

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**



**“Papel de las células Natural Killer T tipo II sobre la  
modulación de las respuestas de linfocitos B y  
células NKT tipo I”**

**Daniela María Noel Schneider Melgarejo**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

**Director de Tesis**

Prof. Dr. Leandro Javier Carreño Márquez  
Laboratorio de Inmunomodulación  
Programa de Inmunología  
Instituto de Ciencias Biomédicas

**2023**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACION TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS  
BIOMEDICAS**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas presentada por la candidata

**DANIELA MARIA NOEL SCHNEIDER MELGAREJO**

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Biomédicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 20 de enero de 2023.

**Prof. Dr. Leandro Javier Carreño Márquez**

**Director de Tesis**

**Dpto. Inmunología**

**Facultad de Medicina, Universidad de Chile**

**COMISION INFORMANTE DE TESIS**

**PROF. Dra. Daniela Sauma**

**PROF. Dra. Maria Ines Becker**

**PROF. Dr. Juan Pablo Torres**

**PROF. Dra. Maria Carmen Molina  
Presidente Comisión de Examen**

*Esta tesis está dedicada a todas las mujeres de mi familia especialmente a mi mamá Sabina Melgarejo, abuelita Ercira Rivera, abuelita Hilda Álvarez y a todas mis tías Melgarejo Rivera, especialmente a mi tía Gladys Melgarejo. Todas ellas han mostrado fortaleza, resiliencia y el amor más puro a nuestra familia.*

## **Mis agradecimientos a:**

A mi madre que siempre me ha dado fuerza, impulso, ejemplo de resiliencia y de seguir adelante a pesar de las adversidades de su vida.

A mi padre Walter, mis hermanos Paola y Walter y, a mis sobrinos Baru y Zumbi.

A mi gato Jamonchini, perrito Vito y perrita Becky por darme dosis de felicidad y grandes emociones.

A mi sobrina Waira por ser una amiga incondicional que me ha escuchado estos años de preparación de la tesis y me da consejos a pesar de que tenga una corta edad.

A mis compañeros de laboratorio por su apoyo en los experimentos *in vivo* así como a la Sra Ruth en su ayuda técnica y cuidado de los animales.

A mi compañero Richard, el cual desde el primer momento nos apoyamos mutuamente.

A mi compañero Bayron por ser mi compañero de estudio en el doctorado y por ser mi amigo en los años siguientes.

Al Dr. Leandro Carreño por cada oportunidad de corregir un error y haberme facilitado los medios para llevar a cabo todas las actividades durante el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Carolina Ribeiro por su apoyo incondicional en estos últimos años de doctorado. Su ayuda ha sido invaluable.

A la Dra. Gloria Valdés, mi mentora, por siempre creer en mí a pesar de que mi camino en la ciencia no ha sido del todo fácil. He buscado su apoyo siempre desde la tesis de pregrado y siempre ha estado ahí para ayudarme. También a la Sra Eliana Lira, del mismo laboratorio de pregrado, que siempre ha estado en contacto a pesar de que estemos bastante lejos físicamente.

## Indice

Resumen.....	6
Abstract.....	8
Introducción.....	10
Células Natural Killer T: Definición y Clasificación.....	10
Células Natural Killer tipo II: Activación y modulación de las respuestas inmunes.....	12
Las células NKT en la generación de inmunidad humoral.....	15
Inmunoregulación entre las células NKT tipo I y tipo II.....	20
Optimización de la entrega de ligandos de células NKT.....	23
Hipótesis.....	25
Objetivo general.....	25
Objetivos específicos.....	25
Materiales y Métodos.....	26
Resultados.....	32
Identificar ligandos lipídicos que promuevan la activación, in vitro, de células NKT tipo II presentados por células dendríticas derivadas de ratones wild type y Knock-in para CD1d humano pulsadas con lípidos libres o contenidos en liposomas.....	32
Evaluar el efecto de la activación de células NKT tipo II sobre las funciones efectoras de las células NKT tipo I en ratones wild type y Knock-in para CD1d humano tratados con el lípido sulfátido libre.....	37
Evaluar el efecto de la activación de células NKT tipo II sobre las funciones efectoras de las células NKT tipo I y linfocitos B en ratones wild type tratados con el lípido sulfátido libre o contenido en liposomas.....	61
Discusión.....	81
Figuras suplementarias.....	90
Certificado del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales.....	95

## Resumen

Las células Natural Killer T (NKT) reconocen lípidos antigénicos presentados por una molécula tipo MHC de clase I llamada molécula CD1d. La mayor parte de los estudios se han focalizado en un subgrupo de células NKT, células NKT tipo I, que expresan una cadena TCR $\alpha$  invariante y un número limitado de cadenas de TCR $\beta$ . Sin embargo, en los seres humanos, la mayoría de las células NKT expresan cadenas TCR $\alpha$  y  $\beta$  diversas, denominadas células NKT tipo II, por lo que la comprensión de esta población es fundamental para maximizar la inmunoterapia basada en éstas. Las células NKT tipo II poseen importantes propiedades inmunoregulatorias, reaccionan a ligandos lipídicos propios y no propios, y comparten algunas propiedades con las células NKT tipo I y células T convencionales. Las células NKT tipo II juegan un importante rol en la regulación inmune a patógenos, tumores y enfermedades autoinmunes. Un entendimiento de las funciones que poseen las NKT tipo II y su posible modulación inmune puede tener beneficios terapéuticos en diversas enfermedades. Como hipótesis proponemos que las “Células NKT tipo II, activadas *in vivo* con liposomas conteniendo sulfátido (3'-sulfogalactosylceramida), modula la producción de citoquinas por células NKT tipo I y la generación de subclases de IgG por linfocitos B en ratones inmunizados con el antígeno Ovalbumina”. Se encontró que 3'-sulfogalactosylceramida, de ahora en adelante sulfátido, fue capaz de ser presentado tanto por la molécula mCD1d como por hCD1d y estimular los hibridomas de células NKT tipo II. Primero se evaluó la cinética de activación de las células NKT tipo I en el bazo, donde estas se incrementaron a las 1 y 48 horas, llegando a su peak a las 72 horas. Las concentraciones de IL-4 en suero presentaron un peak a las 3 horas y para IFN- $\gamma$  a las 1 y 24 horas luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer. Las concentraciones de IL-4 en suero presentaron un peak a las 72 horas y para IFN- $\gamma$  a las 3 y 48 horas luego de la administración de sulfátido. Luego, se evaluó la capacidad de las células NKT tipo II activadas por el lípido sulfátido de inducir una respuesta inmuno-modulatoria *in vivo* en ratones C57BL/6 y Knock-in para CD1d sobre las células NKT tipo I activadas por  $\alpha$ -Galcer a las 3 y 12 horas de administrado los lípidos. En el ratón hCD1d-KI, sólo la producción de la citoquina IFN- $\gamma$  por las células NKT tipo I se redujo luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer más sulfátido y las demás citoquinas incrementaron su producción (IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, IL-6) en comparación a la administración de solo  $\alpha$ -Galcer. En el ratón hCD1d-KI, IFN- $\gamma$  se redujo e IL-10 e IL-6 se incrementaron por las células NKT tipo II luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer más sulfátido en comparación a la administración de solo  $\alpha$ -Galcer. Posteriormente también se evaluó la modulación de las funciones de las células NKT tipo I y células B por la activación de las células NKT tipo II mediante el uso de liposomas (LP). La cinética de la respuesta inmune humoral de los anticuerpos IgG1, IgG2c, IgG2b e IgG3 mostraron una disminución de la absorbancia luego

de la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer más LP sulfátido en comparación a la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer posterior a la segunda inmunización. La cinética de la respuesta inmune humoral de los isotipos de anticuerpos IgG1, IgG2b, IgG2c e IgG3 mostraron un incremento en la absorbancia luego de la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer más LP OVA sulfátido en comparación a la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer posterior a la segunda inmunización. Las células B secretoras de anticuerpo IgG2c específicas de antígeno OVA provenientes de la medula ósea de ratones C57BL/6 disminuyó significativamente luego de la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer más LP sulfátido en comparación a la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer al día 60 de la primera inmunización (42 días post segunda inmunización). Además, las células B secretoras de anticuerpo IgG2c específicas de antígeno OVA disminuyen significativamente luego de la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer más LP OVA sulfátido en comparación a la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer al día 60 de la primera inmunización (42 días post segunda inmunización). En ratones C57BL/6, las células NKT tipo I en presencia de células NKT tipo II produjeron IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-13, mientras que las células NKT tipo II en presencia de células NKT tipo I produjeron IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-13. Estas cuatro citoquinas promovieron el cambio de isotipo en las células B por las células NKT en ratones C57BL/6. La administración de liposomas conteniendo OVA y  $\alpha$ -Galcer promovieron la generación de los isotipos IgG1, IgG2b, IgG2c e IgG3. En presencia de las células NKT tipo II activadas por sulfátido se produce una reducción en la generación de todos los isotipos por las células B que fueron moduladas negativamente por las células NKT tipo I, dando cuenta de la modulación de las células NKT tipo II sobre las células NKT tipo I. De acuerdo con estos resultados, las células NKT tipo II activadas por el lípido sulfátido fueron capaces de modular las respuestas de las células NKT tipo I activadas por  $\alpha$ -Galcer. Este mecanismo regulatorio promovido por las células NKT tipo II activadas por sulfátido sobre la disminución en la generación de isotipos de anticuerpos IgG producidos por las células B, podría ser utilizado para regular la respuesta inmune en enfermedades autoinmunes. Por otro lado, ambos lípidos  $\alpha$ -Galcer y sulfátido presentan un comportamiento estimulador de la respuesta inmune humoral cuando son administrados a través de liposomas conteniendo el antígeno. De acuerdo con estos resultados, la administración de liposomas conteniendo sulfátido junto con el antígeno podrían ser utilizados como adyuvantes. La comprensión de como inducir y modular los efectos de las células NKT tanto en modelos animales como en humanos es esencial para su uso en enfermedades como en el desarrollo de vacunas.

## Abstract

Natural Killer T (NKT) cells contain antigenic lipids presented by a class I MHC-like molecule called the CD1d molecule. Most studies have focused on a subgroup of NKT cells, type I NKT cells, which express an invariant TCR $\alpha$  chain and a limited number of TCR $\beta$  chains. However, in humans, most NKT cells express diverse TCR $\alpha$  and  $\beta$  chains, termed type II NKT cells, so understanding this population is critical to maximizing NKT-based immunotherapy. Type II NKT cells possess important immunoregulatory properties, react to self and non-self lipid ligands, and share some properties with type I NKT cells and conventional T cells. Type II NKT cells play an important role in immune regulation to pathogens, tumors, and autoimmune diseases. An understanding of the functions of type II NKTs and their possible immune modulation may have therapeutic benefits in various diseases. As hypothesis, we propose that "Type II NKT cells, activated *in vivo* with liposomes containing sulfatide (3'-sulfogalactosylceramide), modulate the production of cytokines by type I NKT cells and the generation of IgG subclasses by B lymphocytes in mice immunized with Ovalbumin". It was found that 3'-sulfogalactosylceramide, here in after sulfatide, was able to be presented by both the mCD1d and hCD1d molecules and stimulate type II NKT cell hybridomas. First, the activation kinetics of type I NKT cells in the spleen were evaluated, where they increased at 1 and 48 hours, reaching their peak at 72 hours. Serum IL-4 concentrations peaked at 3 hours and for IFN- $\gamma$  at 1 and 24 hours after  $\alpha$ -Galcer administration. Serum IL-4 concentrations peaked at 72 hours and for IFN- $\gamma$  at 3 and 48 hours after sulfatide administration. Next, the ability of lipid sulfatide-activated type II NKT cells to induce an immunomodulatory response *in vivo* in C57BL/6 mice and knock-in for CD1d on  $\alpha$ -Galcer-activated type I NKT cells was evaluated 3 and 12 hours after lipid administration. In the hCD1d-KI mouse, only the production of the IFN- $\gamma$  cytokine by type I NKT cells was reduced after the administration of  $\alpha$ -Galcer plus sulfatide and the other cytokines increased their production (IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, IL-6) compared to  $\alpha$ -Galcer alone. In the hCD1d-KI mouse, IFN- $\gamma$  was reduced and IL-10 and IL-6 increased by type II NKT cells following administration of  $\alpha$ -Galcer plus sulfatide compared to administration of  $\alpha$ -Galcer alone. Subsequently, the modulation of the functions of NKT type I cells and B cells by the activation of NKT type II cells using liposomes (LP) was also evaluated. The kinetics of the humoral immune response of the demonstrated IgG1, IgG2c, IgG2b and IgG3 showed a decrease in absorbance after the administration of LP OVA  $\alpha$ -Galcer plus LP sulfatide compared to the administration of LP OVA  $\alpha$ -Galcer after the second immunization. The kinetics of the humoral immune response of the isotypes IgG1, IgG2b, IgG2c and IgG3 showed an increase in absorbance after administration of LP OVA  $\alpha$ -Galcer plus LP OVA sulfatide compared to administration of LP OVA  $\alpha$ -Galcer. after the second immunization. OVA antigen-specific IgG2c antibody-secreting B cells from the bone marrow of C57BL/6 mice were significantly decreased after administration of LP OVA  $\alpha$ -Galcer plus LP sulfatide compared to administration of LP OVA  $\alpha$ -Galcer at day 60 from the first immunization (42 days post second immunization). In addition, OVA antigen-specific IgG2c antibody-secreting B cells are significantly decreased after administration of LP OVA  $\alpha$ -Galcer plus LP OVA sulfatide compared to administration of LP OVA  $\alpha$ -Galcer at day 60 post-first immunization (42 days post second immunization). In C57BL/6 mice, type I NKT cells in the presence of type II NKT cells produced IFN-



$\gamma$ , IL-4, and IL-13, whereas type II NKT cells in the presence of type I NKT cells produced IFN- $\gamma$ , IL-6 and IL-13. These four cytokines promoted isotype switching from B cells to NKT cells in C57BL/6 mice. The administration of liposomes containing OVA and  $\alpha$ -Galcer promoted the generation of IgG1, IgG2b, IgG2c and IgG3 isotypes. In the presence of sulfatide-activated NKT type II cells, there is a reduction in the generation of all isotypes by B cells that were modulated by type I NKT cells, accounting for the modulation of type II NKT cells on NKT type I cells. In agreement with these results, NKT type II cells activated by lipid sulfatide were able to modulate the responses of NKT type I cells activated by  $\alpha$ -Galcer. This regulatory mechanism promoted by sulfatide-activated type II NKT cells on the decrease in the generation of IgG antibody isotypes produced by B cells could be used to regulate the immune response in autoimmune diseases. On the other hand, both  $\alpha$ -Galcer and sulfatide lipids present a behavior that stimulates the humoral immune response when administered through liposomes containing the antigen. According to these results, the administration of sulfatide-containing liposomes together with the antigen could be used as adjuvants. Understanding how to induce and modulate the effects of NKT cells in both animal and human models is essential for their use in disease and vaccine development.

