede llegar a favorecer el curso de una patología más acusada en comparación al curso de esta en animales sin tratar.
9. Nuestro compuesto es un buen candidato para tratamientos a largo plazo debido tanto al desarrollo de una respuesta exclusivamente Th1 como a su capacidad de generar una respuesta inmune específica. Estas evidencias combinadas con el mayor grado de seguridad mostrado por el mismo hacen del AC11 un buen candidato para el desarrollo de terapias inmunoestimuladoras, pudiéndose combinar con un tratamiento clásico en pacientes oncológicos.

7. Bibliografía

1. Esteban, I. Ignasi Esteban Riera. (Universidad Autónoma de Barcelona, 2017).
2. Terabe, M. & Berzofsky, J. A. Tissue-specific roles of NKT cells in tumor immunity. *Front Immunol* **9**, 1–11 (2018).
3. Bendelac, A., Savage, P. B. & Teyton, L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* **25**, 297–336 (2006).
4. Godfrey, D. I., MacDonald, H. R., Kronenberg, M., Smyth, M. J. & van Kaer, L. NKT cells: What's in a name? *Nat Rev Immunol* **4**, 231–237 (2004).
5. Stetson, D. B. *et al.* Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function. *Journal of Experimental Medicine* **198**, 1069–1076 (2003).
6. Kawano, T. *et al.* CD1d-restricted and TCR-mediated activation of V(α)14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* **278**, 1626–1629 (1997).
7. Zajonc, D. M. *et al.* Structural basis for CD1d presentation of a sulfatide derived from myelin and its implications for autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine* **202**, 1517–1526 (2005).
8. Cardell, S. *et al.* CD1-restricted CD4⁺ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine* **182**, 993–1004 (1995).
9. Farr, A. R., Wu, W., Choi, B., Cavalcoli, J. D. & Laouar, Y. CD1d-unrestricted NKT cells are endowed with a hybrid function far superior than that of iNKT cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 12841–12846 (2014).
10. Matsuda, J. L. *et al.* Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *Journal of Experimental Medicine* **192**, 741–753 (2000).
11. Benlagha, K., Weiss, A., Beavis, A., Teyton, L. & Bendelac, A. In vivo identification of glycolipid antigen-specific T cells using fluorescent CD1d tetramers. *Journal of Experimental Medicine* **191**, 1895–1903 (2000).
12. Cianferoni, A. Invariant Natural Killer T Cells. *Antibodies* **3**, 16–36 (2013).
13. Nguyen, K. D., Vanichsarn, C. & Nadeau, K. C. Increased cytotoxicity of CD4⁺ invariant NKT cells against CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo}/⁻ regulatory T cells in allergic asthma. *Eur J Immunol* **38**, 2034–2045 (2008).
14. Pellicci, D. G. *et al.* Differential Recognition of CD1d- α -Galactosyl Ceramide by the V β 8.2 and V β 7 Semi-invariant NKT T Cell Receptors. *Immunity* **31**, 47–59 (2009).

15. Esteban, L. M. *et al.* Genetic Control of NKT Cell Numbers Maps to Major Diabetes and Lupus Loci. *The Journal of Immunology* **171**, 2873–2878 (2003).
16. Sandberg, J. K., Bhardwaj, N. & Nixon, D. F. Dominant effector memory characteristics, capacity for dynamic adaptive expansion, and sex bias in the innate V α 24 NKT cell compartment. *Eur J Immunol* **33**, 588–596 (2003).
17. Gourdy, P. *et al.* Relevance of sexual dimorphism to regulatory T cells: Estradiol promotes IFN- γ production by invariant natural killer T cells. *Blood* **105**, 2415–2420 (2005).
18. Sandberg, J. K. & Ljunggren, H. G. Development and function of CD1d-restricted NKT cells: Influence of sphingolipids, SAP and sex. *Trends Immunol* **26**, 347–349 (2005).
19. Borowski, C. & Bendelac, A. Signaling for NKT cell development: The SAP-FynT connection. *Journal of Experimental Medicine* **201**, 833–836 (2005).
20. Dao, T. *et al.* Development of CD1d-restricted NKT cells in the mouse thymus. *Eur J Immunol* **34**, 3542–3552 (2004).
21. Facciotti, F. *et al.* Peroxisome-derived lipids are self antigens that stimulate invariant natural killer T cells in the thymus. *Nat Immunol* **13**, 474–480 (2012).
22. Seiler, M. P. *et al.* Elevated and sustained Egr1 and Egr2 expression controls NKT lineage differentiation in response to TCR signaling. *Nat Immunol* **13**, 264–271 (2012).
23. Nichols, K. E. *et al.* Regulation of NKT cell development by SAP, the protein defective in XLP. *Nat Med* **11**, 340–345 (2005).
24. Gadue, P., Morton, N. & Stein, P. L. The Src family tyrosine kinase Fyn regulates natural killer T cell development. *Journal of Experimental Medicine* **190**, 1189–1195 (1999).
25. Godfrey, D. I., Stankovic, S. & Baxter, A. G. Raising the NKT cell family. *Nat Immunol* **11**, 197–206 (2010).
26. Pellicci, D. G. *et al.* A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1-CD4⁺ CD1d-dependent precursor stage. *J. Exp. Med* **195**, 835–844 (2002).
27. Lee, Y. J. *et al.* Tissue specific distribution of iNKT cells impacts their cytokine response. *Immunity* **43**, 566–578 (2015).
28. Buechel, H. M., Stradner, M. H. & D’Cruz^a, L. M. Stages versus subsets: Invariant Natural Killer T cell lineage differentiation. *Cytokine* **72**, 204–209 (2015).

29. Benlagha, K., Kyin, T., Beavis, A., Teyton, L. & Bendelac, A. A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science* **296**, 553–555 (2002).
30. Hogquist, K. & Georgiev, H. Recent advances in iNKT cell development. *F1000Res* **9**, 1–10 (2020).
31. Watarai, H. *et al.* Development and function of invariant natural killer T cells producing T H2- and T H17-cytokines. *PLoS Biol* **10**, (2012).
32. Constantinides, M. G. & Bendelac, A. Transcriptional regulation of the NKT cell lineage. *Curr Opin Immunol* **25**, 161–167 (2013).
33. Dashtsoodol, N. *et al.* Alternative pathway for the development of V α 14+ NKT cells directly from CD4-CD8- thymocytes that bypasses the CD4+ CD8+ stage. *Nat Immunol* **18**, 274–282 (2017).
34. Wang, H. & Hogquist, K. A. CCR7 defines a precursor for murine iNKT cells in thymus and periphery. *Elife* **13**, 1–20 (2018).
35. Lee, Y. J. *et al.* Lineage-Specific Effector Signatures of Invariant NKT Cells Are Shared amongst $\gamma\delta$ T, Innate Lymphoid, and Th Cells. *The Journal of Immunology* **197**, 1460–1470 (2016).
36. Tuttle, K. D. *et al.* TCR signal strength controls thymic differentiation of iNKT cell subsets. *Nat Commun* **9**, (2018).
37. Zhao, M. *et al.* Altered thymic differentiation and modulation of arthritis by invariant NKT cells expressing mutant ZAP70. *Nat Commun* **9**, (2018).
38. McNab, F. W. *et al.* The Influence of CD1d in Postselection NKT Cell Maturation and Homeostasis. *The Journal of Immunology* **175**, 3762–3768 (2005).
39. Barral, P., Sánchez-Nieo, M. D., van Rooijen, N., Cerundolo, V. & Batista, F. D. The location of splenic NKT cells favours their rapid activation by blood-borne antigen. *EMBO Journal* **31**, 2378–2390 (2012).
40. Thomas, S. Y. *et al.* PLZF induces an intravascular surveillance program mediated by long-lived LFA-1-ICAM-1 interactions. *Journal of Experimental Medicine* **208**, 1179–1188 (2011).
41. Lee, W. Y. *et al.* An intravascular immune response to *Borrelia burgdorferi* involves Kupffer cells and iNKT cells. *Nat Immunol* **11**, 295–302 (2010).
42. Gumperz, J. E., Miyake, S., Yamamura, T. & Brenner, M. B. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *Journal of Experimental Medicine* **195**, 625–636 (2002).