## Introducción

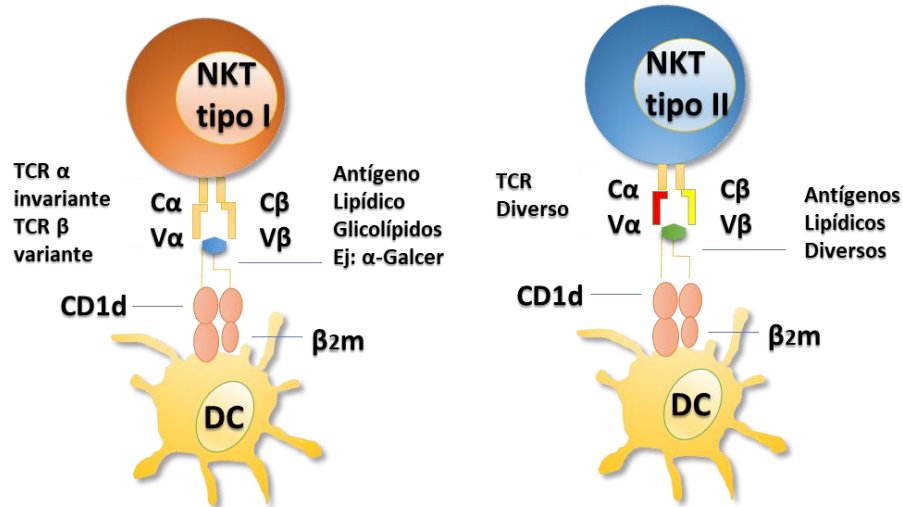
La modulación inmune ha permitido utilizar el sistema inmune del hospedero para lograr prevenir, controlar y posiblemente erradicar enfermedades. Comúnmente, se han utilizado como herramientas inmunomoduladoras, la modulación de la función de las células T CD4, células T CD8, así como células presentadoras de antígenos profesionales (APC), tales como las células dendríticas (DCs), las cuales promueven la activación de las células T. Esta modulación está dirigida al inicio de la respuesta inmune celular, proceso conocido como “*priming*”, el cual no solo promueve la activación y diferenciación de linfocito T, sino que también en la diferenciación de los linfocitos B. Esta respuesta inmune es generada como mecanismo de defensa frente a un antígeno, el cual puede ser reconocido por otros componentes del sistema inmune, los cuales cumplen un rol importante en el priming de los linfocitos T y B, y que hoy en día han tomado especial relevancia como inmunomoduladores de la respuesta inmune. Entre ellos se encuentran: células Natural Killer, macrófagos, células linfoides innatas, células Natural Killer T (NKT), entre otras. Dado que la modulación de los linfocitos T y B, a través del proceso conocido como *priming*, ha sido desafiante experimentalmente y, por otro lado, que otras células inmunes cumplen un rol en la inmunomodulación, se propone investigar el rol de un subtipo de células NKT, células Natural Killer tipo II, dada su habilidad para secretar citoquinas y modular otros tipos de células inmunes.

## Células Natural Killer T: Definición y Clasificación

Se ha demostrado que las células NKT tienen un papel clave en el priming de los linfocitos T, promoviendo la activación y diferenciación de linfocitos T CD4 y T CD8 antígeno-específicos, así como también sobre los linfocitos B, promoviendo la producción de anticuerpos y el establecimiento de células B de memoria [1, 2]. Además, tienen una importante función moduladora en la inducción y/o prevención de enfermedades autoinmunes, inflamatorias y cancerígenas [3].

Las células NKT son células que reconocen antígenos lipídicos a través de su receptor de linfocito T (TCR) presentados por una molécula tipo MHC de clase I, no polimórfica, llamada CD1d, miembro de la familia CD1 [4]. La molécula CD1d se expresa en células mieloides (monocitos, macrófagos, células dendríticas) y en el linaje linfóide (linfocitos B, timocitos, pero no células T maduras) [5]. Hay dos categorías de células NKT restringidas por CD1d [6, 7]: a) células NKT tipo I o invariantes, que expresan una cadena TCR $\alpha$  invariante (V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 en ratones y V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 en humanos) y un número limitado de cadenas de TCR $\beta$  no invariante (V $\beta$ 8, V $\beta$ 7, V $\beta$ 2

en ratones y V $\beta$ 11 en humanos). Las células NKT tipo I se han caracterizado en función de su reactividad al glicolípido  $\alpha$ -galactosilceramida ( $\alpha$ -GalCer) [8, 9]. b) Las células NKT tipo II (también llamadas diversas) usan cadenas TCR $\alpha$  y  $\beta$  diversas y no son reactivas a  $\alpha$ -GalCer, pero reconocen diferentes antígenos lipídicos y glicolípidos asociados a CD1d [10]. En los seres humanos, las células NKT tipo II son más abundantes que las células NKT tipo I [11], haciendo que la comprensión de esta población sea fundamental para maximizar la inmunoterapia basada en células NKT (Figura 1 y Tabla 1).



**Figura 1:** Modo de presentación de glicolípidos a través de la molécula CD1d a células NKT tipo I y tipo II. Una célula presentadora de antígeno, una célula dendrítica (DC), con la ayuda de moléculas CD1d presentes en su superficie, presenta el antígeno glicolípido a una célula NKT. La célula NKT reconoce el ligando adecuado a través de su TCR. Como resultado, la NKT secreta rápidamente citocinas tipo Th1, Th2, Th17, Thfh, Treg.

**Tabla 1: Clasificación de las células NKT**

	NKT tipo I	NKT tipo II
<b>TCR</b>	TCR $\alpha$ invariante (V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 en ratones y V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 en humanos) TCR $\beta$ variante (V $\beta$ 8, V $\beta$ 7, V $\beta$ 2 en ratones y V $\beta$ 11 en humanos)	TCR heterogéneo En ratones TCR $\alpha$ : V $\alpha$ 1, V $\alpha$ 3, V $\alpha$ 8, o V $\alpha$ 11 pareadas con cadenas TCR $\beta$ : V $\beta$ 8 o V $\beta$ 3 V $\alpha$ 4 pareada V $\beta$ 5 o V $\beta$ 11 Familia de TCR oligoclonales: V $\alpha$ 3.2-J $\alpha$ 9/V $\beta$ 8 y V $\alpha$ 8/V $\beta$ 8
<b>Subtipos</b>	CD4+, DN	CD4+, CD8+, DN
<b>Ligandos</b>	$\alpha$ -GalCer	Sulfátido, lysosulfatido, lysofosfatidilcolina
<b>Restricción</b>	CD1d	CD1d
<b>Receptores NK</b>	NK1.1, CD161+	NK1.1, CD161+
<b>Citoquinas</b>	IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ (NKT1), IL-4, IL-6, IL-13 (NKT2), IL-17 (NKT17), IL-10 (NKT10), IL-21 (NKTfh), NKTreg	IL-4, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10

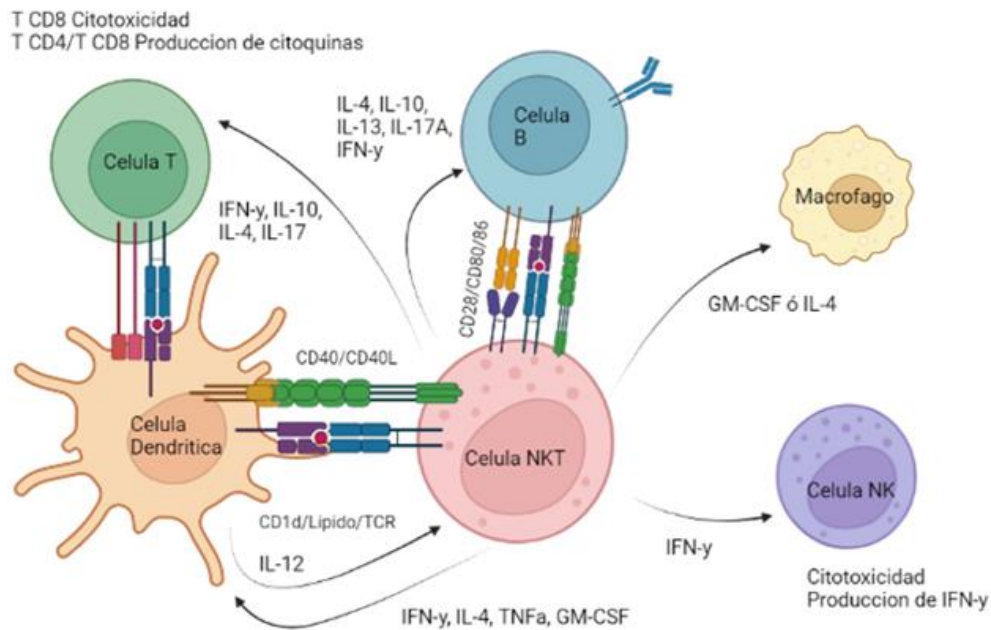
El estudio de las células NKT ha sido difícil, ya que su frecuencia es relativamente baja en sangre, órganos y tejidos linfoides (en ratones corresponden a: 10-30% de las células T hepáticas maduras, 0.2-0.5% de las células de médula ósea, 0.3-0.5% del total de timocitos, 0,5-3% de los esplenocitos totales, 0.1-0.3% de las células de los ganglios linfáticos, 4% de las células T circulantes y un 7% de las células T de pulmón) [12]. Por otro lado, los ratones muestran frecuencias mucho más grandes de NKT totales y presentan proporciones diferentes en la relación NKT I/NKT II en comparación con los seres humanos, lo que ha limitado el estudio de estas células. Para soslayar esta dificultad, se utilizará un ratón parcialmente humanizado para la respuesta de células NKT, el cual consiste en un Knock-in del gen de CD1d humano (hCD1d-KI), y que presenta frecuencias de células NKT comparables a seres humanos, y además sus células NKT tipo II son más prevalentes que las células NKT tipo I. Por otro lado, el estudio de las células NKT tipo II se ha facilitado por el uso de ratones como hCD1d knock-out y V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 Knock-out, donde hCD1d KO carece de todas las células NKT y V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 Knock-out solo presenta células NKT tipo II.

Las células NKT tipo I activadas, pueden modular positiva o negativamente las respuestas inmunes pro- y anti-inflamatorias [13, 14]. Aunque menos estudiadas, las células NKT tipo II pueden también modular la respuesta inmune promoviendo respuestas pro-inflamatorias [15, 16] y respuestas anti-inflamatorias [17], compartiendo funciones con las células NKT tipo I. En contraste a las células NKT tipo I, las células NKT tipo II expresan un repertorio diverso del TCR y las células NKT tipo II pueden reconocer una diversidad de lípidos antigénicos. El primer antígeno en ser descrito como ligando para las células NKT tipo II fue el glicolípido 3'-sulfogalactosylceramida (SO3-3Gal $\beta$ 1Cer), el cual está presente en las membranas de tejidos como la mielina del SNC, páncreas, riñón e hígado [17]. Posteriormente, 3'-sulfogalactosyl ceramida y Lysosulfatido (SO3-3Gal $\beta$ 1Sph) fueron descritos ser reconocidos por las células NKT tipo II humanas restringidas a CD1d [17-19]. A continuación, nos referiremos a 3'-sulfogalactosyl ceramida como sulfátido. Los Lysofosfolipidos son generados desde los fosfolípidos por la acción de fosfolipasas que rompen enlaces acyl-ester, dejando solo una cadena de ácido graso [20]. Estudios han mostrado la asociación de Lysofosfolipidos con moléculas CD1d [21, 22].

### **Células Natural Killer tipo II: Activación y modulación de las respuestas inmunes**

Las células NKT al activarse pueden modular respuestas inmunes en un amplio rango de respuestas pro- y anti-inflamatorias (Figura 2). Las células NKT pueden dirigir su respuesta inmunitaria tipo Th1 (NKT 1), tipo Th2 (NKT 2), tipo Th17 (NKT 17), tipo Thfh (NKTfh) y Treg

(NKTreg) rápidamente debido a que tienen altos niveles de mRNA de IL-4 e IFN- $\gamma$  almacenado [23]. Para las células NKT tipo I, ya han sido descritas diversas citoquinas que son liberadas posteriores a su activación (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  y GM-CSF) [24]. En el caso de las células NKT tipo II, su activación se produce a través de la señalización del receptor TCR luego del reconocimiento del complejo lípido/CD1d [17-19]. Las células NKT tipo II secretan citoquinas pro- y anti-inflamatorias tales como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10, IL-13, entre otras [25]. Su estudio ha sido más limitado debido a que no se ha identificado un solo ligando lipídico que pueda activar a todas estas células, como el caso de  $\alpha$ -GalCer para células NKT tipo I [26, 27]. Datos recientes muestran que estas células NKT tipo II pueden secretar citoquinas tipo Th1, Th2, Th17, Thfh y Treg compartiendo propiedades con las células NKT tipo I [28].



**Figura 2:** Las funciones inmunológicas de las células NKT. Las células NKT pueden interactuar con diferentes tipos de células. El reconocimiento de un antígeno glicolípido, por las células NKT a través de su receptor TCR, sobre la molécula CD1d de una célula dendrítica provoca la activación recíproca tanto de las células NKT como de las células dendríticas. Las células NKT secretan rápidamente una variedad de citoquinas, las cuales influyen en la polarización de células T CD4+ hacia diferentes células T helper (Th) como también a la diferenciación de células T CD8+ precursoras a efectoras y a células B a células plasmáticas secretoras de anticuerpos. La activación de las células NKT y células dendríticas también resulta en la activación de macrófagos y células NK.

Las citoquinas secretadas por las células NKT pueden ayudar a activar a otras células inmunes como células NK, macrófagos, neutrófilos, células B, T CD8 y T CD4. La producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  por células NKT tipo I puede activar los efectos citotóxicos de células NK y T CD8 [29]. La administración sistemática de  $\alpha$ -Galcer en ratones permite la expansión de las células

NK y un incremento de la citotoxicidad [29]. Además, las células NKT tipo I proveen ayuda a las células presentadoras de antígeno a través de IFN- $\gamma$ . La presentación mediada por la DC de  $\alpha$ -Galcer/CD1d permite una interacción recíproca entre la DC y la célula NKT tipo I, donde la célula NKT aumenta la expresión de CD40L y aumenta la liberación de citoquinas, incluyendo GM-CSF [30, 31]. Esto promueve la maduración de la DC y un aumento de la expresión de moléculas co-estimuladoras tales como CD80 y CD86 y producción de IL-12, lo que activa a las células NKT tipo I como también a las células T CD8 [32].

Además, las células NKT tienen dos tipos de efectos en las respuestas inmunitarias innatas mediadas por IL-1 $\beta$  al producir IL-4 y GM-CSF. IL-1 $\beta$  es una potente citoquina inflamatoria involucrada en varios procesos inflamatorios y enfermedades, Entre las citoquinas secretadas por las células NKT, GM-CSF mejora la producción de IL-1 $\beta$  por parte de los macrófagos y su diferenciación M1 (pro-inflamatoria) mediante la regulación de la expresión de pro-IL-1 $\beta$  mediada por LPS, mientras que la IL-4 mejora la diferenciación M2 (anti-inflamatoria) de los macrófagos y disminuye la producción de IL-1 $\beta$  [33].

Las células NKT tipo II murinas son capaces de inhibir las funciones pro-inflamatorias de las células NKT tipo I, células T convencionales y células DCs [34-36]. Las células NKT tipo II estimuladas por sulfátido, presenta un rol inmunosupresor en modelos de animales de varias enfermedades autoinmunes. La administración de sulfátido *in vivo* previno la aparición de la enfermedad en un modelo de encefalitis autoinmune experimental inducida por Th1, sugiriendo que las células NKT tipo II tienen una gran función inmunoreguladora [17]. Otros estudios han informado sobre el papel inmunosupresor de las células NKT tipo II [16, 37]. El papel de las células NKT tipo II restringidas por CD1d en la regulación de la inmunidad tumoral ejercen regulación negativa, mientras que se ha encontrado la protección mediada por células NKT tipo I reactivas a  $\alpha$ -Galcer [16]. Las células NKT tipo II se activan en respuesta a antígenos virales de la hepatitis B en un modelo de ratón transgénico de infección aguda por el virus de la hepatitis B [15]. En este modelo, las células NKT tipo II pueden causar daño a las células hepáticas y reclutar células inflamatorias. Por lo tanto, las células NKT de tipo II pueden tener la capacidad de inducir la inflamación. Las células NKT (tipo I y tipo II) desempeñan un papel fundamental en la modulación inmunitaria.

A través de estas interacciones, las células NKT y las células dendríticas cooperan para amplificar y dirigir las respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas siendo importantes para el desarrollo de adyuvantes [3, 38].

Las células T convencionales y las células NKT presentan diferencias en relación con la cinética de respuesta a la estimulación. Las células NKT presentan una actividad funcional dentro

de horas, mientras que varios días para las células T convencionales [39]. Las células NKT tienen almacenado ARNm de citoquinas preformadas que permiten la liberación rápida de grandes cantidades luego de ser comprometido su TCR [23].

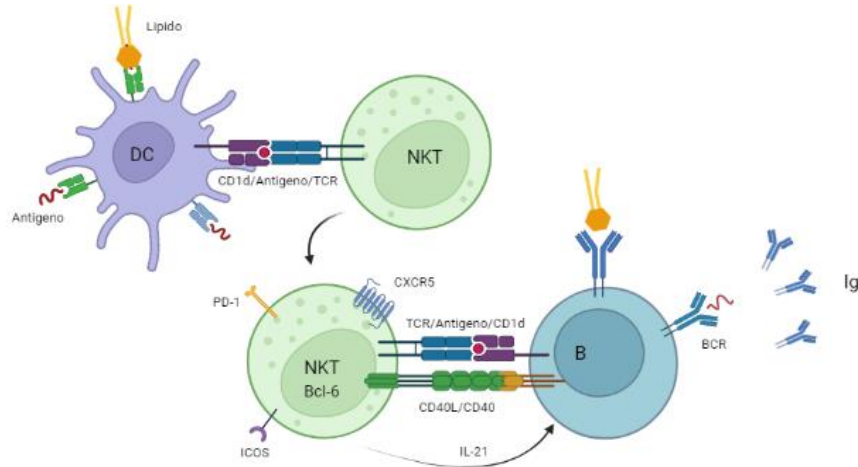
### **Las células NKT en la generación de inmunidad humoral**

Las células NKT son contribuyentes importantes a las respuestas de anticuerpos específicos de antígeno. Por lo que existe un interés por el diseño de estrategias para activar y modular a las células NKT y potenciar las respuestas de anticuerpos en las vacunas. Se ha apreciado que tanto las interacciones directas, célula-célula (mecanismo que envuelve interacciones directas con células B vía presentación de antígeno por CD1d), como no directas (producción de citoquinas, mecanismos que envuelven interacciones con DCs cargadas con antígeno), entre las células B que expresan CD1d y las células NKT, son capaces de impulsar las respuestas de anticuerpos (Figura 3). Por lo tanto, las células NKT activadas pueden actuar como células auxiliares con la capacidad de proporcionar señales moleculares a células dendríticas y células B, que facilitan las respuestas a las células T y generación de anticuerpos, respetivamente. También se ha observado que la activación de las células NKT puede ayudar a la diferenciación de las células T de memoria presentes en los tejidos [40].

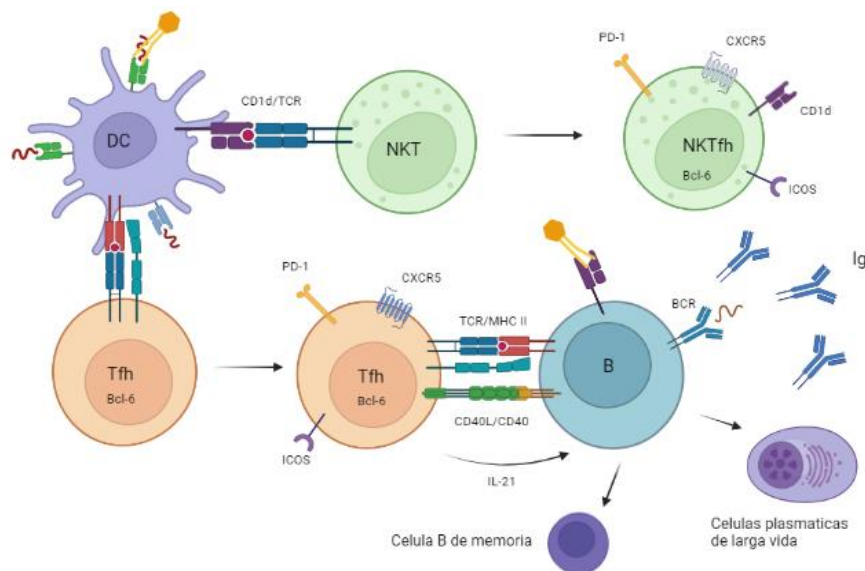
Las células B pueden capturar el antígeno foráneo exógeno CD1d-Ag de diferentes formas. En concentraciones altas, el CD1d presente en la superficie celular puede cargar el antígeno directamente [41, 42]. En concentraciones bajas, el tráfico intracelular de Ag a vesículas MHC clase II es generalmente necesario para la carga y presentación eficiente [43-50]. El glicolípido de unión a CD1d puede ser capturado directamente por el receptor de célula B (BCR) e internalizado en endosomas que contienen CD1d [51-53]. El procesamiento vacuolar conduce a la presentación de péptidos en moléculas MHC de clase II a las células T CD4, aunque el procesamiento puede conducir a presentación cruzada a través de moléculas MHC de clase I a células T CD8 [54]. La capacidad de las células dendríticas para estimular la proliferación y diferenciación de las células T, requiere de su activación que puede ser desencadenada a través del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos o asociados a daño liberados por células dañadas. En respuesta a estas señales, las células dendríticas aumentan la presentación del péptido a través de su MHC y co-expresando moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86 como también el incremento en la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-12 e IFN, estimulando la respuesta T efectora contra el péptido [55, 56]. Las células T al

estimularse, las células T CD8 se diferencian hacia células T citotóxicas y la ayuda por parte de las células T CD4 es mediada por la interacción CD40L/CD40 [57, 58].

a) Ayuda directa de la célula NKT para la generación de las respuestas humores por la célula B



b) Ayuda indirecta de la célula NKT para la generación de las respuestas humores por la célula B



**Figura 3:** Interacción directa e indirecta entre las células NKT y células B que ayuda en la generación de una respuesta inmune humoral. a) Los antígenos lipídicos y peptídicos se ponen en contacto con células DCs, que los internalizan y presentan en moléculas de CD1d y MHC II, respectivamente. Las células NKTfh migran a la zona B y les brindan ayuda a las células B que han procesado antígenos lipídicos y peptídicos a través de la internalización por su BCR y presentados en moléculas CD1d (lípidos) y MHC clase II (péptidos). La célula NKTfh provee de ayuda dependiente de CD1d, CD40L e IL-21 a la célula B. b) El reconocimiento de los complejos CD1d/lípido activa a las células NKT, que activan y autorizan las funciones de presentación de antígenos por parte de las células B a través de la interacción CD40L-CD40. A su vez, las DCs activan de manera eficiente las células Tfh CD4+ que son específicas para el antígeno peptídico coadministrado. Estas migran al borde de la zona T/B y brindan ayuda a las células B afines. Tras la activación por las células DCs, las células NKT adquieren un fenotipo helper folicular.



A través de la ayuda indirecta que provee la célula NKT a la célula B, tanto el lípido  $\alpha$ -Galcer como el antígeno deben ser adquiridos primero por las células dendríticas para impulsar una respuesta de la célula T CD4 antígeno específica. Estas células T pueden diferenciarse hacia células T CD4 helper foliculares (Tfh) que entran a la zona de células B de los tejidos linfoides para interactuar con las células B, que expresan receptores de células B específicos para el antígeno (BCR); esta interacción es facilitada por la capacidad de las células B para internalizar la proteína, procesarla y ser presentada vía MHC de clase II. Las señales entregadas en esta interacción clásica a las células T conducen a la formación de centros germinales, cambio de clase de las inmunoglobulinas, diferenciación a células B de memoria y establecimiento de células plasmáticas de larga vida que producen anticuerpos [59, 60]. El rol indirecto de las células NKT proviene de estudios en donde los factores solubles derivados de las células NKT apoyan la estimulación de la célula B [61]. Sin embargo, también se ha demostrado que una proporción de células NKT pueden adoptar un fenotipo tipo T helper folicular (NKTfh) promoviendo la ayuda directa a células B. Posterior a la inmunización de ratones con antígenos, las células NKT interactúan con células dendríticas expresando CD1d y exhiben una aumentada expresión del factor de transcripción factor Bcl6, el cual es necesario para la diferenciación de las células Tfh y secretan la citoquina IL-4, IL-21 e IFN- $\gamma$  [62, 63]. También expresan PD-1, ICOS, CD40L y CXCR5, un receptor de quimioquina que facilita la entrada a la zona celular B. Por lo tanto, las células NKTfh han demostrado proveer ayuda directa a las células B que presentan agonistas vía CD1d [43].

Los anticuerpos son capaces de responder a un patógeno en particular. Tienen dos funciones principales: la unión del antígeno a través de su parte Fab y, la activación de células a través de su parte carboxilo terminal Fc. Los anticuerpos pueden ser reconocidos por las células del sistema inmunológico a través de receptores específicos para su parte Fc, llamados Fc (FcR). La interacción de los FcR con los anticuerpos activa varias funciones en muchas células del sistema inmunológico (macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas, plaquetas, células B, células NK). Estas funciones incluyen a la fagocitosis, citotoxicidad dependiente de anticuerpos, generación del estallido respiratorio, degranulación, y producción de mediadores inflamatorios y citoquinas [64].

Los tipos de anticuerpos producidos por los linfocitos B, conocidos como isotipos, poseen diferentes funciones inmunes. Los isotipos IgG son importantes para el control de infecciones bacterianas y virales, estando también involucrados en la patología de enfermedades autoinmunes [46]. El isotipo IgE es importante para la eliminación de parásitos, y patológicamente está involucrado en la patogenia de enfermedades alérgicas [46]. El isotipo IgA es crucial para la

inmunidad de mucosas y también está involucrada en desordenes autoinmunes [46]. Debido al importante rol de los anticuerpos, la modulación de los linfocitos B, es clave para el tratamiento de varias enfermedades.

Numerosos estudios han demostrado que la mayoría de los cambios de isotipo es promovida por citoquinas particularmente TGF $\beta$ , IFN- $\gamma$  e IL-4 en el microambiente inmediato de la célula B activada. Después de la estimulación antigénica, las células B IgM+ IgD+ virgen, pueden sufrir un cambio de isotipo para producir IgG, IgA o IgE mientras conservan su especificidad Ag [65]. Por lo tanto, el cambio permite que las células B alteren su función efectora, contribuyendo así a la diversidad de la respuesta inmune humoral [65]. Se ha observado *in vitro* que el cambio de isotipo por parte de las células B estimuladas por señales dependientes de T, requiere tanto de la interacción por CD40 como de una segunda señal instructiva proporcionada por una citoquina derivada de células T [66]. Por lo tanto, las células T activadas desempeñan un papel fundamental en el proceso de cambio de isotipo de inmunoglobulina al proporcionar estas señales a la célula B a través de la expresión transitoria del ligando CD40 (CD40L) y la producción de varias citocinas [67]. Tanto en ratones como humanos, las citoquinas específicamente inducirían un tipo de isotipo en particular. En murinos, se han descrito 3 citoquinas que han mostrado iniciar los eventos moleculares asociados al cambio de isotipo: IL-4, IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$  [65, 66]. IL-4 induce cambio de isotipo a IgG1 e IgE; IFN- $\gamma$  hacia IgG2a y, TGF- $\beta$  hacia IgG2b e IgA. El LPS induce cambio de isotipo a IgG3, por lo que la producción de este isotipo sería a través de la estimulación con antígenos no-dependientes de linfocitos T [68]. Se ha evidenciado que hay una jerarquía de citoquinas que inducen el cambio de isotipo a través de estudio *in vitro*, donde IFN- $\gamma$  es dominante sobre IL-4 y, donde ambos IFN- $\gamma$  como IL-4 son dominantes sobre TGF- $\beta$ . Presumiblemente este orden de jerarquía es el resultado de la adaptación a agentes infecciosos con diferente virulencia. IFN- $\gamma$  se encuentra asociado con respuestas inmunes a infecciones virales mientras que IL-4 está envuelta con respuestas inmunes a parásitos helmintos [68].