43. O'Reilly, V. *et al.* Distinct and overlapping effector functions of expanded human CD4 +, cd8 α + and CD4 -CD8 α - invariant natural killer T cells. *PLoS One* **6**, (2011).
44. Matsuda, J. L. *et al.* Homeostasis of V α 14i NKT cells. *Nat Immunol* **3**, 966–974 (2002).
45. Coquet, J. M. *et al.* Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. *PNAS* **105**, 11287–11292 (2008).
46. Terashima, A. *et al.* A novel subset of mouse NKT cells bearing the IL-17 receptor B responds to IL-25 and contributes to airway hyperreactivity. *Journal of Experimental Medicine* **205**, 2727–2733 (2008).
47. Michel, M. L. *et al.* Identification of an IL-17-producing NK1.1neg iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *Journal of Experimental Medicine* **204**, 995–1001 (2007).
48. Michel, M. L. *et al.* Critical role of ROR- γ t in a new thymic pathway leading to IL-17-producing invariant NKT cell differentiation. *PNAS* **105**, 19845–19850 (2008).
49. Terabe, M. *et al.* A nonclassical non-V α 14J α 18 CD1d-restricted (type II) NKT cell is sufficient for down-regulation of tumor immunosurveillance. *Journal of Experimental Medicine* **202**, 1627–1633 (2005).
50. Singh, A. K., Tripathi, P. & Cardell, S. L. Type II NKT Cells: An Elusive Population With Immunoregulatory Properties. *Front Immunol* **9**, 1969 (2018).
51. Macho-Fernandez, E. & Brigl, M. The extended family of CD1d-restricted NKT cells: Sifting through a mixed bag of TCRs, antigens, and functions. *Front Immunol* **6**, (2015).
52. Jahng, A. *et al.* Prevention of Autoimmunity by Targeting a Distinct, Noninvariant CD1d-reactive T Cell Population Reactive to Sulfatide. *Journal of Experimental Medicine* **199**, 947–957 (2004).
53. Dasgupta, S. & Kumar, V. Type II NKT cells: a distinct CD1d-restricted immune regulatory NKT cell subset. *Immunogenetics* **68**, 665–676 (2016).
54. Nishioka, Y., Masuda, S., Tomaru, U. & Ishizu, A. CD1d-restricted type II NKT cells reactive with endogenous hydrophobic peptides. *Front Immunol* **9**, (2018).
55. Arrenberg, P., Halder, R., Dai, Y., Maricic, I. & Kumar, V. Oligoclonality and innate-like features in the TCR repertoire of type II NKT cells reactive to a β -linked self-glycolipid. *PNAS* **107**, 10984–10989 (2010).
56. Shamshiev, A. *et al.* Self glycolipids as T-cell autoantigens. *Eur J Immunol* **29**, 1667–1675 (1999).
57. Buschard, K., Blomqvist, M., Osterbye, T. & Fredman, P. Involvement of sulfatide in beta cells and type 1 and type 2 diabetes. *Diabetologia* **48**, 1957–1962 (2005).

58. Fuss, I. J. *et al.* IL-13R α 2-bearing, type II NKT cells reactive to sulfatide self-antigen populate the mucosa of ulcerative colitis. *Gut* **63**, 1728–1736 (2014).
59. Tatituri, R. V. V. *et al.* Recognition of microbial and mammalian phospholipid antigens by NKT cells with diverse TCRs. *PNAS* **110**, 1827–1832 (2013).
60. Kato, S., Berzofsky, J. A. & Terabe, M. Possible therapeutic application of targeting type II natural killer T cell-mediated suppression of tumor immunity. *Front Immunol* **9**, (2018).
61. Lawton, A. P. & Kronenberg, M. The third way: Progress on pathways of antigen processing and presentation by CD1. *Immunol Cell Biol* **82**, 295–306 (2004).
62. Castaño, A. R. *et al.* Peptide Binding and Presentation by Mouse CD1d. **269**, 6–10 (1995).
63. Zeng, Z. H. *et al.* Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. *Science* **277**, 339–345 (1997).
64. Rossjohn, J., Pellicci, D. G., Patel, O., Gapin, L. & Godfrey, D. I. Recognition of CD1d-restricted antigens by natural killer T cells. *Nat Rev Immunol* **12**, (2012).
65. Moody, D. B., Zajonc, D. M. & Wilson, I. A. Anatomy of CD1-lipid antigen complexes. *Nat Rev Immunol* **5**, 387–399 (2005).
66. Han, M., Hannick, L. I., DiBrino, M. & Robinson, M. A. Polymorphism of human CD1 genes. *Tissue Antigens* **54**, 122–127 (1999).
67. Canchis, P. W. *et al.* Tissue distribution of the non-polymorphic major histocompatibility complex class I-like molecule, CD1d. *Immunology* **80**, 561–5 (1993).
68. Mandal, M. *et al.* Tissue distribution, regulation and intracellular localization of murine CD1 molecules. *Mol Immunol* **35**, 525–536 (1998).
69. Olszak, T. *et al.* Protective mucosal immunity mediated by epithelial CD1d and IL-10. *Nature* **509**, 497–502 (2014).
70. Im, J. S. *et al.* Expression of CD1d Molecules by Human Schwann Cells and Potential Interactions with Immunoregulatory Invariant NK T Cells. *The Journal of Immunology* **177**, 5226–5235 (2006).
71. Kenna, T. *et al.* CD1 expression and CD1-restricted T cell activity in normal and tumour-bearing human liver. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **56**, 563–572 (2007).
72. Sonoda, K. H. & Stein-Streilein, J. CD1d on antigen-transporting APC and splenic marginal zone B cells promotes NKT cell-dependent tolerance. *Eur J Immunol* **32**, 848–857 (2002).

73. Allan, L. L. *et al.* Apolipoprotein-mediated lipid antigen presentation in B cells provides a pathway for innate help by NKT cells. *Blood* **114**, 2411–2416 (2009).
74. Barral, D. C. & Brenner, M. B. CD1 antigen presentation: How it works. *Nat Rev Immunol* **7**, 929–941 (2007).
75. Barral, P. *et al.* B cell receptor-mediated uptake of CD1d-restricted antigen augments antibody responses by recruiting invariant NKT cell help in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 8345–8350 (2008).
76. Im, J. S. *et al.* Kinetics and Cellular Site of Glycolipid Loading Control the Outcome of Natural Killer T Cell Activation. *Immunity* **30**, 888–898 (2009).
77. Matulis, G. *et al.* Innate-like control of human iNKT cell autoreactivity via the hypervariable CDR3 β loop. *PLoS Biol* **8**, (2010).
78. Brigl, M. & Brenner, M. B. CD1: Antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol* **22**, 817–890 (2004).
79. Joyce, S. *et al.* Adaptability of the semi-invariant natural killer T-cell receptor towards structurally diverse CD1d-restricted ligands. *EMBO Journal* **28**, 3579–3590 (2009).
80. Adams, E. J. & López-Sagasetta, J. The immutable recognition of CD1d. *Immunity* **34**, 281–283 (2011).
81. Gadola, S. D. *et al.* Structure and binding kinetics of three different human CD1d- α -galactosylceramide-specific T cell receptors. *Journal of Experimental Medicine* **203**, 699–710 (2006).
82. Patel, O. *et al.* V β 2 natural killer T cell antigen receptor-mediated recognition of CD1d-glycolipid antigen. *PNAS* **108**, 19007–19012 (2011).
83. Bai, L. *et al.* Lysosomal recycling terminates CD1d-mediated presentation of short and polyunsaturated variants of the NKT cell lipid antigen α GalCer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 10254–10259 (2009).
84. Borg, N. A. *et al.* CD1d-lipid-antigen recognition by the semi-invariant NKT T-cell receptor. *Nature* **448**, 44–49 (2007).
85. Sullivan, B. A. *et al.* Mechanisms for glycolipid antigen-driven cytokine polarization by Valpha14i NKT cells. **184**, 141–153 (2010).
86. Oki, S., Chiba, A., Yamamura, T. & Miyake, S. The clinical implication and molecular mechanism of preferential IL-4 production by modified glycolipid-stimulated NKT cells. *Journal of Clinical Investigation* **113**, 1631–1640 (2004).