Las células B que encuentran el antígeno, proliferan rápidamente y se lleva a cabo la hipermutación somática. Durante este proceso se producen mutaciones aleatorias en los dominios variables del BCR gracias a la enzima desaminasa de citidina inducida por activación (AID). El fin de un centro germinal es producir células B con un BCR de alta afinidad para el antígeno inicial. Las células B abandonan los centros germinales como células plasmáticas de alta afinidad y células B de memoria. Las primeras secretan anticuerpos específicos frente a su antígeno durante semanas y migran a la médula ósea, donde pueden residir de forma indefinida, listas para encontrarse con el antígeno y responder muy rápidamente [69]. Las células B de

memoria circulan por todo el organismo en busca de los antígenos, respondiendo también muy rápido e impidiendo la infección [70, 71]. Las células plasmáticas de larga vida secretoras de IgG también persisten en ausencia de su antígeno [69]. Las células plasmáticas de larga vida son clave para mantener la inmunidad humoral a largo plazo después de la infección o la vacunación. Persisten en ausencia de antígeno durante décadas después de la exposición original [69]. Aunque existen en múltiples órganos linfoides, la médula ósea es el hogar de la mayoría de las células plasmáticas en ratones [71, 72]. El bazo, incluyendo la zona marginal, es el principal reservorio para las células B de memoria tanto en murinos como humanos [73].

Varias publicaciones han relacionado las células NKT con la regulación de las células B y las respuestas de anticuerpos contra alérgenos y antígenos parasitarios, bacterianos y virales. Gran parte de los estudios sobre su rol se han derivado de estudios de alergia. La sensibilización de ratones por administración subcutánea de ovoalbúmina (OVA) seguido del desafío de las vías respiratorias con OVA induce el asma experimental. En este modelo, los ratones deficientes en NKT habían reducido el reclutamiento de eosinófilos, la producción de citoquinas, edema y producción de IgE específica de OVA en comparación con controles Wild-type [74, 75].

El ligando  $\alpha$ -Galcer tiene un efecto adyuvante en las respuestas humorales a antígenos T-dependiente y T-independiente [44]. Las respuestas de anticuerpo específicas anti-OVA y Hemocianina de lapa californiana (KLH) fueron considerablemente mejores por la co-administración con  $\alpha$ -Galcer durante la vacunación. En ratones C57BL/6,  $\alpha$ -Galcer indujo un incremento en la absorbancia de los isotipos y de células de memoria [43, 44, 76]. Por el contrario, en ratones CD1d  $-/-$  (carecen de NKT tipo I y II) o ratones  $J\alpha 18 -/-$  (carecen de células NKT tipo I),  $\alpha$ -Galcer no pudo potenciar las respuestas de anticuerpos. En un enfoque similar a las vacunas conjugadas (nanopartículas liposomales) ha mostrado que la conjugación directa de polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* a  $\alpha$ -GalCer estimula a las células NKTfh a promover la generación de células B de memoria antígeno-específicas de larga vida en ratones, permitiendo el desarrollo de una potente inmunidad frente al polisacárido y protección a la neumonía posterior al desafío [77].

Por otro lado, se ha evidenciado que las células NKT tipo II son requeridas para la generación de isotipos de anticuerpos antígeno-específicos, IgG1 e IgG3, cuando ratones fueron inmunizados con el hapteno 4-hidroxi, 3- nitrofenol acetil (NP) conjugado a KLH en presencia de alumina y, las células T helper secretaron IL-4 por transactivación de las células NKT tipo II [78]. Además, las células NKT tipo II constituyen un fenotipo T helper folicular en la enfermedad de Gaucher. Este corresponde a un trastorno metabólico debido a la deficiencia de la enzima  $\beta$ -glucosidasa ácida, que conduce a la formación de esfingolípidos lisosómicos como  $\beta$ -

glucosilceramida (BGL1) y glucosilfosfingosina (LGL1). La activación de las células NKT tipo II condujo a la producción de IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos. Esta acumulación de lípidos promovió además la activación de células B [17, 79]. Esto revela que ligandos lipídicos en la inflamación y cáncer pueden ser reconocidos por las células NKT tipo II y estimular la inmunidad humoral [79]. Por lo tanto, las células NKT pueden estimular la producción de anticuerpo y células B de memoria actuando como células helper no convencionales [2, 42-45].

Dado el alto grado de polimorfismo inter-individual en la molécula de MHC, a pesar que se induzca una apropiada calidad de respuesta a las células T, no se puede asegurar que ocurra en todos mediante la vacunación [40]. Además, se sabe que la diversidad del TCR disminuye con la edad [80, 81] lo que puede conducir a que se generen gaps y por lo tanto los antígenos específicos no puedan ser reconocidos [82, 83]. Debido a que el TCR de las células NKT es en gran medida invariante y el polimorfismo en la molécula CD1d es bajo, su función como célula helper podría activarse en todos los individuos, por lo que es clínicamente relevante para ser usadas en la generación de vacunas.

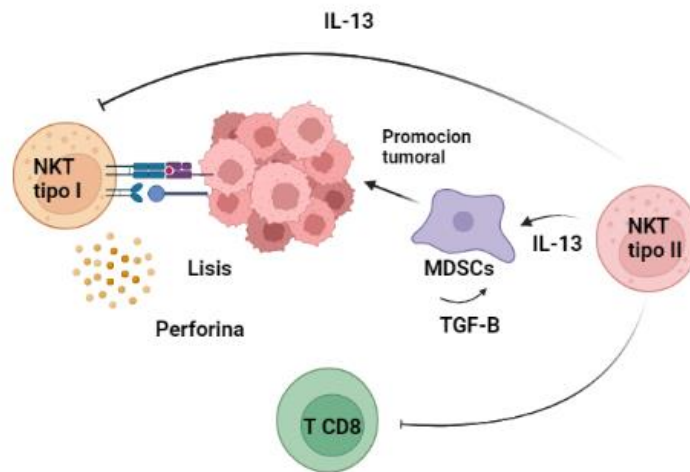
### **Inmunoregulación entre las células NKT tipo I y tipo II**

Las células NKT tipo I pueden regular la función de las células NKT tipo II, y viceversa [37]. En los cánceres gastrointestinales, las células NKT pueden contribuir a la inmunidad antitumoral o protumoral según el perfil de citoquinas expresado y el tipo de cáncer. Las funciones antitumorales de las células NKT tipo I dependen principalmente de su capacidad para secretar la citoquina Th1 IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  [84, 85]. Esto contrasta con el papel de las células NKT tipo I en la protección contra la autoinmunidad, que depende de las citoquinas Th2 IL-4 e IL-13 [86]. Las células NKT también pueden promover la inmunidad tumoral al inducir a las células dendríticas (DC) a producir IL-12, que estimula potentemente las células NK y la producción de IFN- $\gamma$  [87].

Las células NKT tipo II cuando son estimuladas por sulfátido, disminuyen la protección tumoral inducida por las células NKT tipo I estimuladas con  $\alpha$ -GalCer [16, 37, 88]. Por lo tanto, las células NKT tipo I y tipo II forman un eje regulador en el que se regulan de forma cruzada entre sí y el que domina puede establecer el tono para las respuestas posteriores de las células T convencionales [37]. La regulación cruzada entre las células NKT de tipo I y tipo II puede extenderse a otras células inmunitarias como por ejemplo entre las células T CD4+ Th1 y Th2 [89].

Además, la activación de células NKT tipo II con sulfátido no induce la activación de células B, NK o T [90]. Por lo tanto, el estudio de células NKT tipo II después de la activación con sulfátido ha descubierto una vía inmunoreguladora dominante que se ha demostrado que está involucrada en la protección contra la lesión por isquemia/reperfusión hepática (IRI) [91], diabetes tipo [92] y encefalomiелitis autoinmune experimental [17].

Por ejemplo, las células NKT tipo II mejoran las funciones promotoras de tumores de las MDSC (myeloid-derived suppressor cells) a través de IL-13, mientras que las células NKT tipo I suprimen los efectos protumorales de las MDSC al convertirlas en APC inmunoestimuladoras [93]. Los efectos contradictorios de las células NKT tipo I y II con respecto a las células T CD8+ en el cáncer son bastante evidentes. Las células NKT tipo I pueden activar las células T CD8+ y aumentar su resistencia contra MDSC, mientras que las células NKT tipo II suprimen la actividad antitumoral de las células T CD8+ [94-96]. Debido a la relación entre las células T CD8+ y células NKT tipo II, el equilibrio entre los dos subconjuntos juega un papel importante en la inmunidad tumoral (Figura 4).

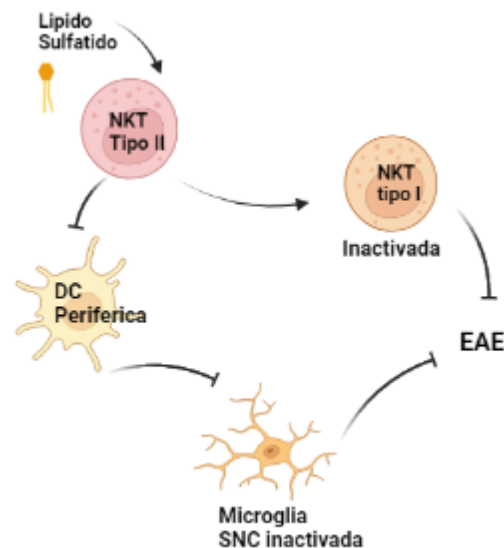


**Figura 4:** Interacciones y regulación entre las células NKT tipo I y células NKT tipo II en el microambiente tumoral. La principal citoquina de las células NKT tipo I que ayuda a activar a las DCs y las células T CD8+ es el interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Las células NKT tipo I y las DC se activan recíprocamente a través de las interacciones CD1d-TCR/antígeno lipídico y CD40-CD40L. Los factores derivados de las células DCs maduras, así como los receptores co-estimuladores, pueden activar las células T CD8+ para promover la inmunidad adaptativa. La supresión de la inmunidad tumoral mediada por NKT tipo II es ejercida por la elevada producción de citoquinas IL-13 e IL-4 capaces de sesgar la respuesta de citoquinas predominantemente hacia el tipo Th2, promotor de tumores. En un modelo de ratón de fibrosarcoma, se demostró que las células NKT tipo II suprimen las células T citotóxicas a través de la producción de IL-13 e inducen a las MDSC que produzcan la citoquina inmunosupresora TGF- $\beta$ .

Las células NKT tipo I y tipo II tienen funciones opuestas en el mantenimiento de la tolerancia inmune y las enfermedades inflamatorias en el hígado. En contraste con el papel predominantemente proinflamatorio de las células NKT tipo I en el daño hepático, las células NKT

tipo II pueden suprimir la respuesta proinflamatoria inducida por las células NKT tipo I y, en consecuencia, proteger contra el daño hepático [35].

Después de la administración de sulfátido, CD1d aumenta en las DCs plasmocitoides, pero no en las DCs convencionales, lo que da como resultado la activación de las células NKT tipo II reactivas a sulfátido, la producción de IL-12 y proteína inflamatoria de macrófagos-2, que a su vez conduce al reclutamiento de células NKT tipo I en el hígado. Estas interacciones celulares conducen a la tolerancia de las DCs convencionales y la inducción de anergia en las células NKT de tipo I reclutadas [97]. Tanto las células NKT tipo I anérgicas como las DCs convencionales secretoras de IL-10 también inhiben la inmunidad adaptativa después de la activación de las células NKT tipo II mediada por sulfátido al suprimir el estallido de citoquinas y el reclutamiento de neutrófilos en el hígado, lo que atenúa la hepatitis inducida por concanavalina A [97].



**Figura 5:** La función inmunorreguladora de las células NKT tipo II en la supresión de EAE. Las células NKT tipo I han demostrado que el sulfatido induce tolerancia en las DCs periféricas y en la microglía residente en el SNC.

Las células NKT tipo II regulan la función de las células NKT tipo I y modulan las respuestas inmunitarias protectoras contra la autoinmunidad. Las células NKT tipo I activadas por glicolípidos contribuyen junto con las células MDSC a proteger a los ratones contra la encefalomiелitis autoinmune experimental. Las citoquinas liberadas por células NKT tipo I activadas (IL-4, GM-CSF e IFN- $\gamma$ ) y moléculas de MDSC (IL-10, arginasa-1 y NO sintetasa inducida) están involucradas en este efecto protector. La protección proporcionada por  $\alpha$ -GalCer contra EAE es posible por su capacidad para suprimir las respuestas Th1 antígeno-específicas o mediante el desarrollo de respuestas Th2 antígeno-específicas de mielina [98]. Se ha demostrado

además que la protección contra EAE mediada por sulfátido requiere de la presencia de las células NKT tipo I [99]. Estudios similares han demostrado que el sulfátido induce tolerancia en células DCs periféricas y microglías residentes en el SNC. Como resultado, las células dendríticas tolerogénicas podrían tener efectos protectores frente a EAE tras la transferencia adoptiva [100]. Existiría por lo tanto una vía inmunoreguladora que implica interacciones entre células NKT tipo II reactivas a sulfátido, NKT tipo I anérgicas, DCs tolerogénicas y microglías en la supresión de la EAE [100].

Una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en la regulación cruzada entre los subconjuntos de células NKT tipo I y tipo II es crucial para el desarrollo de estrategias para manipular el resultado de la respuesta inmune en las enfermedades en humanos.

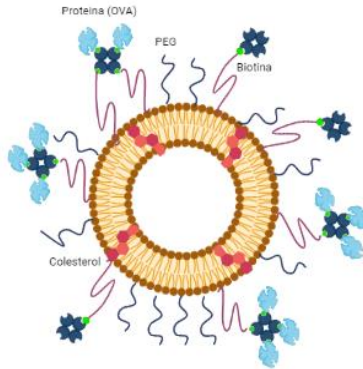
Es interesante además que las células NKT tipo II pueden prevenir el desarrollo de la diabetes mellitus tipo I (T1D). La sobreexpresión de TCR V $\alpha$ 3.2 y V $\beta$ 9 restringidos a CD1d, en ratones NOD, indujo una alta frecuencia de células NKT tipo II que producían niveles altos de IFN- $\gamma$  y niveles bajos de IL-4, y condujo a la protección contra T1D [101]. Se ha propuesto que la estimulación de las células NKT tipo II con sulfátidos C24:0 o C24:1 protege a los ratones NOD de la diabetes de una manera dependiente de CD1d [92]. La activación de las células NKT tipo II podría inhibir la proliferación de células T diabetogénicas autorreactivas y la producción de citoquinas en los linfonodos pancreáticos [92].

### **Optimización de la entrega de ligandos de células NKT**

Una de las limitaciones para el uso de ligandos lipídicos y glicolípidos en forma libre en inmunoterapias basadas en células NKT tipo I, ha sido la existencia de efectos indeseables tal como toxicidad hepática en murinos [46] y en humanos [102]. La activación prolongada de las células NKT tipo I con agonistas lipídicos, particularmente luego de la administración repetida, generó además anergia en las células NKT tipo I [103-105]. Si bien esto ha sido descrito en las células NKT tipo I, podría ocurrir en las células NKT tipo II. Esto ha motivado el desarrollo de métodos alternativos que eviten estos problemas.