87. McCarthy, C. *et al.* The length of lipids bound to human CD1d molecules modulates the affinity of NKT cell TCR and the threshold of NKT cell activation. *Journal of Experimental Medicine* **204**, 1131–1144 (2007).
88. Brennan, P. J., Brigl, M. & Brenner, M. B. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol* **13**, (2013).
89. Salio, M. *et al.* Modulation of human natural killer T cell ligands on TLR-mediated antigen-presenting cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 20490–20495 (2007).
90. Brigl, M., Bry, L., Kent, S. C., Gumperz, J. E. & Brenner, M. B. Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat Immunol* **4**, 1230–1237 (2003).
91. Kinjo, Y. *et al.* Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nat Immunol* **7**, 978–986 (2006).
92. Kinjo, Y. *et al.* Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria. *Nat Immunol* **12**, 966–974 (2011).
93. Wu, D. Y., Segal, N. H., Sidobre, S., Kronenberg, M. & Chapman, P. B. Cross-presentation of disialoganglioside GD3 to natural killer T cells. *Journal of Experimental Medicine* **198**, 173–181 (2003).
94. Paget, C. *et al.* Activation of Invariant NKT Cells by Toll-like Receptor 9-Stimulated Dendritic Cells Requires Type I Interferon and Charged Glycosphingolipids. *Immunity* **27**, 597–609 (2007).
95. Zhou, D. *et al.* Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* **306**, 1786–1789 (2004).
96. Brennan, P. J. *et al.* Invariant natural killer T cells recognize lipid self antigen induced by microbial danger signals. *Nat Immunol* **12**, 1202–1211 (2011).
97. Muindi, K. *et al.* Activation state and intracellular trafficking contribute to the repertoire of endogenous glycosphingolipids presented by CD1d. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 3052–3057 (2010).
98. Haig, N. A. *et al.* Identification of self-lipids presented by CD1c and CD1d proteins. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 37692–37701 (2011).
99. Yuan, W., Kang, S.-J., Evans, J. E. & Cresswell, P. Natural lipid ligands associated with human CD1d targeted to different subcellular compartments. *Journal of Immunology* **182**, 4787–4791 (2009).
100. Cox, D. *et al.* Determination of Cellular Lipids Bound to Human CD1d Molecules. *PLoS One* **4**, (2009).
101. Stanic, A. K. *et al.* Defective presentation of the CD1d1-restricted natural Va14Ja18 NKT lymphocyte antigen caused by β -D-glucosylceramide synthase deficiency. *PNAS* **100**, 1849–1854 (2003).

102. Kitamura, H. *et al.* The natural killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *Journal of Experimental Medicine* **189**, 1121–1128 (1999).
103. Brigl, M. & Brenner, M. B. How invariant natural killer T cells respond to infection by recognizing microbial or endogenous lipid antigens. *Semin Immunol* **22**, 79–86 (2010).
104. Leite-de-moraes, M. C. *et al.* A Distinct IL-18-Induced Pathway to Fully Activate NK T Lymphocytes Independently from TCR Engagement. *Journal of Immunology* **163**, 5871–5876 (1999).
105. Nagarajan, N. A. & Kronenberg, M. Invariant NKT Cells Amplify the Innate Immune Response to Lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology* **178**, 2706–2713 (2007).
106. Rachitskaya, A. v. *et al.* Cutting Edge: NKT Cells Constitutively Express IL-23 Receptor and ROR γ t and Rapidly Produce IL-17 upon Receptor Ligation in an IL-6-Independent Fashion. *The Journal of Immunology* **180**, 5167–5171 (2008).
107. Doisne, J.-M. *et al.* Skin and Peripheral Lymph Node Invariant NKT Cells Are Mainly Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor γ t + and Respond Preferentially under Inflammatory Conditions. *The Journal of Immunology* **183**, 2142–2149 (2009).
108. Stock, P., Lombardi, V., Kohlrantz, V. & Akbari, O. Induction of Airway Hyperreactivity by IL-25 Is Dependent on a Subset of Invariant NKT Cells Expressing IL-17RB. *The Journal of Immunology* **182**, 5116–5122 (2009).
109. Tyznik, A. J. *et al.* The mechanism of invariant NKT cell responses to viral danger signals. *Journal of Immunology* **181**, 4452–4456 (2008).
110. Wesley, J. D., Tessmer, M. S., Chaukos, D. & Brossay, L. NK cell-like behavior of V α 14 iNKT cells during MCMV infection. *PLoS Pathog* **4**, 1–10 (2008).
111. Cohen, N. R. *et al.* Innate recognition of cell wall β -Glucans drives invariant natural killer T cell responses against fungi. *Cell Host Microbe* **10**, 437–450 (2011).
112. Brigl, M. *et al.* Innate and cytokine-driven signals, rather than microbial antigens dominate in natural killer T cell activation during microbial infection. *Journal of Experimental Medicine* **208**, 1163–1177 (2011).
113. Bendelac, A. Mouse NK1+ T cells. *Curr Opin Immunol* **7**, 367–374 (1995).
114. Sköld, M. & Cardell, S. Differential regulation of Ly49 expression on CD4+ and CD4-CD8- (double negative) NK1.1+ T cells. *Eur J Immunol* **30**, 2488–2496 (2000).