Los liposomas han sido utilizados como plataformas de administración de fármacos o como adyuvantes durante varias décadas. Consisten en vesículas artificiales pequeñas de forma esférica que pueden ser creados por colesterol y fosfolípidos naturales (Figura 5). Varios estudios han utilizado liposomas con el objetivo de disminuir la toxicidad del fármaco y/o dirigidas a células específicas [106-108]. Se destaca el estudio sobre el uso de liposomas modificados, donde la terapia antitumoral mediada por el lípido antigénico  $\alpha$ -Galcer mejoró, activando a las células NKT

tipo I y la generación de grandes cantidades de IFN- $\gamma$  [109]. Se observó la acumulación de liposomas modificados en el bazo y un efecto terapéutico en contra de las células de melanoma debido a la optimización de la presentación antigénica a CD1d de APCs, lo que incremento la población de células NKT [109].



**Figura 6:** Ilustración de estructura de liposoma conteniendo polietilenglicol (PEG) y proteína OVA en su superficie utilizado como plataformas de administración en esta tesis.

En vacunas en las que se ha encapsulado el antígeno y agonistas dentro de nanovectores, sistemas de transporte para asegurar la entrega del antígeno y adyuvante al mismo tiempo *in vivo*, para estimular la inmunidad humoral, produjo una activación superior de las células NKT que  $\alpha$ -Galcer soluble, sin inducir anergia. Esto se tradujo en una mayor activación de las células B y respuestas con absorbancias altas de IgM e IgG específicas de antígeno que se mantienen a largo plazo [110].

Considerando las evidencias planteadas tales como:

La administración de sulfátido *in vivo* previno encefalomiелitis autoinmune experimental inducida por Th1, sugiriendo que las células NKT tipo II tienen una gran función inmunoreguladora. Las células NKT activadas pueden actuar como células T helper con la capacidad de proporcionar señales moleculares a células dendríticas y células B, promoviendo las respuestas de células T y en la generación de anticuerpos, respetivamente. En ratones tratados con sulfátido hay una reducción en la proliferación de células NKT tipo I tras la exposición de esplenocitos con  $\alpha$ -Galcer. Nos preguntamos si el estímulo de las NKT II con determinados lípidos contenido en liposomas estimularían directamente a las NKT II y tendría efectos sobre las funciones de las NKT I y células B y, produciría cambios de clase específicos, lo que podría ser clave para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.



## **Hipótesis**

Células NKT tipo II, activadas *in vivo* con liposomas conteniendo sulfátido (3'-sulfogalactosylceramida), modulan la producción de citoquinas por células NKT tipo I y la generación de subclases de IgG por linfocitos B en ratones inmunizados con el antígeno ovalbumina.

## **Objetivo general**

Evaluar la activación de las células NKT tipo II por diferentes ligandos lipídicos y liposomas conteniendo lípidos sobre el efecto de las funciones de las células NKT tipo I (liberación de citoquinas) y linfocitos B (producción de anticuerpos).

## **Objetivos específicos**

1. Identificar ligandos lipídicos que promuevan la activación, *in vitro*, de células NKT tipo II presentados por células dendríticas derivadas de ratones wild type y Knock-in para CD1d humano pulsadas con lípidos libres o contenidos en liposomas.
2. Evaluar el efecto de la activación de células NKT tipo II sobre las funciones efectoras de las células NKT tipo I en ratones wild type y Knock-in para CD1d humano tratados con el lípido sulfátido libre.
3. Evaluar el efecto de la activación de células NKT tipo II sobre las funciones efectoras de las células NKT tipo I y linfocitos B en ratones wild type tratados con el lípido sulfátido libre o contenido en liposomas.

## **Materiales y métodos**

### **Animales**

Ratones C57BL/6 fueron obtenidos del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP). Los ratones Knock-in C57BL/6 hCD1d fueron donados por Albert Einstein College of Medicine, USA. Los ratones C57BL/6 OT-I fueron donados por el laboratorio de la Dra. Fabiola Osorio. Los ratones fueron mantenidos a ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, 55% de humedad relativa y a una temperatura de 21 °C en condiciones específicas en el bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Todos los trabajos con animales fueron realizados de acuerdo con las normas institucionales de bioética y bioseguridad establecidas por el ICBM y CONICYT. El uso de los animales usados en esta tesis se enmarca en el protocolo aprobado del Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile código CBA 1032.

### **Cultivo celular**

#### **Células dendríticas derivadas de células progenitoras de la medula ósea de ratones C57BL/6 y C57BL/6 Knock-in para CD1d.**

A partir de ratones C57BL/6 y Knock-in para CD1d humano se colectaron fémures y tibias, y se mantuvieron en PBS (C57BL/6 N=6; hCD1d-KI N=6). La medula ósea se obtuvo mediante la perfusión con medio RPMI 1640 (Gibco, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; Gibco, USA), 1% de solución de antibióticos penicilina/estreptomicina 100X (Gibco, USA), 1% de solución tampón HEPES 100X (Gibco, USA), 1% de solución de piruvato 100X (Gibco, USA), 0,5% de solución de aminoácidos no esenciales 100X (Gibco, USA), y 0,1% de  $\beta$ -mercaptoetanol (Gibco, USA). Se sometió a centrifugación a 1500 rpm por 5 min y el pellet se resuspendió en 1 ml de buffer de lisis de glóbulos rojos y se incubó durante 5 min, posterior a este tiempo se llevó a 10 ml con PBS y se centrifugó nuevamente. La resuspensión del pellet se realizó en medio RPMI-1640 suplementado a 37°C hasta obtener una concentración de  $1 \times 10^6$  células viables/mL y estas se sembraron a  $3 \times 10^6$  células/pocillo con 10 ng/mL de GM-CSF recombinante (Preprotech, USA) en placas de 6 pocillos de fondo plano y se incubaron a 37°C, atmósfera 5% CO<sub>2</sub> y 100% humedad. Al segundo, cuarto, sexto día de cultivo, se añadieron 2 mL de medio RPMI suplementado junto con GM-CSF a una concentración final de 10 ng/mL. El séptimo día de cultivo, se cosecharon las células empleando cell scraper [111].

#### **Hibridoma de células NKT tipo I y NKT tipo II**

El hibridoma de células NKT tipo II, XV19, reactivo a sulfátido fue cultivado en medio RPMI suplementado y el hibridoma de células NKT tipo I, K2C10 fue cultivado en medio DMEM suplementado, a 37°C, con atmósfera 5% CO<sub>2</sub> en flasks para cultivo de suspensión celular de T25 y T75 [17].

## **Esplenocitos de ratones transgénicos OT-1**

Se obtuvo el bazo a partir de ratones transgénicos OT-1, el cual se disgregó y homogenizó con los extremos esmerilados de dos portaobjetos en 5 ml de RPMI suplementado (ratón OT-1 N=3). La suspensión resultante se filtró con cell strainer (Falcon) y se recolectó en un tubo cónico de 50 ml, luego se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min a 4°C. El pellet se resuspendió en 2 mL de buffer de lisis de glóbulos rojos, y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Luego, se llevó a un volumen final de 10 mL con PBS y se centrifugó. Finalmente el pellet se resuspendió en medio RPMI-1640 suplementado [95, 112].

## **Lípidos**

Los lípidos activadores de células NKT tipo II utilizados fueron: sulfatides (131305P, Avanti), Lyso-Sulfatide ammonium salt (ab144127), Mono-sulfo galactosyl (27náli) ceramide (C24:1 860871P, Avanti), Sphingosylphosphorylcholine (Lyso SM d18:1 860600P, Avanti), 1-O-octadecyl-2-hydroxy-*sn*-glycero -3-phosphocholine (Lyso PAF C18 878120P, Avanti), L- $\alpha$ -lysophosphatidylethanolamine (Lyso PE 860081P, Avanti) y L- $\alpha$ -lysophosphatidylcholine (Lyso PC 830071P, Avanti). El lípido activador de célula NKT tipo I utilizado fue  $\alpha$ -Galcer (KRN7000, Avanti).

## **Preparación de Liposomas**

La preparación de los liposomas utilizados en los co-cultivos *in vitro* fue el siguiente. Se utilizó fosfatidilcolina de huevo (EPC, 659 nmoles), Colesterol (Chol, 304 nmoles), DSPE-PEG (2000, 50,7 nmoles) y 100 ug de los respectivos lípidos activadores de células NKT tipo II. La preparación de los liposomas conteniendo OVA utilizados en los ensayos *in vitro* e *in vivo* contenían: fosfatidilcolina de huevo (EPC), Colesterol (Chol), DSPE-PEG (2000), Biotinyl Cap PE,  $\alpha$ GC (KRN7000), C24:1 Mono-Sulfo GalCer y  $\alpha$ -Galcer. Estos fueron mezclados en una solución de cloroformo/metanol (1:1). El solvente fue removido mediante a temperatura ambiente, para generar el film lipídico. Luego, se agregó 200 ul de PBS pH 7.4, y la mezcla fue incubada a temperatura ambiente por 30 minutos y se sonicó durante 5 min. La suspensión fue extruida a través de una membrana de policarbonato de poros de 800 nm (Nucleopore, USA), con un equipo Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids, USA) utilizando dos jeringas herméticas de precisión (Hamilton Company, USA), realizando 11 pasajes para uniformar el tamaño de las partículas a 100 nm. Las suspensiones se mantuvieron a 4°C hasta su uso [109].

## **Caracterización de los liposomas**

A través de dispersión dinámica de la luz (DLS) se analizaron las preparaciones liposomales, empleando el equipo Malvern Nanosight NS300 (Malvern, USA). Las diluciones 1:1000 fueron preparadas en agua pura. Los parámetros para el análisis fueron: Captura: [Camera level = 14; Screen = 3]. [Process: Screen = 9; Threshold = 5]. A partir de los datos obtenidos se obtuvo el promedio del tamaño de los liposomas en nm. El potencial zeta de los liposomas se determinaron mediante la técnica Dynamic Light Scattering (DLS) con Malvern Zetasizer ZS 3600 (Malvern Instruments). La morfología de los liposomas se caracterizó por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) realizada en un microscopio Zeiss EM-109.

Una vez sintetizados, los liposomas se centrifugaron durante 10 minutos a 4.000 RPM para concentrarlos. Se extrajeron 20  $\mu$ l de cada muestra y se incubaron con una solución de acetato de uranilo al 1,5 % en una rejilla de cobre recubierta de polímero Formvar, lo que permitió que la muestra se secase antes de observarla al microscopio electrónico de transmisión.

### **Preparación y determinación de Ovalbumina biotinilada unida a los liposomas a través de ELISA anti-OVA y citometría de flujo.**

Para realizar las inmunizaciones se utilizó ovalbumina Endofit (InvivoGen). Para biotinilarla, 10 mg/ml de OVA Endofit diluida en agua fisiológica estéril fue incubada con el kit de biotinilación EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin durante toda la noche a 4°C [113]. Luego esta fue purificada mediante cromatografía de exclusión molecular empleando una columna de desalinización. Posteriormente se determinó la concentración de proteína en las fracciones obtenidas mediante el método de Bradford.

Una de las fracciones fue utilizada para evaluar el grado de biotinilación de OVA empleando el kit de cuantificación de biotina (ThermoScientific). La unión de la OVA biotinilada al liposoma conteniendo el lípido Biotinyl CAP PE 18:1, se realizó mediante co-incubación con estreptavidina (ThermoFisher) durante toda la noche a 4°C. La relación molar fue OVA/Estreptavidina/Liposoma 1:2:1. Las preparaciones se ultracentrifugaron 2 veces a 80000 x g durante 30 min en una ultracentrífuga Sorvall Wx100. Los sobrenadantes fueron descartados y el pellet conteniendo el liposoma conteniendo la OVA biotinilada unida se resuspendió en 200  $\mu$ l de PBS y fue almacenando a 4°C [113].

Para corroborar que OVA se encontraba en la superficie del liposoma, se realizó una citometría de flujo empleando anticuerpo anti-OVA. Una fracción de la muestra centrifugada resuspendida en PBS, se incubó con el anticuerpo de conejo anti-OVA FITC (ab85584, Abcam) (1:500 en FACS) durante 2 h a 4°C. Posteriormente la mezcla se ultracentrifugó una vez a 80000 x g durante 30 min y el pellet se resuspendió en 300  $\mu$ l de Buffer FACS. Se utilizó como control de autofluorescencia el liposoma sin teñir. Los datos obtenidos de las citometrías fueron analizados utilizando el programa FlowJo X 10.0.7 Software (FlowJo LLC).

La determinación de OVA unida a los liposomas se determinó a través de ELISA. Se generó una curva de calibración a una concentración inicial de OVA Sigma 125 ng/ml y los liposomas conteniendo OVA se diluyeron 1:5000, 1:10.000 o 1:20.000 y, se dejaron incubando toda la noche a 4°C. La placa se bloqueó con PBS-BSA 1%. Luego de lavar las placas, estas fueron incubadas con anticuerpo policlonal de conejo anti-OVA ab181688 (Abcam) (1:5000 PBS-BSA 1%) durante 1 h a temperatura ambiente. Luego, se incubó con el anticuerpo secundario de asno anti-conejo-HRP (1:5000 PBS-BSA 1%) durante 1 h a temperatura ambiente. Se reveló con TMB (Tetramethylbenzidine). La reacción se detuvo con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 2M. La placa se leyó en un lector de placas de ELISA a una absorbancia de 450.

### **Cuantificación de IL-2 a través de ELISA**

La cuantificación de IL-2 en los sobrenadantes de los co-cultivos se realizó mediante ELISA. Las placas se sensibilizaron con anticuerpo monoclonal anti IL-2 de ratón purificado (clon JES6-1<sup>a</sup>12; BD

Pharmingen, USA) (dilución 1:400 en PBS). Se utilizó además una curva estándar de la proteína IL-2 recombinante (Peprotech, USA), incubándose toda la noche a 4°C. Las placas fueron bloqueadas con PBS-BSA 1% por 2 horas a temperatura ambiente y lavadas con PBS-Tween 20 0,1%. Se agregó 100 µl de los sobrenadantes de los co-cultivos. Luego de lavar, se agregó anticuerpo monoclonal anti IL-2 de ratón conjugado a biotina (clon JES6-1<sup>a</sup>12; BD Pharmingen, USA) (dilución 1:700), por 1,5 hrs a temperatura ambiente. Luego de lavar, se agregó estreptavidina-peroxidasa de rábano (Sav-HRP; BD Pharmingen, USA), (dilución 1:1500), por una hora a temperatura ambiente. Finalmente, luego de lavar, se agregó el TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) para revelar. Se detuvo la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M. El resultado colorimétrico fue leído en un lector para placas de ELISA a una absorbancia de 450 nm [111].

### **Cuantificación de IFN-γ y IL-4 a través de ELISA**

La cuantificación de IFN-γ y IL-4 en las muestras de suero se realizó mediante ELISA. Las placas se sensibilizaron con anticuerpo monoclonal anti IFN-γ y IL-4 de ratón purificado (dilución 1:400 en PBS). Se utilizó además una curva estándar tanto de IFN-γ (Peprotech, USA) como de IL-4 (Peprotech, USA), incubándose toda la noche a 4°C. Las placas fueron bloqueadas con PBS-BSA 1% por 2 horas a temperatura ambiente y lavadas con PBS-Tween 20 0,1%. Se agregó 100 µl de las muestras de suero en duplicado. Las muestras fueron diluidas con PBS-BSA 1%. Luego de lavar, se agregó anticuerpo monoclonal anti IFN-γ y IL-4 de ratón conjugado a biotina (BD Pharmingen, USA) (dilución 1:700), por 1,5 hrs a temperatura ambiente. Luego de lavar, se agregó estreptavidina-peroxidasa de rábano (Sav-HRP; BD Pharmingen, USA), (dilución 1:1500), por una hora a temperatura ambiente. Finalmente, luego de lavar, se agregó el TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) para revelar. Se detuvo la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M. El resultado colorimétrico fue leído en un lector para placas de ELISA a una absorbancia de 450 nm.

### **Citometría de flujo extracelular de isotipos de anticuerpos**

Los esplenocitos de ratón luego de ser sometidos a lisis de glóbulos rojos, centrifugados y resuspendidos en medio RPMI, fueron ajustados a 3 x10<sup>7</sup> cells/ml en RPMI suplementado con el fin de tener 3.000.000 cells/pocillo en sextuplicado. Se lavaron las células una vez con PBS 1x, para luego ser resuspendidas en 50 µL de solución de tinción de viabilidad Blue LIVE/DEAD, dilución 1:500 en PBS, incubándose por 30 minutos, a 4°C. Luego, las células fueron centrifugadas y lavadas en buffer FACS. Se resuspendieron en 2.4G2 [FcγII/III (CD16/CD32) block] (1:500, 5 min, 4°C) y se añadieron los anticuerpos monoclonales para marcadores de superficie durante 1 hora a 4°C: OVA-Alexa 488, IgM-PE, IgD-PECy7, IgG2a-APC-Fire750, B220-Alexa 700, IgG2b-APC, IgG1- BV421, IgG3-BV786, CD73-BV605, CD80-BV650. Las células fueron fijadas con solución PFA 4%, durante 10 minutos, a 4°C. Se utilizó el citómetro de flujo BD LSR FORTRESSA X-20. El análisis de las células se llevó a cabo con el software FlowJo V10.

### **Citometría de flujo intracelular para la evaluación de citoquinas**

Las suspensiones celulares del bazo fueron ajustadas a 3 x10<sup>7</sup> cells/ml en RPMI suplementado con el fin de tener 3.000.000 cells/pocillo en sextuplicado. Se estimuló con PMA (CF=10 ng/ml) y Ionomicina

(CF= 500 ng/mL) disueltos en RPMI suplementado durante 4 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. En las últimas 3 horas de cultivo se agregó una solución de Monensina (CF= 1 ul/ml) y Brefeldina A (CF= 1 ul/ml). Luego de lavadas, las células fueron teñidas con tinción de viabilidad Blue LIVE/DEAD en PBS. Posteriormente, las células fueron centrifugadas y lavadas una vez en buffer FACS. Luego, se resuspendieron en 2.4G2 [FcγII/III (CD16/CD32) block]. Luego, se añadieron los anticuerpos monoclonales para marcadores de superficie durante 1 h a 4°C: tetrámero CD1d/sulfátido, tetrámero CD1d/α-Galcer (MBL International Corporation, USA), CD45R/B220-PerCP (RA3-6B2), TCRβ-FITC (H57-597), CD4-APC Cyanine 7 (GK1.5), CD8a-APC (53-6.7), CD25-APC (PC61.5), MHC-II- FITC (M5/114.15.2), CD11c- PE-Cyanine7 (N418), CD11b-V450 (M1/70), CD80-BV650 (16-10<sup>a</sup>1), CD3-Alexa 647 (145-2C11), CD86-Alexa 700 (GL1). Posteriormente, las células fueron permeabilizadas con buffer eBiosciences Foxp3 Fixation/Permeabilization por 30 minutos a 4°C en la oscuridad. Luego se bloqueó con suero de ratón al 5% durante 15 minutos a 4°C en la oscuridad y se añadió los anticuerpos monoclonales para proteínas intracelulares durante 60 minutos a 4°C en la oscuridad: IL4-PE Cyanine 7 (11B11), IFNγ-Alexa Fluor 700 (XMG 1.2), IL17A-PE-CF594 (TC11-18H10), IL-13- APC-eFLUOR780 (eBio13A), IL-10-BV650 (JES5-16E3), IL-6-V450 (MP5-20F3), Foxp3-PE-CF594 (MF23), IL-17 Receptor B-BV786 (6B7). Se utilizó el citómetro de flujo BD LSR FORTRESSA X-20. El análisis de las células se llevó a cabo con el software FlowJo V10.

#### **Determinación de citoquinas Th1/Th2/Th17 por Cytometric Bead Array (CBA)**

Se utilizó el kit de citoquinas Th1/Th2/Th17 de ratón para medir IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF (factor de necrosis tumoral), IL-17<sup>a</sup> e IL-10 en una sola muestra de suero de ratones C57BL/6 y C57BL/6 Knock-in para CD1d humano. Las concentraciones corresponden a niveles de pg/ml. A través de este método un conjunto de analitos con microesferas de tamaño y fluorescencia conocidos permite detectarlos mediante citometría de flujo. Cada bead de captura se ha conjugado con un anticuerpo específico. El reactivo de detección es una mezcla de anticuerpos conjugados con ficoeritrina (PE), que proporcionó una señal fluorescente en proporción a la cantidad de analito unido. La curva estándar de cada citoquina abarcó un número establecido de concentraciones que van desde 20 a 5000 pg/mL. Se utilizó 50 µL de cada una de las muestras de suero. Posterior a la adquisición de los datos, se calculó la intensidad media de fluorescencia geométrica de cada histograma correspondiente a cada citoquina, tanto de la curva de calibración como de las muestras de suero. La concentración de cada citoquina se determinó a través de la intensidad media de fluorescencia de la muestra, la cual fue posteriormente interpolada en la curva de calibración.

#### **Determinación del título de los anticuerpos IgG específicos a ovalbumina a través de ELISA (ensayo por inmovilización ligada a enzimas)**

Para determinar el título de los anticuerpos IgG presente en el suero de los ratones, las placas de 96 pocillos fueron recubiertas con Ovalbumina Sigma a una concentración de 10 ug/ml. Los pocillos fueron bloqueados con PBS/BSA 1%. Las muestras de suero fueron diluidas para IgM 1:50 y para IgG 1:1000 en

PBS/BSA 1%. Estos fueron diluidos en serie en la placa e incubados durante toda la noche. Posteriormente, las placas fueron incubadas aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente en agitación con los siguientes anticuerpos: anti-IgG1 (Goat anti-Mouse IgG1 HRP, 1:20.000); IgG2a (Goat anti-Mouse IgG2a HRP, 1:20.000); IgG2b (Goat anti-Mouse IgG2b HRP, 1:20.000); IgG2c (Goat anti-Mouse IgG2c HRP, 1:10.000); IgG3 (Goat anti-Mouse IgG3 HRP, 1:20.000). Para revelar se utilizó el sustrato TMB y fue detenida con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M. El resultado colorimétrico fue leído en un lector para placas de ELISA a 450 nm [113]. Para determinar el título, se realizaron gráficos absorbancia versus dilución del anticuerpo. Se definió un punto de corte para el cálculo del título. El punto de corte se definió como dos veces la absorbancia correspondiente al grupo inmunizado con PBS. El análisis en Graphpad fue el siguiente, las diluciones (X) fueron transformadas a 1/X y a Log 1/X. Posteriormente, cada punto de corte fue sometido a interpolación en las curvas sigmodiales de absorbancia versus Log 1/X. Luego cada dilución fue transformada nuevamente a 10<sup>X</sup> y 1/X. Cada valor interpolado corresponderá al título inverso del isotipo de anticuerpo.

#### **Determinación de la frecuencia de células secretoras de anticuerpos IgG específicos a ovalbumina presentes en la medula ósea y bazo por ELISPOT (ensayo por inmuoadsorción ligado a enzimas)**

ELISPOT es un inmunoensayo que mide la frecuencia de células secretoras de anticuerpos que nos permitió evaluar las respuestas de las células B de memoria específicas del antígeno OVA presentes tanto en la medula ósea como en el bazo. Las membranas fueron recubiertas con Ovalbumina Sigma a una concentración de 10 ug/ml. Posteriormente las células se cultivaron y se ajustaron a 2 millones/mL. Las células fueron incubadas toda la noche a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% durante 24 horas. Se utilizaron controles negativos como solo medio y sin células. Como control positivo se utilizó LPS a una concentración de 50 ug/mL. Después de este tiempo de incubación, las células se eliminaron y los anticuerpos secretados se detectaron por un anticuerpo de detección conjugado a HRP (generalmente 1:20000) y se incubó durante toda la noche a 4°C (IgG, IgG1, IgG2c, IgG3). Posteriormente se agregó el sustrato TMB y el resultado final correspondió a manchas visibles en la superficie. Cada punto correspondió a una célula secretora de anticuerpos individual. La cuantificación de los spots fue realizada utilizando el software de análisis A.EL.VIS ELISPOT Reader [114].

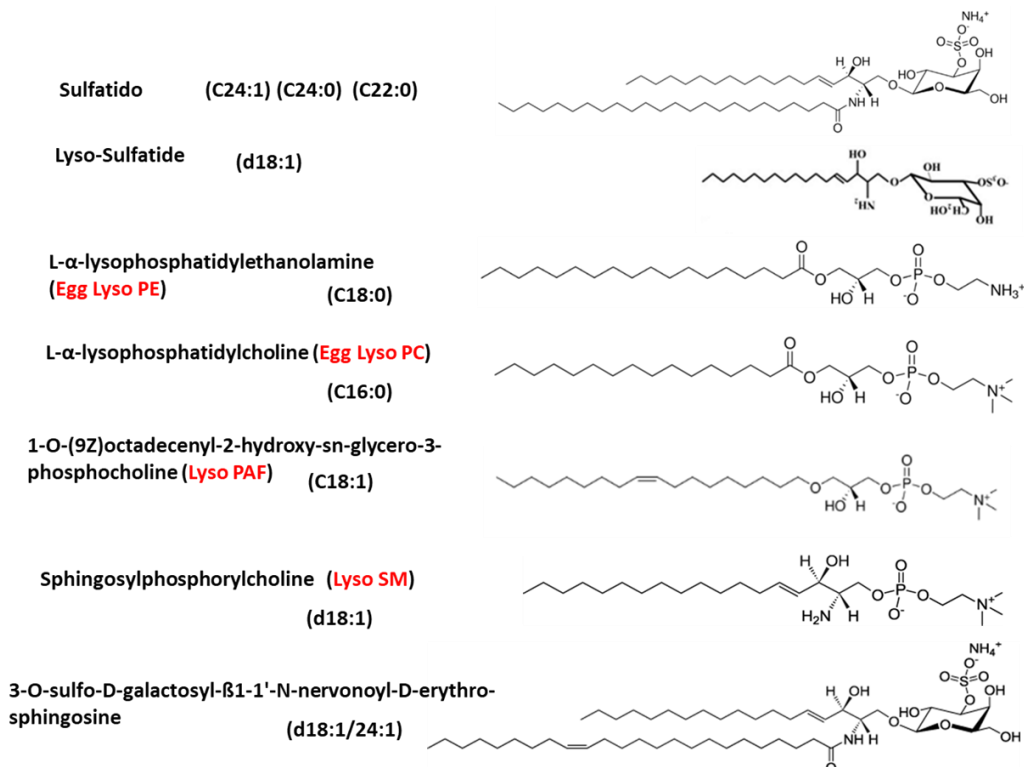
#### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism 7 (GraphPad Software). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante test de student, ANOVA y análisis post-hoc test de Dunnett.

## Resultados

### 1. Identificar ligandos lipídicos que promuevan la activación, *in vitro*, de células NKT tipo II presentados por células dendríticas derivadas de ratones wild type y Knock-in para CD1d humano pulsadas con lípidos libres o contenidos en liposomas.

Hay evidencia de que algunos ligandos lipídicos pueden ser presentados por la molécula CD1d de ratón y no por la molécula CD1d humana, por lo que primero, se evaluaron los ligandos lipídicos que son reconocidos por la molécula CD1d humana en el ratón Knock-in y que fueran capaces de activar las respuestas de los hibridomas de células NKT tipo II (Hy 19.3). Los lípidos evaluados fueron Sulfátido, L- $\alpha$ -lysofosfatidiletanolamina (Lyso PE), L- $\alpha$ -lysofosfatidilcolina (Lyso PC), Lysosulfatido, Lyso factor activador de plaquetas (Lyso PAF), Mono-Sulfo Galactosyl ( $\beta$ ) Ceramida (sulfátido C24:1) y Lyso-esfingomielina (Lyso SM) (Figura 7). Estos lípidos son reconocidos por la molécula CD1d de ratón pero no había evidencia de que fueran presentados por la molécula CD1d humana.