115. Arase, H., Arase, N. & Saito, T. Interferon γ production by natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells upon NKR-P1 cross-linking. *Journal of Experimental Medicine* **183**, 2391–2396 (1996).
116. Germain, C. *et al.* Induction of lectin-like transcript 1 (LLT1) protein cell surface expression by pathogens and interferon- γ contributes to modulate immune responses. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 37964–37975 (2011).
117. Champsaur, M. & Lanier, L. L. Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. *Immunol Rev* **235**, 267–285 (2010).
118. Kuylenstierna, C. *et al.* NKG2D performs two functions in invariant NKT cells: Direct TCR-independent activation of NK-like cytotoxicity, and co-stimulation of activation by CD1d. *Eur J Immunol* **41**, 1913–1923 (2011).
119. Wang, X. *et al.* Human invariant natural killer T cells acquire transient innate responsiveness via histone H4 acetylation induced by weak TCR stimulation. *Journal of Experimental Medicine* **209**, 987–1000 (2012).
120. Yu, K. O. A. *et al.* Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acyl variants of galactosylceramides. *PNAS* **102**, 3383–3388 (2005).
121. Schmieg, J., Yang, G., Franck, R. W. & Tsuji, M. Superior Protection against Malaria and Melanoma Metastases by a C-glycoside Analogue of the Natural Killer T Cell Ligand α -Galactosylceramide. *Journal of Experimental Medicine* **198**, 1631–1641 (2003).
122. Miyamoto, K., Miyake, S. & Yamamura, T. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature* **413**, 531–534 (2001).
123. Wun, K. S. *et al.* A molecular basis for the exquisite CD1d-restricted antigen specificity and functional responses of natural killer T cells. **34**, 327–339 (2011).
124. Yu, E. D., Girardi, E., Wang, J. & Zajonc, D. M. Cutting Edge: Structural Basis for the Recognition of β -Linked Glycolipid Antigens by Invariant NKT Cells. *The Journal of Immunology* **187**, 2079–2083 (2011).
125. Bai, L. *et al.* Distinct antigen-presenting cells explain the cytokine bias of α -GalCer variants in vivo. *Journal of Immunology* **188**, 3053–3061 (2012).
126. Kageyama, R. *et al.* The receptor Ly108 functions as a SAP adaptor-dependent on-off switch for T cell help to B cells and NKT cell development. *Immunity* **36**, 986–1002 (2012).
127. Arora, P. *et al.* A single subset of dendritic cells controls the cytokine bias of natural killer T cell responses to diverse glycolipid antigens. *Immunity* **40**, 105–116 (2014).

128. Fujii, S. I., Liu, K., Smith, C., Bonito, A. J. & Steinman, R. M. The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *Journal of Experimental Medicine* **199**, 1607–1618 (2004).
129. Bezbradica, J. S. *et al.* Distinct Roles of Dendritic Cells and B Cells in Va14Ja18 Natural T Cell Activation In Vivo. *The Journal of Immunology* **174**, 4696–4705 (2005).
130. Hermans, I. F. *et al.* NKT Cells Enhance CD4 + and CD8 + T Cell Responses to Soluble Antigen In Vivo through Direct Interaction with Dendritic Cells . *The Journal of Immunology* **171**, 5140–5147 (2003).
131. Roark, J. H. *et al.* CD1.1 expression by mouse antigen-presenting cells and marginal zone B cells. *J Immunol* **160**, 3121–7 (1998).
132. King, I. L. *et al.* Invariant natural killer T cells direct B cell responses to cognate lipid antigen in an IL-21-dependent manner. *Nat Immunol* **13**, 44–50 (2012).
133. Chang, P. P. *et al.* Identification of Bcl-6-dependent follicular helper NKT cells that provide cognate help for B cell responses. *Nat Immunol* **13**, 35–43 (2012).
134. Barral, P. *et al.* CD169+ macrophages present lipid antigens to mediate early activation of iNKT cells in lymph nodes. *Nat Immunol* **11**, 303–312 (2010).
135. Nieuwenhuis, E. E. S. *et al.* CD1d-dependent, macrophage-mediated clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from lung. *Nat Med* **56**, 588–593 (2002).
136. Sada-Ovalle, I., Chiba, A., Gonzales, A., Brenner, M. B. & Behar, S. M. Innate invariant NKT cells recognize *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages, produce interferon- γ , and kill intracellular bacteria. *PLoS Pathog* **4**, (2008).
137. Hegde, S. *et al.* NKT cells direct monocytes into a DC differentiation pathway. *J Leukoc Biol* **81**, 1224–1235 (2007).
138. Kotsianidis, I. *et al.* Regulation of hematopoiesis in vitro and in vivo by invariant NKT cells. *Blood* **107**, 3138–3144 (2006).
139. Kawakami, K. *et al.* Critical role of V α 14+ natural killer T cells in the innate phase of host protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Eur J Immunol* **33**, 3322–3330 (2003).
140. de Santo, C. *et al.* Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A. *Nat Immunol* **11**, 1039–1046 (2010).

141. Wingender, G. *et al.* Neutrophilic granulocytes modulate invariant natural killer T cell function in mice and humans. *Journal of Immunology* **188**, 3000–3008 (2012).
142. Ji, Y. *et al.* Short term high fat diet challenge promotes alternative macrophage polarization in adipose tissue via natural killer T cells and interleukin-4. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 24378–24386 (2012).
143. Lydia Lynch, Michael Nowak, Bindu Varghese, Justice Clark, A. E. H. *et al.* Adipose Tissue Invariant NKT Cells Protect Against Diet-Induced Obesity and Metabolic Disorder Through Regulatory Cytokine Production Lydia. *Immunity* **37**, 574–587 (2016).
144. Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C. & Brossay, L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol* **12**, 239–252 (2012).
145. Metelitsa, L. S. Anti-tumor potential of type I NKT cells against CD1d positive and CD1d negative tumors in humans. *Clinical Immunology* **140**, 119–129 (2011).
146. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **68**, 394–424 (2018).
147. Cáncer. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (2022).
148. Cancer, datos y cifras. Organizacion Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (2021).
149. *Biological Agents, a review of human carcinogens*. vol. 100B (International Agency for Research on Cancer, 2018).
150. Plummer, M. *et al.* Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Health* **4**, e609–e616 (2016).
151. de Martel, C., Georges, D., Bray, F., Ferlay, J. & Clifford, G. M. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *Lancet Glob Health* **8**, e180–e190 (2020).
152. Dunn, G. P., Koebel, C. M. & Schreiber, R. D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* **6**, 836–848 (2006).
153. Burnet, M. Cancer-A Biological Approach* Iii. Viruses Associated With Neoplastic Conditions. *Br Med J* **1**, 841 (1957).
154. Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Cancer Immunoediting: From Surveillance to Escape. *Nat Immunol* **3**, 991–998 (2002).

155. Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* **22**, 329–360 (2004).
156. Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* **21**, 137–148 (2004).
157. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
158. Hanahan, D. & Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**, 353–364 (1996).
159. Sternlicht, M. D. & Werb, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Reviews of Cellular Development Biology* **17**, 463–516 (2001).
160. Loeb, L. A. Mutator Phenotype May Be Required for Multistage Carcinogenesis. *Cancer Res* **51**, 3075–3079 (1991).
161. Loeb, L. A., Loeb, K. R. & Anderson, J. P. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 776–781 (2003).
162. Lengauer, C., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**, 643–649 (1998).
163. Davis, A., Gao, R. & Navin, N. Tumor evolution: Linear, branching, neutral or punctuated? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1867**, 151–161 (2017).
164. Williams, M. J., Sottoriva, A. & Graham, T. A. Measuring Clonal Evolution in Cancer with Genomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **20**, 309–329 (2019).
165. Gerlinger, M. *et al.* Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nat Genet* **46**, 225–233 (2014).
166. Sun, R. *et al.* Between-region genetic divergence reflects the mode and tempo of tumor evolution. *Nat Genet* **49**, 1015–1024 (2017).
167. Sottoriva, A. *et al.* A Big Bang model of human colorectal tumor growth. *Nat Genet* **47**, 209–216 (2015).
168. Baca, S. C. *et al.* Punctuated evolution of prostate cancer genomes. *Cell* **153**, 666–677 (2013).
169. Marincola, F. M., Jaffee, E. M., Hickljin, D. J. & Ferrone, S. Escape of human solid tumors from t-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* **74**, 181–273 (2000).
170. Groh, V., Wu, J., Yee, C. & Spies, T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* **419**, 734–738 (2002).