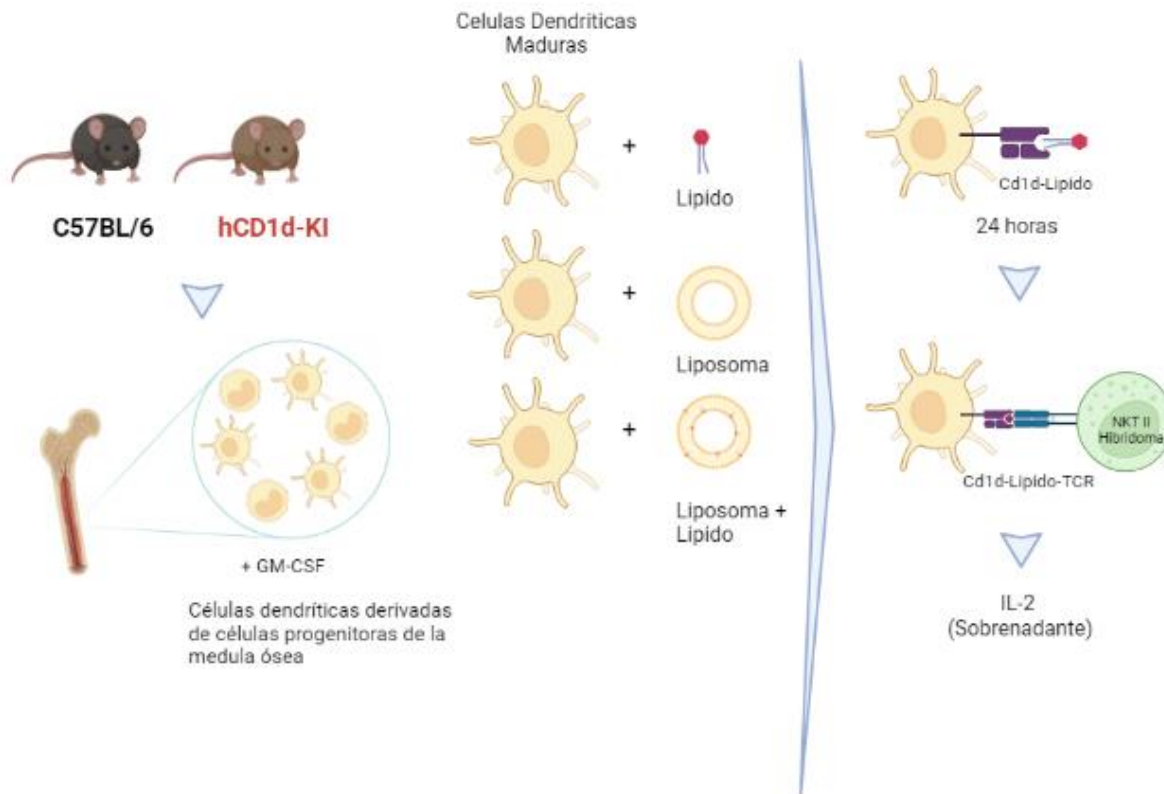


19

**Figura 7:** Ligandos lipídicos reconocidos por las células NKT tipo II utilizadas en este trabajo.



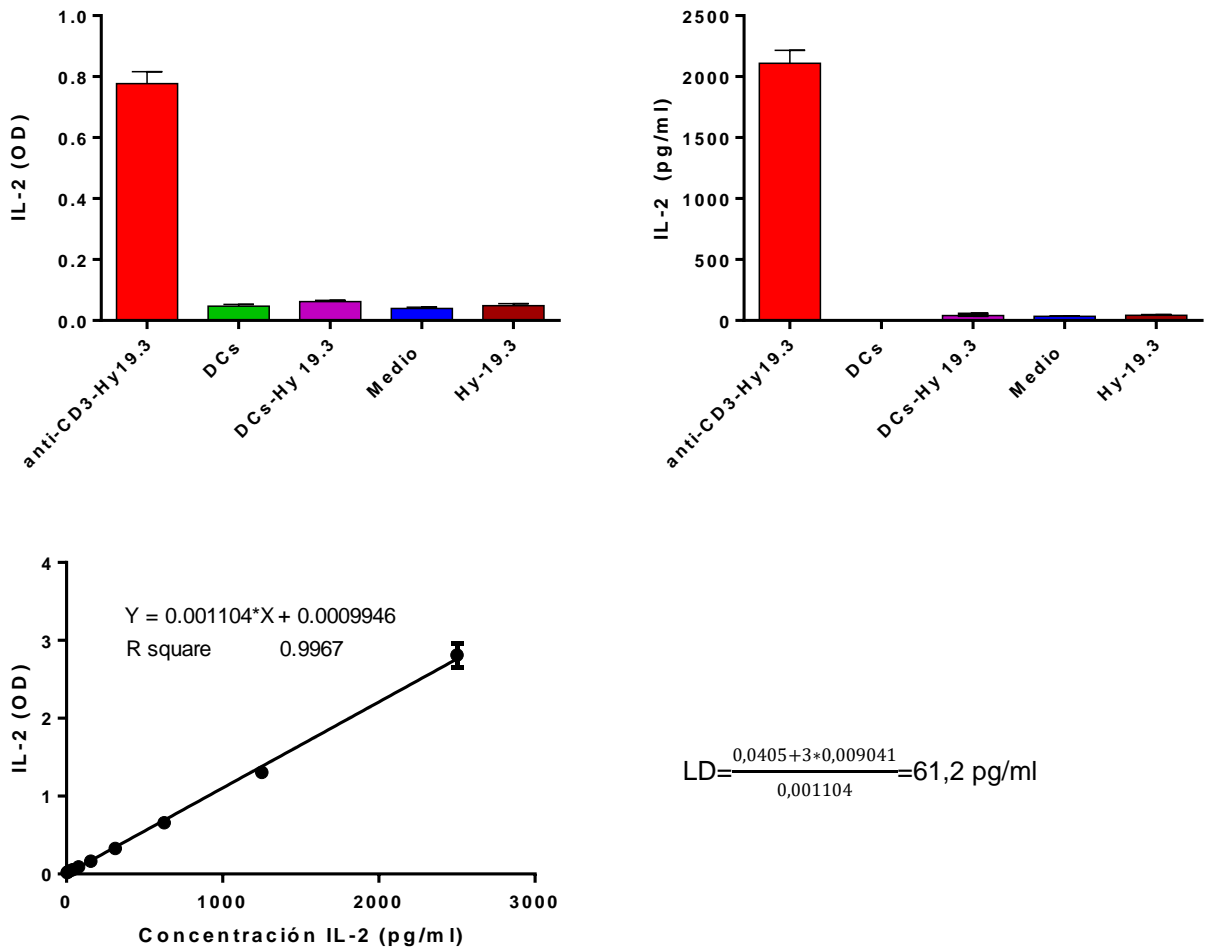
Se realizaron ensayos *in vitro* (Figura 8), donde las células dendríticas derivadas de células progenitoras de médula ósea (BMDCs) (100.000 cells/pocillo) de ratones C57BL/6, hCD1d-KI y hCD1d-KO (carece de células NKT tipo I y II) fueron pulsadas con el ligando lipídico solo, liposoma solo y liposomas conteniendo el lípido. Las concentraciones de lípido utilizadas fueron 0.1, 1 y 10 uM. Luego de 24 horas, las BMDCs fueron co-cultivadas con los hibridomas de células NKT tipo II (100.000 cells/pocillo). Los sobrenadantes fueron evaluados a través de ELISA para determinar la producción de IL-2, indicando su reconocimiento y activación.



**Figura 8:** Diseño experimental utilizado en los experimentos *in vitro* para evaluar los ligandos lipídicos activadores de los hibridomas de células NKT tipo II (Hy 19.3) en células dendríticas derivadas de células progenitoras de la médula ósea (BMDC) de ratones C57BL/6 y Knock-in para CD1d humano. BMDC C57BL/6 (mCD1d); BMDC Knock-in CD1d (hCD1d); Ratones utilizadas en cada experimento: C57BL/6 N=6; hCD1d-KI N=6.

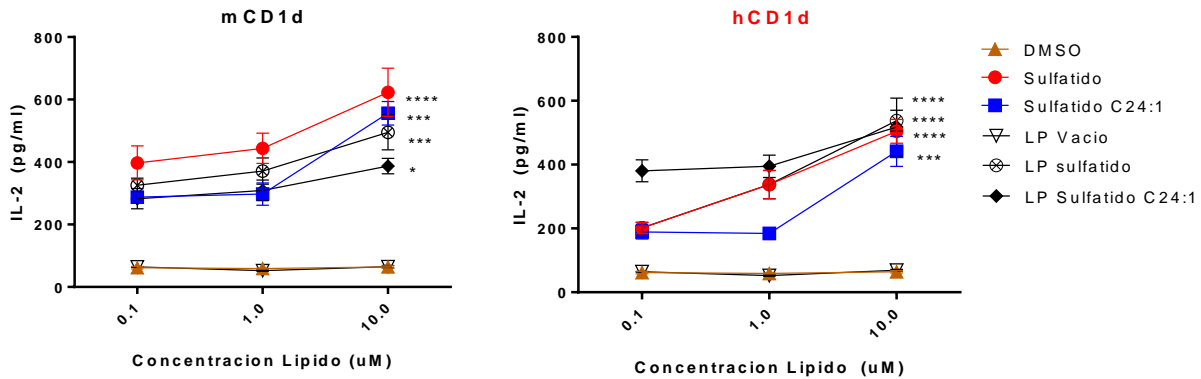
En todos los experimentos, los hibridomas respondieron a anti-CD3 unido a la placa (Figura 9). Las concentraciones de IL-2 en los controles negativos del experimento fueron bajas (solo células dendríticas, solo los hibridomas de célula NKT tipo II, solo medio y co-cultivo de células dendríticas sin pulsar con los hibridomas de célula NKT tipo II) (Figura 9 y figura suplementaria 1). Las concentraciones de IL-2 de cada vehículo (DMSO para lípidos libres y

Liposoma vacío sin lípido) fueron significativamente más bajas que aquellos conteniendo el ligando lipídico en forma libre o contenido en liposomas (Figura 9). Los hibridomas de células NKT tipo II secretaron IL-2 en respuesta a los lípidos de una manera dependiente de CD1d. El límite de detección del ensayo de ELISA, es decir, la concentración mínima de IL-2 que puede ser detectada con fiabilidad a partir del método fue de 61,2 pg/ml.



**Figura 9: Concentraciones de IL-2 correspondientes a los controles de experimentos y cálculo del límite de detección obtenida de la curva absorbancia versus concentración de IL-2.** Se muestran los resultados de triplicados del total de experimentos. (Ratones C57BL/6=6; hCD1d-KI=6).

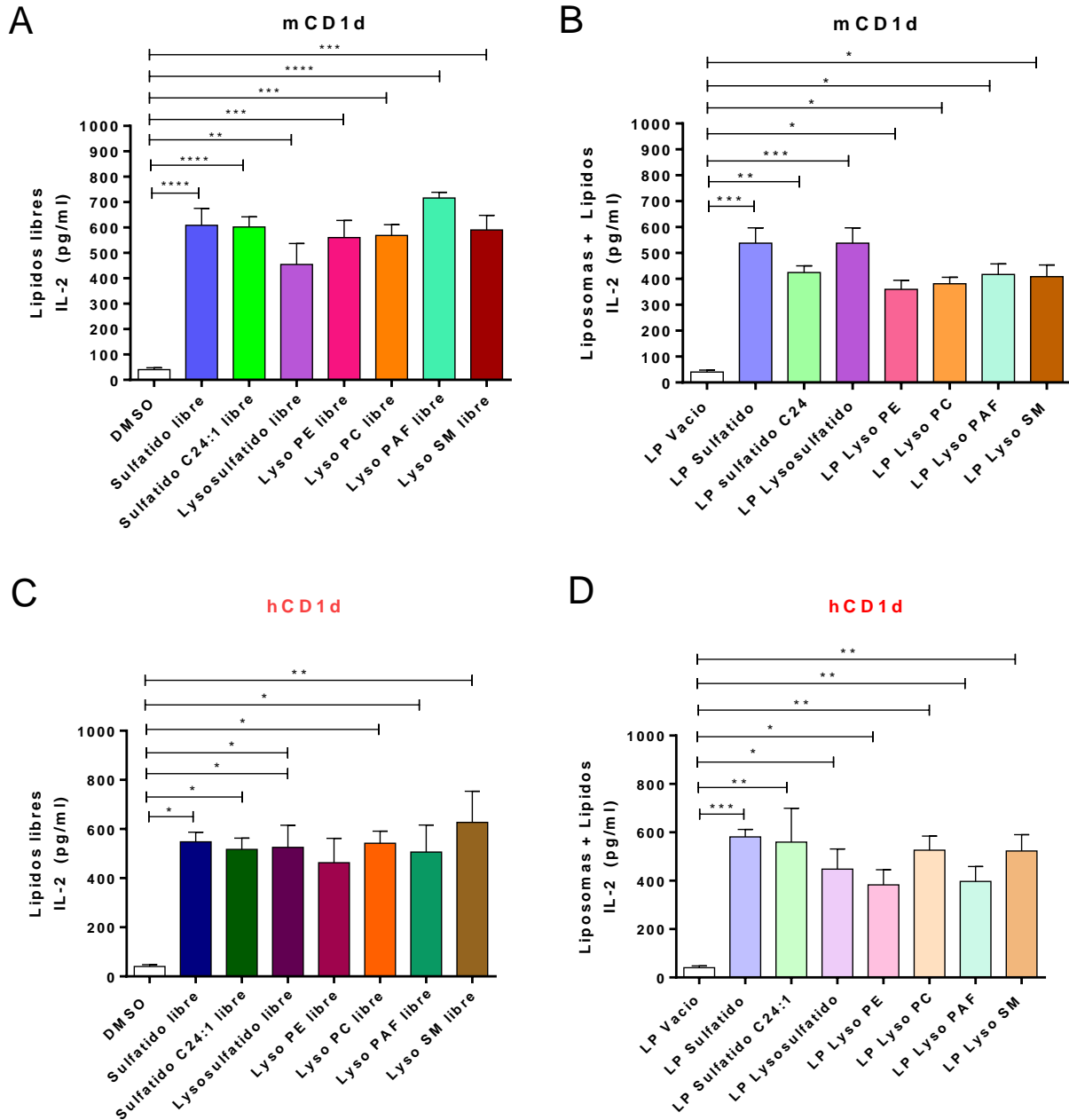
Los lípidos sulfátido y sulfátido C24:1 en forma libre y contenido en liposomas activaron a los hibridomas de células NKT tipo II presentados por células dendríticas provenientes de ratones C57BL/6 y Knock-in para CD1d humano. Los liposomas conteniendo a los lípidos mantuvieron la misma respuesta de activación que los lípidos libres (Figura 10).



**Figura 10: Los ligandos sulfátido y sulfátido C24:1 en su forma libre y contenido en liposomas son presentados por la molécula CD1d humana.** Absorbancias y concentraciones de IL-2 determinadas a través de ensayos *in vitro* con BMDC C57BL/6 y CD1d-Knock-in pulsadas con sulfátido y sulfátido C24:1 en forma libre y contenido en liposomas (LP), co-cultivadas con los hibridomas de células NKT tipo II. BMDC C57BL/6 (mCD1d); BMDC Knock-in CD1d (hCD1d); C57BL/6 N=6; hCD1d-KI N=6. ( $P < 0.05$ , \*); ( $P < 0.01$ , \*\*); ( $P < 0.001$ , \*\*\*). Las diferencias estadísticas están dadas por la aplicación de la prueba de comparación múltiple Two way ANOVA y como análisis post-hoc a la prueba de Dunnett entre los grupos controles y tratados, es decir, DMSO versus lípidos libres; LP vacío versus lípidos contenidos en liposomas.