171. Kaplan, D. H. *et al.* Demonstration of an interferon γ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7556–7561 (1998).
172. Takeda, K. *et al.* Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *Journal of Experimental Medicine* **195**, 161–169 (2002).
173. Catlett-Falcone, R. *et al.* Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* **10**, 105–115 (1999).
174. Coussens, L. M., Zitvogel, L. & Palucka, K. A. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: A magic bullet? *Science* **339**, 286–291 (2013).
175. Palucka, A. K. & Coussens, L. M. The Basis of Oncoimmunology. *Cell* **164**, 1233–1247 (2016).
176. Balkwill, F., Charles, K. A. & Mantovani, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* **7**, 211–217 (2005).
177. Ruffell, B. *et al.* Macrophage IL-10 Blocks CD8+ T Cell-Dependent Responses to Chemotherapy by Suppressing IL-12 Expression in Intratumoral Dendritic Cells. *Cancer Cell* **26**, 623–637 (2014).
178. DeNardo, D. G. *et al.* Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov* **1**, 54–67 (2011).
179. Shiao, S. L. *et al.* TH2-polarized CD4+ T Cells and macrophages limit efficacy of radiotherapy. *Cancer Immunol Res* **3**, 518–525 (2015).
180. Inoue, S., Leitner, W. W., Golding, B. & Scott, D. Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity. *Cancer Res* **66**, 7741–7747 (2006).
181. Hendriks, R. W., Yuvaraj, S. & Kil, L. P. Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nat Rev Cancer* **14**, 219–232 (2014).
182. Zeeshan, R. & Mutahir, Z. Cancer metastasis - Tricks of the trade. *Bosn J Basic Med Sci* **17**, 172–182 (2017).
183. Nguyen, D. X., Bos, P. D. & Massagué, J. Metastasis: From dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* **9**, 274–284 (2009).
184. Minna, J. D., Kurie, J. M. & Jacks, T. A big step in the study of small cell lung cancer. *Cancer Cell* **4**, 163–166 (2003).
185. Klein, C. A. The systemic progression of human cancer: A focus on the individual disseminated cancer cell - The unit of selection. *Adv Cancer Res* **89**, 35–67 (2003).

186. Mcallister, S. S. & Weinberg, R. A. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. *Nat Cell Biol* **16**, 717–727 (2014).
187. Edlund, M., Sung, S. Y. & Chung, L. W. K. Modulation of prostate cancer growth in bone microenvironments. *J Cell Biochem* **91**, 686–705 (2004).
188. Triozzi, P. L., Eng, C. & Singh, A. D. Targeted therapy for uveal melanoma. *Cancer Treat Rev* **34**, 247–258 (2008).
189. Schmidt-Kittler, O. *et al.* From latent disseminated cells to overt metastasis: Genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7737–7742 (2003).
190. Karrison, T. G., Ferguson, D. J. & Meier, P. Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy. *J Natl Cancer Inst* **91**, 80–85 (1999).
191. Feld, R., Rubinstein, L. v. & Weisenberger, T. H. Sites of recurrence in resected stage I non-small-cell lung cancer: a guide for future studies. *Journal of Clinical Oncology* **2**, 1352–1358 (1984).
192. Hoffman, P. C., Mauer, A. M. & Vokes, E. E. Lung cancer. *The Lancet* **335**, 479–485 (2000).
193. Chambers, A. F., Groom, A. C. & MacDonald, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* **2**, 563–572 (2002).
194. Nguyen, D. X. & Massagué, J. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nature Reviews Genetics* **2007** *8:5* **8**, 341–352 (2007).
195. Chiang, A. C. & Massagué, J. Molecular Basis of Metastasis. *N Engl J Med* **359**, 2814–2823 (2008).
196. Mundy, G. R. Metastasis to bone: Causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* **2**, 584–593 (2002).
197. Yin, J. J. *et al.* TGF- β signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *Journal of Clinical Investigation* **103**, 197–206 (1999).
198. Kang, Y. *et al.* A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* **3**, 537–549 (2003).
199. Olson, B., Li, Y., Lin, Y., Liu, E. T. & Patnaik, A. Mouse Models for Cancer Immunotherapy Research . *American Association for Cancer Research* **8**, 1358–1365 (2018).
200. DeVita, V. T. & Chu, E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res* **68**, 8643–8653 (2008).
201. Siegler, E. L. & Wang, P. Preclinical Models in Chimeric Antigen Receptor-Engineered T-Cell Therapy. *Hum Gene Ther* **29**, 534–546 (2018).

202. Scheffer, S. R. *et al.* Apoptotic, but not necrotic, tumor cell vaccines induce a potent immune response in vivo. *Int J Cancer* **103**, 205–211 (2003).
203. Overwijk, W. W. & Restifo, N. P. *B16 as a mouse model for Human Melanoma*. *Curr Protoc Immunol* (2001).
204. Esplugues, E. *et al.* Enhanced antitumor immunity in mice deficient in CD69. *Journal of Experimental Medicine* **197**, 1093–1106 (2003).
205. Schreiber, R. D., Old, L. J. & Smyth, M. J. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **331**, 1565–1570 (2011).
206. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
207. Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E. R. & Morrison, S. J. Heterogeneity in Cancer: Cancer Stem Cells versus Clonal Evolution. *Cell* **138**, 822–829 (2009).
208. Calbo, J. *et al.* A Functional Role for Tumor Cell Heterogeneity in a Mouse Model of Small Cell Lung Cancer. *Cancer Cell* **19**, 244–256 (2011).
209. Greenberg, N. M. *et al.* Prostate cancer in a transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3439–3443 (1995).
210. Madan, R. A., Gulley, J. L., Fojo, T. & Dahut, W. L. Therapeutic Cancer Vaccines in Prostate Cancer: The Paradox of Improved Survival Without Changes in Time to Progression. *Oncologist* **15**, 969–975 (2010).
211. Gulley, J. L. & Drake, C. G. Immunotherapy for prostate cancer: recent advances, lessons learned, and areas for further research. *Clinical Cancer Research* **17**, 3884–3891 (2011).
212. Hooijkaas, A. I., Gadiot, J., van der Valk, M., Mooi, W. J. & Blank, C. U. Targeting BRAF V600E in an inducible murine model of melanoma. *American Journal of Pathology* **181**, 785–794 (2012).
213. Chen, Z. *et al.* Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **436**, 725–730 (2005).
214. Kaplan-Lefko, P. J. *et al.* Pathobiology of autochthonous prostate cancer in a pre-clinical transgenic mouse model. *Prostate* **55**, 219–237 (2003).
215. Hingorani, S. R. *et al.* Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* **7**, 469–483 (2005).
216. Liu, J. *et al.* Improved efficacy of neoadjuvant compared to adjuvant immunotherapy to eradicate metastatic disease. *Cancer Discov* **6**, 1382–1399 (2016).

217. Yen, J. *et al.* The genetic heterogeneity and mutational burden of engineered melanomas in zebrafish models. *Genome Biol* **14**, (2013).
218. Walsh, N. *et al.* Humanized mouse models of clinical disease. *Annu Rev Pathol* **24**, 187–215 (2017).
219. King, M. A. *et al.* Human peripheral blood leucocyte non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2 receptor gamma chain gene mouse model of xenogeneic graft-versus-host-like disease and the role of host major histocompatibility complex. *Clin Exp Immunol* **157**, 104–118 (2009).
220. Watanabe, Y. *et al.* The analysis of the functions of human B and T cells in humanized NOD/shi-scid/ γ cnull (NOG) mice (hu-HSC NOG mice). *Int Immunol* **21**, 843–858 (2009).
221. Halkias, J. *et al.* Conserved and divergent aspects of human T-cell development and migration in humanized mice. *Immunol Cell Biol* **93**, 716–726 (2015).
222. Lan, P., Tonomura, N., Shimizu, A., Wang, S. & Yang, Y. G. Reconstitution of a functional human immune system in immunodeficient mice through combined human fetal thymus/liver and CD34+ cell transplantation. *Blood* **108**, 487–492 (2006).
223. Melkus, M. W. *et al.* Humanized mice mount specific adaptive and innate immune responses to EBV and TSST-1. *Nat Med* **12**, 1316–1322 (2006).
224. Shultz, L. D., Brehm, M. A., Victor Garcia-Martinez, J. & Greiner, D. L. Humanized mice for immune system investigation: Progress, promise and challenges. *Nat Rev Immunol* **12**, 786–798 (2012).
225. Sijts, A. J. *et al.* Identification of an H-2 Kb-presented Moloney murine leukemia virus cytotoxic T-lymphocyte epitope that displays enhanced recognition in H-2 Db mutant bm13 mice. *J Virol* **68**, 6038–6046 (1994).
226. Kärre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G. & Kiessling, R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defense strategy. *Nature* **319**, 675–678 (1986).
227. Klein, E. & Klein, G. Antigenic Properties of Lymphomas Induced by the Moloney Agent. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **32**, 547–568 (1964).
228. van Hall, T. *et al.* Identification of a Novel Tumor-Specific CTL Epitope Presented by RMA, EL-4, and MBL-2 Lymphomas Reveals Their Common Origin. *The Journal of Immunology* **165**, 869–877 (2000).
229. Nakazaki, Y. *et al.* Vaccine effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or CD80 gene-transduced murine hematopoietic tumor cells and their cooperative enhancement of antitumor immunity. *Gene Ther* **5**, 1355–1362 (1998).

230. Nanni, P. *et al.* Impaired H-2 expression in B 16 melanoma variants. *Int J Immunogenet* **10**, 361–370 (1983).
231. Netland, P. A. & Zetter, B. R. Metastatic potential of b16 melanoma cells after in vitro selection for organ-specific adherence. *Journal of Cell Biology* **101**, 720–724 (1985).
232. Swann, J. B. *et al.* Type I natural killer T cells suppress tumors caused by p53 loss in mice. *Blood* **113**, 6382–6385 (2009).
233. Smyth, M. J. *et al.* Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *Journal of Experimental Medicine* **191**, 661–668 (2000).
234. Crowe, N. Y., Smyth, M. J. & Godfrey, D. I. A critical role for natural killer T cells in immunosurveillance of methylcholanthrene-induced sarcomas. *Journal of Experimental Medicine* **196**, 119–127 (2002).
235. Ko, S.-Y. *et al.* α -Galactosylceramide Can Act As a Nasal Vaccine Adjuvant Inducing Protective Immune Responses against Viral Infection and Tumor. *The Journal of Immunology* **175**, 3309–3317 (2005).
236. Muhammad Ali Tahir, S. *et al.* Loss of IFN- γ Production by Invariant NK T Cells in Advanced Cancer. *The Journal of Immunology* **167**, 4046–4050 (2001).
237. Yanagisawa, K. *et al.* Impaired Proliferative Response of V α 24 NKT Cells from Cancer Patients Against α -Galactosylceramide. *The Journal of Immunology* **168**, 6494–6499 (2002).
238. Schneiders, F. L. *et al.* Circulating invariant natural killer T-cell numbers predict outcome in head and neck squamous cell carcinoma: updated analysis with 10-year follow-up. *Journal of Clinical Oncology* **30**, 565–567 (2012).
239. Tachibana, T. *et al.* Increased intratumor V α 24-positive natural killer T cells: A prognostic factor for primary colorectal carcinomas. *Clinical Cancer Research* **11**, 7322–7327 (2005).
240. Song, L. *et al.* V α 24-invariant NKT cells mediate antitumor activity via killing of tumor-associated macrophages. *Journal of Clinical Investigation* **119**, 1524–1536 (2009).
241. Kawano, T. *et al.* Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated V α 14 NKT cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5690–5693 (1998).
242. Swann, J. B., Coquet, J. M. C., Smyth, M. J. & Godfrey, D. I. CD1-restricted T cells and tumor immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* **314**, 293–323 (2007).
243. Smyth, M. J. *et al.* Sequential production of interferon- γ by NK1.1+ T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of α -galactosylceramide. *Blood* **99**, 1259–1266 (2002).

244. Altman, J. B., Benavides, A. D., Das, R. & Bassiri, H. Antitumor Responses of Invariant Natural Killer T Cells. *J Immunol Res* **2015**, (2015).
245. Metelitsa, L. S., Weinberg, K. I., Emanuel, P. D. & Seeger, R. C. Expression of CD1d by myelomonocytic leukemias provides a target for cytotoxic NKT cells. *Leukemia* **17**, 1068–1077 (2003).
246. Renukaradhya, G. J. *et al.* Type I NKT cells protect (and type II NKT cells suppress) the host's innate antitumor immune response to a B-cell lymphoma. *Blood* **111**, 5637–5645 (2008).
247. Wingender, G., Krebs, P., Beutler, B. & Kronenberg, M. Antigen-Specific Cytotoxicity by Invariant NKT Cells In Vivo Is CD95/CD178-Dependent and Is Correlated with Antigenic Potency. *The Journal of Immunology* **185**, 2721–2729 (2010).
248. Bassiri, H. *et al.* iNKT cell cytotoxic responses control T-lymphoma growth in vitro and in vivo. *Cancer Immunol Res* **2**, 59–69 (2014).
249. Singh, A. K. *et al.* Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Experimental Medicine* **194**, 1801–1811 (2001).
250. Hong, S. *et al.* The natural killer T-cell ligand α -galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat Med* **7**, 1052–1056 (2001).
251. Johnson, T. R., Hong, S., van Kaer, L., Koezuka, Y. & Graham, B. S. NK T Cells Contribute to Expansion of CD8 + T Cells and Amplification of Antiviral Immune Responses to Respiratory Syncytial Virus. *J Virol* **76**, 4294–4303 (2002).
252. Emoto, M. *et al.* α -galactosylceramide promotes killing of *Listeria monocytogenes* within the macrophage phagosome through invariant NKT-cell activation. *Infect Immun* **78**, 2667–2676 (2010).
253. Hansen, D. S., Siomos, M. A., Buckingham, L., Scalzo, A. A. & Schofield, L. Regulation of murine cerebral malaria pathogenesis by CD1d-restricted NKT cells and the natural killer complex. *Immunity* **18**, 391–402 (2003).
254. Gonzalez-Aseguinolaza, G. *et al.* Natural killer T cell ligand α -galactosylceramide enhances protective immunity induced by malaria vaccines. *Journal of Experimental Medicine* **195**, 617–624 (2002).
255. Huang, Y. *et al.* Enhancement of HIV DNA vaccine immunogenicity by the NKT cell ligand, α -galactosylceramide. *Vaccine* **26**, 1807–1816 (2008).
256. Youn, H. J. *et al.* A single intranasal immunization with inactivated influenza virus and α -galactosylceramide induces long-term protective immunity without redirecting antigen to the central nervous system. *Vaccine* **25**, 5189–5198 (2007).

257. Fujii, S.-I., Shimizu, K., Smith, C., Bonifaz, L. & Steinman, R. M. Activation of Natural Killer T Cells by Galactosylceramide Rapidly Induces the Full Maturation of Dendritic Cells In Vivo and Thereby Acts as an Adjuvant for Combined CD4 and CD8 T Cell Immunity to a Coadministered Protein. *The Journal of Experimental Medicine J. Exp. Med.* **198**, 267–279 (2003).
258. Fujii, S. I., Shimizu, K., Kronenberg, M. & Steinman, R. M. Prolonged IFN- γ -producing NKT response induced with α -galactosylceramide-loaded DCs. *Nat Immunol* **3**, 867–874 (2002).
259. Gehrman, U. *et al.* Synergistic induction of adaptive antitumor immunity by codelivery of antigen with α -galactosylceramide on exosomes. *Cancer Res* **73**, 3865–3876 (2013).
260. Giaccone, G. *et al.* A phase I study of the natural killer T-cell ligand α -galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors. *Clinical Cancer Research* **8**, 3702–3709 (2002).
261. Nieda, M. *et al.* Therapeutic activation of V α 24+V β 11+NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity. *Blood* **103**, 383–389 (2004).
262. Nair, S. & Dhodapkar, M. v. Natural killer T cells in cancer immunotherapy. *Front Immunol* **8**, (2017).
263. Yamasaki, K. *et al.* Induction of NKT cell-specific immune responses in cancer tissues after NKT cell-targeted adoptive immunotherapy. *Clinical Immunology* **138**, 255–265 (2011).
264. Parekh, V. v. *et al.* Glycolipid antigen induces long-term natural killer T cell anergy in mice. *Journal of Clinical Investigation* **115**, 2572–2583 (2005).
265. Carreño, L. J., Saavedra-Ávila, N. A. & Porcelli, S. A. Synthetic glycolipid activators of natural killer T cells as immunotherapeutic agents. *Clin Transl Immunology* **5**, 1–9 (2016).
266. Parekh, V. v. *et al.* PD-1/PD-L Blockade Prevents Anergy Induction and Enhances the Anti-Tumor Activities of Glycolipid-Activated Invariant NKT Cells. *The Journal of Immunology* **182**, 2816–2826 (2009).
267. Cullen, R., Germanov, E., Shimaoka, T. & Johnston, B. Enhanced Tumor Metastasis in Response to Blockade of the Chemokine Receptor CXCR6 Is Overcome by NKT Cell Activation. *The Journal of Immunology* **183**, 5807–5815 (2009).
268. Anderson, B. L., Teyton, L., Bendelac, A. & Savage, P. B. Stimulation of Natural Killer T Cells by Glycolipids. *Molecules* **18**, 15662–15688 (2013).
269. Mattner, J. *et al.* Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature* **434**, 525–530 (2005).

270. Sriram, V., Du, W., Gervay-Hague, J. & Brutkiewicz, R. R. Cell wall glycosphingolipids of *Sphingomonas paucimobilis* are CD1d-specific ligands for NKT cells. *Eur J Immunol* **35**, 1692–1701 (2005).
271. Uldrich, A. P. *et al.* A semi-invariant V α 10+ T cell antigen receptor defines a population of natural killer T cells with distinct glycolipid antigen-recognition properties. *Nat Immunol* **12**, 616–623 (2011).
272. Forestier, C. *et al.* Improved Outcomes in NOD Mice Treated with a Novel Th2 Cytokine-Biasing NKT Cell Activator. *The Journal of Immunology* **178**, 1415–1425 (2007).
273. Goff, R. D. *et al.* Effects of lipid chain lengths in α -galactosylceramides on cytokine release by natural killer T cells. *J Am Chem Soc* **126**, 13602–13603 (2004).
274. Fujio, M. *et al.* Structure-based discovery of glycolipids for CD1d-mediated NKT cell activation: Tuning the adjuvant versus immunosuppression activity. *J Am Chem Soc* **128**, 9022–9023 (2006).
275. Li, X. *et al.* Design of a potent CD1d-binding NKT cell ligand as a vaccine adjuvant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 13010–13015 (2010).
276. Padte, N. N. *et al.* A Glycolipid Adjuvant, 7DW8-5, Enhances CD8+ T Cell Responses Induced by an Adenovirus-Vectored Malaria Vaccine in Non-Human Primates. *PLoS One* **8**, 1–11 (2013).
277. Kobayashi, E., Motoki, K., Uchida, T., Fukushima, H. & Koezuka, Y. KRN7000, a novel immunomodulator, and its antitumor activities. *Oncol Res* **7**, 529–534 (1995).
278. Tashiro, T. Structure-activity relationship studies of novel glycosphingolipids that stimulate natural killer T-cells. *Biosci Biotechnol Biochem* **76**, 1055–1067 (2014).
279. Kopecky-bromberg, S. A. *et al.* Alpha-C-galactosylceramide as an adjuvant for a live attenuated influenza virus vaccine. *Vaccine* **27**, 3766–3774 (2009).
280. Zajonc, D. M. *et al.* Structure and function of a potent agonist for the semi-invariant natural killer T cell receptor. *Nat Immunol* **6**, 810–818 (2005).
281. Chen, G., Chien, M., Tsuji, M. & Franck, R. W. E and Z α -C-galactosylceramides by Julia-Lythgoe-Kocienski chemistry: A test of the receptor-binding model for glycolipid immunostimulants. *ChemBioChem* **7**, 1017–1022 (2006).
282. Li, X., Chen, G., Garcia-Navarro, R., Franck, R. W. & Tsuji, M. Identification of C-glycoside analogues that display a potent biological activity against murine and human invariant natural killer T cells. *Immunology* **127**, 216–225 (2009).

283. Chang, Y. J. *et al.* Potent immune-modulating and anticancer effects of NKT cell stimulatory glycolipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10299–10304 (2007).
284. Blauvelt, M. L. *et al.* α -S-GalCer: Synthesis and evaluation for iNKT cell stimulation. *Bioorg Med Chem Lett* **18**, 6374–6376 (2008).
285. Dere, R. T. & Zhu, X. The first synthesis of a thioglycoside analogue of the immunostimulant KRN7000. *Org Lett* **10**, 4641–4644 (2008).
286. Hogan, A. E. *et al.* Activation of human invariant natural killer T cells with a thioglycoside analogue of α -galactosylceramide. *Clinical Immunology* **140**, 196–207 (2011).
287. Zhang, L., Carthy, C. M. & Zhu, X. Synthesis of a glucosylated α -S-galactosylceramide as potential immunostimulant. *Carbohydr Res* **448**, 43–47 (2017).
288. Melo, A. M. *et al.* Novel thioglycoside analogs of α -galactosylceramide stimulate cytotoxicity and preferential Th1 cytokine production by human invariant natural killer T cells. *Glycobiology* **28**, 512–521 (2018).
289. Xing, G. W. *et al.* Synthesis and human NKT cell stimulating properties of 3-O-sulfo- α / β -galactosylceramides. *Bioorg Med Chem* **13**, 2907–2916 (2005).
290. Barbieri, L. *et al.* Immunomodulatory α -Galactoglycosphingolipids: Synthesis of a 2'-O-Methyl- α -Gal-GSL and Evaluation of Its Immunostimulating Capacity. *European J Org Chem* **3**, 468–473 (2004).
291. Raju, R. *et al.* Synthesis and evaluation of 3''- and 4''-deoxy and -fluoro analogs of the immunostimulatory glycolipid, KRN7000. *Bioorg Med Chem Lett* **19**, 4122–4125 (2009).
292. Xia, C. *et al.* The roles of 3' and 4' hydroxy groups in alpha-galactosylceramide stimulation of invariant natural killer T cells. *ChemMedChem* **4**, 1810–1815 (2009).
293. Zhang, W. *et al.* Introduction of aromatic group on 4'-OH of α -GalCer manipulated NKT cell cytokine production. *Bioorg Med Chem* **19**, 2767–2776 (2011).
294. Pellicci, D. G. *et al.* Recognition of β -linked self glycolipids mediated by natural killer T cell antigen receptors. *Nat Immunol* **12**, 827–833 (2011).
295. Prigozy, T. I. *et al.* Glycolipid antigen processing for presentation by CD1d molecules. *Science* **291**, 664–667 (2001).
296. Zhou, X. T. *et al.* Synthesis and NKT Cell Stimulating Properties of Fluorophore- and Biotin-Appended 6''-Amino-6''-deoxy-galactosylceramides. *Org Lett* **4**, 1267–1270 (2002).

297. Liu, Y. *et al.* A modified α -galactosyl ceramide for staining and stimulating natural killer T cells. *J Immunol Methods* **312**, 34–39 (2006).
298. Trappeniers, M. *et al.* 6'-Derivatised α -GalCer analogues capable of inducing strong CD1d-mediated Th1-biased NKT cell responses in mice. *J Am Chem Soc* **130**, 16468–16469 (2008).
299. Aspeslagh, S. *et al.* Galactose-modified iNKT cell agonists stabilized by an induced fit of CD1d prevent tumour metastasis. *EMBO Journal* **30**, 2294–2305 (2011).
300. Jervis, P. J. *et al.* Towards multivalent CD1d ligands: Synthesis and biological activity of homodimeric α -galactosyl ceramide analogues. *Carbohydr Res* **356**, 152–162 (2012).
301. Jervis, P. J. *et al.* New CD1d agonists: Synthesis and biological activity of 6''-triazole-substituted α -galactosyl ceramides. *Bioorg Med Chem Lett* **22**, 4348–4352 (2012).
302. Tashiro, T. *et al.* RCAI-56, a carbocyclic analogue of KRN7000: its synthesis and potent activity for natural killer (NK) T cells to preferentially produce interferon- γ . *Tetrahedron Lett* **48**, 3343–3347 (2007).
303. Yoshiga, Y. *et al.* Activation of natural killer T cells by α -carba-GalCer (RCAI-56), a novel synthetic glycolipid ligand, suppresses murine collagen-induced arthritis. *Clin Exp Immunol* **164**, 236–247 (2011).
304. Harrak, Y. *et al.* Aminocyclitol-substituted phytoceramides and their effects on iNKT cell stimulation. *ChemMedChem* **4**, 1608–1613 (2009).
305. Kerzerho, J. *et al.* Structural and functional characterization of a novel nonglycosidic type I NKT agonist with immunomodulatory properties. *Journal of immunology* **188**, 2254–65 (2012).
306. Harrak, Y., Barra, C. M., Delgado, A., Castaño, A. R. & Llebaria, A. Galacto-Configured Aminocyclitol Phytoceramides Are Potent in Vivo Invariant Natural Killer T Cell Stimulators. *Journal of American Chemical Society* **133**, 12079–12084 (2011).
307. Ljunggren, H. -G, Öhlén, C., Höglund, P., Franksson, L. & Kärre, K. The RMA-S lymphoma mutant; consequences of a peptide loading defect on immunological recognition and graft rejection. *International journal of cancer. Supplement* **6**, 38–44 (1991).
308. Feugier, P. A review of rituximab, the first anti-CD20 monoclonal antibody used in the treatment of B non-Hodgkin's lymphomas. *Future Oncology* **11**, 1327–1342 (2015).
309. Horikawa, M., Minard-Colin, V., Matsushita, T. & Tedder, T. F. Regulatory B cell production of IL-10 inhibits lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice. *Journal of Clinical Investigation* **121**, 4268–4280 (2011).

310. Bjordahl, R. L., Gapin, L., Marrack, P. & Refaeli, Y. INKT cells suppress the CD8+ T cell response to a murine burkitt's-like b cell lymphoma. *PLoS One* **7**, (2012).
311. Enot, D. P., Vacchelli, E., Jacquelot, N., Zitvogel, L. & Kroemer, G. TumGrowth: An open-access web tool for the statistical analysis of tumor growth curves. *Oncoimmunology* **7**, 1–3 (2018).
312. Busch, G. H. *et al.* Tumor-Specific Immune Responses Necrotic Tumor Cell Death In Vivo Impairs Necrotic Tumor Cell Death In Vivo Impairs Tumor-Specific Immune Responses 1. *J Immunol The Journal of Immunology by guest on* **178**, 1573–1580 (2007).
313. Aaes, T. L. *et al.* Vaccination with Necroptotic Cancer Cells Induces Efficient Anti-tumor Immunity. *Cell Rep* **15**, 274–287 (2016).
314. Milleron, R. S. & Bratton, S. B. Heat Shock Induces Apoptosis Independently of Any Known Initiator Caspase-activating Complex. (2006) doi:10.1074/jbc.M512754200.
315. Gu, Z. T. *et al.* Heat stress induces apoptosis through transcription-independent p53-mediated mitochondrial pathways in human umbilical vein endothelial cell. *Sci Rep* **4**, (2014).
316. Xiang, J., Wan, C., Guo, R. & Guo, D. Is Hydrogen Peroxide a Suitable Apoptosis Inducer for All Cell Types? *Biomed Res Int* **2016**, (2016).
317. Vučić, V., Isenović, E. R., Adžić, M., Ruždijić, S. & Radojčić, M. B. Effects of gamma-radiation on cell growth, cycle arrest, death, and superoxide dismutase expression by DU 145 human prostate cancer cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **39**, 227–236 (2006).
318. Kulms, D. & Schwarz, T. Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **16**, 195–201 (2000).
319. Cao, C., Han, Y., Ren, Y. & Wang, Y. Mitoxantrone-mediated apoptotic B16-F1 cells induce specific anti-tumor immune response. *Cell Mol Immunol* **6**, 469–475 (2009).
320. Gays, F. *et al.* The Mouse Tumor Cell Lines EL4 and RMA Display Mosaic Expression of NK-Related and Certain Other Surface Molecules and Appear to Have a Common Origin. *The Journal of Immunology* **164**, 5094–5102 (2000).
321. Guillerey, C., Huntington, N. D. & Smyth, M. J. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nat Immunol* **17**, 1025–1036 (2016).
322. Takeda, K. *et al.* IFN- γ production by lung NK cells is critical for the natural resistance to pulmonary metastasis of B16 melanoma in mice. *J Leukoc Biol* **90**, 777–785 (2011).

323. Sungur, C. M. & Murphy, W. J. Positive and negative regulation by NK cells in cancer. *Crit Rev Oncog* **19**, 57–66 (2014).
324. Velcheti, V. & Schalper, K. Basic Overview of Current Immunotherapy Approaches in Cancer. *American Society of Clinical Oncology* **35**, 298–308 (2016).
325. Singh, P., Szaraz-Szeles, M., Mezei, Z., Barath, S. & Hevessy, Z. Gender-dependent frequency of unconventional T cells in a healthy adult Caucasian population: A combinational study of invariant NKT cells, $\gamma\delta$ T cells, and mucosa-associated invariant T cells. *J Leukoc Biol* 1–11 (2022).
326. Gianella, S. *et al.* Sex differences in CMV replication and HIV persistence during suppressive ART. *Open Forum Infect Dis* **7**, 1–7 (2020).
327. Takahashi, T. & Iwasaki, A. Sex differences in immune responses in COVID-19. *Science* **371**, 347–348 (2021).
328. Fang, H., Disteché, C. M. & Berletch, J. B. X Inactivation and Escape: Epigenetic and Structural Features. *Front Cell Dev Biol* **7**, 1–12 (2019).
329. Cheng, M. I. *et al.* Sex differences in NK cells mediated by the X-linked epigenetic regulator UTX. *bioRxiv PrePrint*, (2022).
330. Ray, A. L. *et al.* The role of sex in the innate and adaptive immune environment of metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* **123**, 624–632 (2020).