También se evaluaron otros lípidos donde los ligandos lipídicos utilizados tanto en su forma libre como contenido en liposomas pueden ser presentados por células dendríticas provenientes de ratones C57BL/6 y estimular a los hibridomas de células NKT tipo II (Figura 11). Dentro de los lípidos que promueven una mayor activación de los hibridomas de células NKT tipo II son Sulfátido, Sulfátido C24:1 y Lyso PAF en ratones C57BL/6. Los liposomas conteniendo a los lípidos mantuvieron la activación del hibridoma de células NKT tipo II en comparación a los lípidos libres, ya que el liposoma activó de la misma forma que el lípido libre (Figura 11). Este resultado apoya el uso de liposomas como herramienta de entrega de lípidos para evitar la toxicidad provocada por la administración de estos en forma libre.

Todos los ligandos lipídicos reconocidos por la molécula CD1d humana en el ratón Knock-in fueron capaces de activar las respuestas de los hibridomas de células NKT tipo II (Figura 11 y figura suplementaria 2). Al comparar las concentraciones de IL-2 utilizando BMDCs provenientes de ratones wild type y Knock-in para CD1d humano, observamos que las concentraciones son más bajas cuando los ligandos lipídicos fueron presentados con BMDCs provenientes de ratones Knock-in que de ratones wild-type.

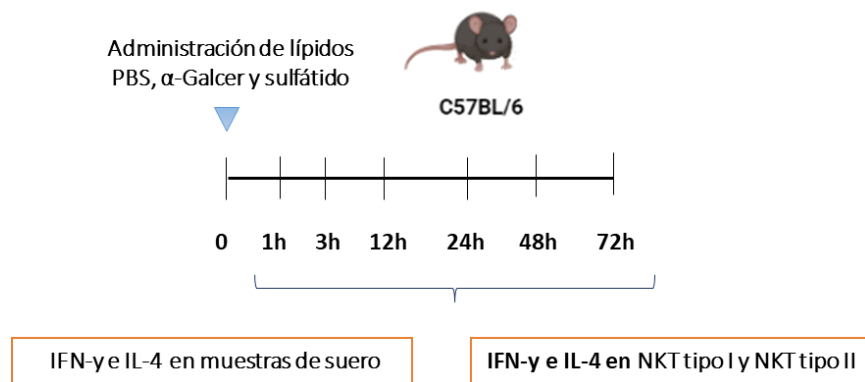


**Figura 11: Los ligandos lipídicos son presentados por la molécula CD1d humana y de ratón.** Absorbancias y concentraciones de IL-2 determinadas a través de ensayos *in vitro* con BMDC C57BL/6 (A y B) y CD1d-Knock-in (Cy D) pulsadas con sulfátido, sulfátido C24:1, Lysosulfatido, Lyso PE, Lyso PC, Lyso PAF y Lyso SM, en forma libre (A y C) y contenido en liposomas (LP) (B y D), co-cultivadas con los hibridomas de células NKT tipo II. BMDC C57BL/6 (mCD1d); BMDC Knock-in CD1d (hCD1d); C57BL/6 N=6; hCD1d-KI N=6. (P<0.05, \*); (P<0.01, \*\*); (P<0.001, \*\*\*). Las diferencias estadísticas están dadas por la aplicación de la prueba One-way ANOVA y como análisis post-hoc a la prueba de Dunnett entre los grupos controles (DMSO/LP vacío) y tratados (lípidos/lípidos contenidos en liposomas).

**2. Evaluar el efecto de la activación de células NKT tipo II sobre las funciones efectoras de las células NKT tipo I en ratones wild type y Knock-in para CD1d humano tratados con el lípido sulfátido libre.**

**2.1. Evaluación cinética de citoquinas liberadas por las células NKT a diferentes tiempos en ratones C57BL/6 a través de técnicas de ELISA y citometría de flujo.**

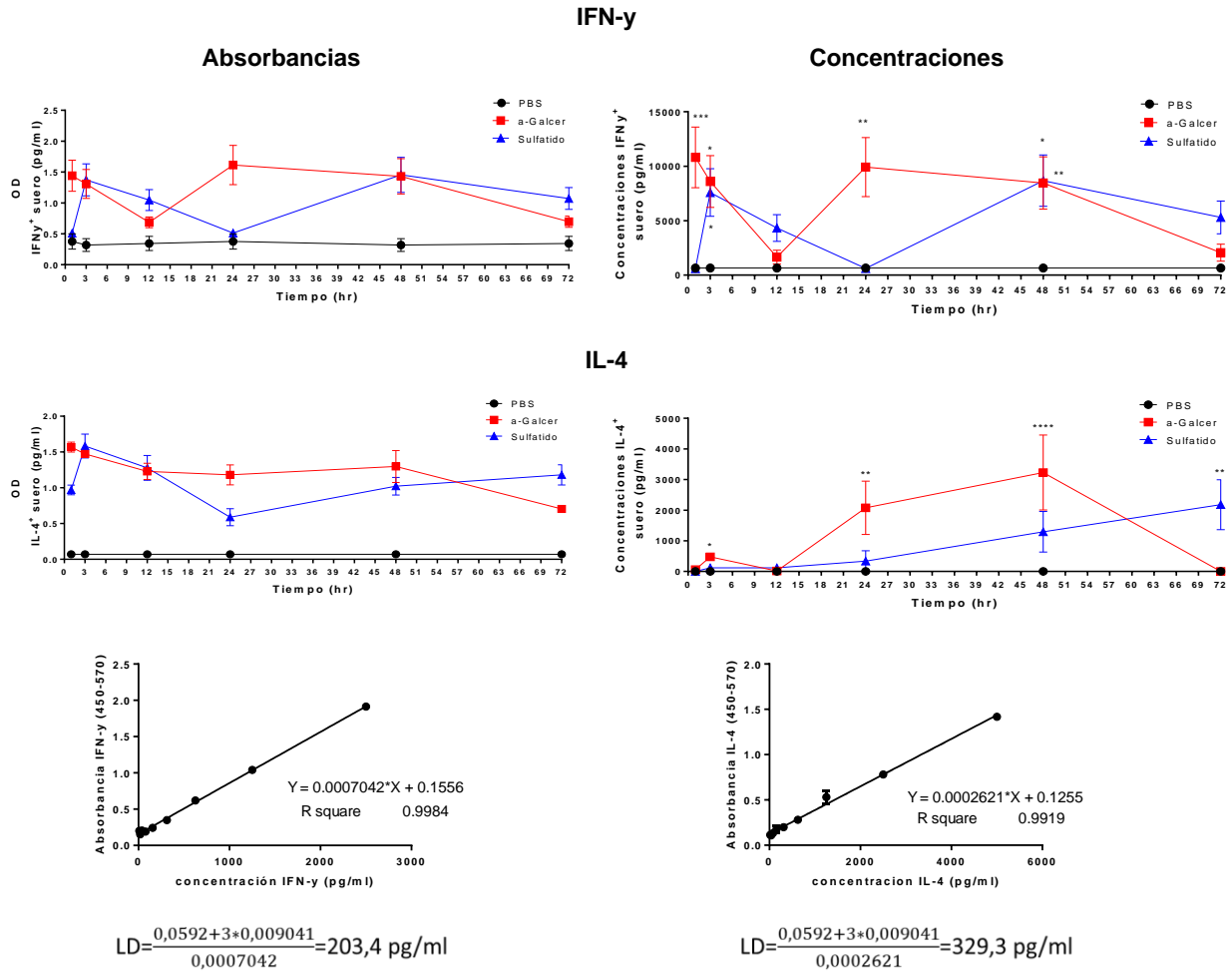
Dado que el ligando lipídico sulfátido presentó una gran capacidad para estimular a los hibridomas de células NKT tipo II y además este posee una estrecha relación con enfermedades como diabetes tipo I, cáncer y encefalomiелitis autoinmune experimental, entre otras, es que se decidió evaluar su capacidad de inducir una respuesta inmunomoduladora *in vivo* en ratones C57BL/6 sobre las células NKT tipo I activadas por  $\alpha$ -Galcer. Primero se hizo una evaluación cinética para determinar a qué tiempos se producía la liberación de citoquinas como IL-4 e IFN- $\gamma$  por las células NKT tipo I y NKT tipo II a través de citometría de flujo así como la determinación de estas citoquinas presentes en el suero de ratones C57BL/6 a través de ELISA. Los tiempos seleccionados para evaluar la cinética fueron a 1, 3, 12, 24, 48 y 72 horas de administrado los lípidos i.p, ya que se sabe que estas células producen citoquinas a tiempos tempranos rápidamente debido a que tienen altos niveles de mRNA de IL-4 e IFN- $\gamma$  almacenado (Figura 12). La estrategia de *gating* se muestra en la figura 14.



**Figura 12:** Diseño experimental del estudio cinético de la liberación de citoquinas luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer y sulfátido a las 1, 3, 12, 24, 48 y 72 horas *in vivo* en ratones C57BL/6 a través de ELISA y citometría de flujo. C57BL/6 (mCD1d); C57BL/6 N=3 por grupo: PBS,  $\alpha$ -Galcer y sulfátido.

Con respecto a las concentraciones de IFN- $\gamma$  e IL-4 evaluadas en suero a la 1, 3, 12, 24, 48 y 72 horas determinadas a través de ELISA, el límite de detección del ensayo, es decir, la

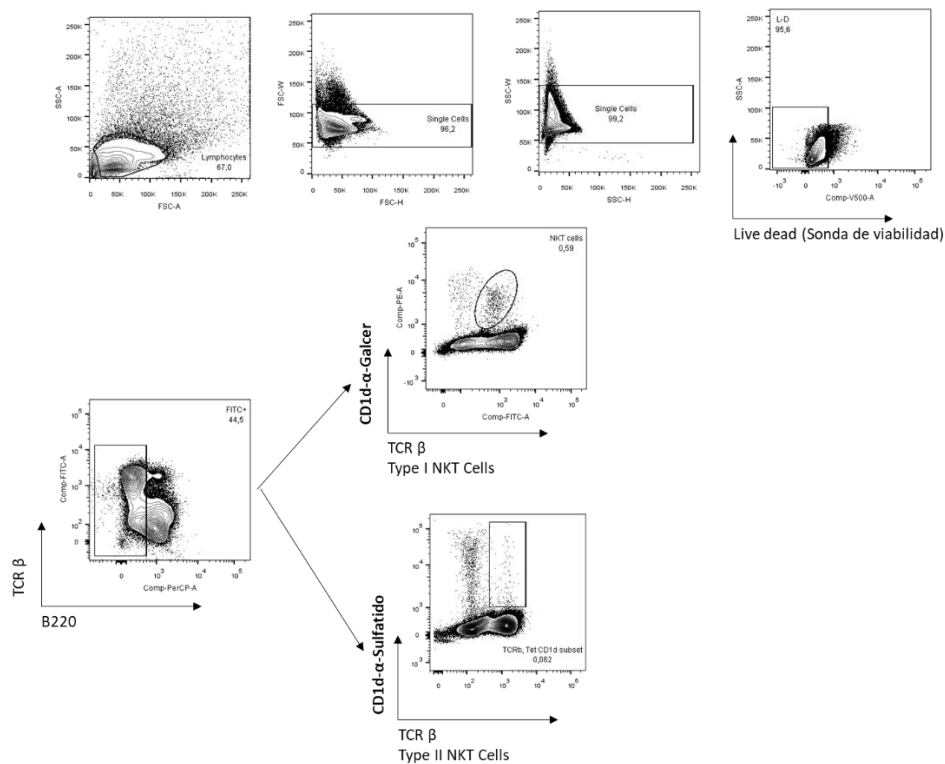
concentración mínima de IFN- $\gamma$  que puede ser detectada con fiabilidad a partir del método fue de 203.4 pg/ml y el límite de detección del ensayo para IL-4 fue de 329.3 pg/ml (Figura 13).



**Figura 13:  $\alpha$ -Galcer y sulfatido incrementan la concentración de IFN- $\gamma$  e IL-4 en suero de ratones.** Absorbancias y concentraciones de IFN- $\gamma$  e IL-4 en suero determinadas a través de ELISA a la 1, 3, 12, 24, 48 y 72 horas luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer y sulfátido. Los sueros fueron diluidos 5, 6 y 7 veces según correspondiera, en PBS y medidos en duplicado. Se indican los cálculos del límite de detección obtenida de la curva absorbancia vs concentración de IFN- $\gamma$  e IL-4. Las diferencias estadísticas están dadas por la aplicación de la prueba de comparación múltiple Two way ANOVA y como análisis post-hoc a la prueba de Dunnett entre los grupos controles y tratados. (P < 0.05; \*); (P < 0.01; \*\*); (P < 0.001; \*\*\*).

La concentración de IFN- $\gamma$  en suero se incrementó significativamente a las 1, 3, 24 y 48 horas de administrado  $\alpha$ -Galcer y la concentración de IL-4 en suero se incrementó significativamente a las 3, 24 y 48 horas de administrado  $\alpha$ -Galcer en comparación al grupo control (Figura 13). La concentración de IFN- $\gamma$  en suero se incrementó significativamente a las 3 y 48 horas de administrado sulfátido y la concentración de IL-4 en suero se incrementó significativamente a las 72 horas de administrado sulfátido en comparación al grupo control

(Figura 13). Estos datos demuestran un aumento selectivo de las citoquinas séricas IFN- $\gamma$  e IL-4 después de la activación de células NKT.



**Figura 14:** Estrategia de *Gating* de células NKT tipo I y células NKT tipo II a través de la utilización de tetrámero CD1d- $\alpha$ -Galcer y CD1d- $\alpha$ -sulfátido, respectivamente. Se selecciona la población de linfocitos por su tamaño y complejidad, se discriminan los dobletes, se seleccionaron las células vivas mediante sonda de viabilidad (live/dead), posteriormente se seleccionó la población de linfocitos TCR  $\beta^+$  y B220- para descartar a los linfocitos B. A través del uso de CD1d-tetrameros se seleccionaron las poblaciones de células NKT.

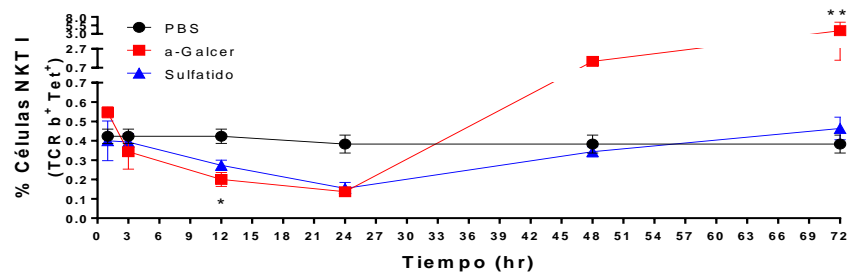
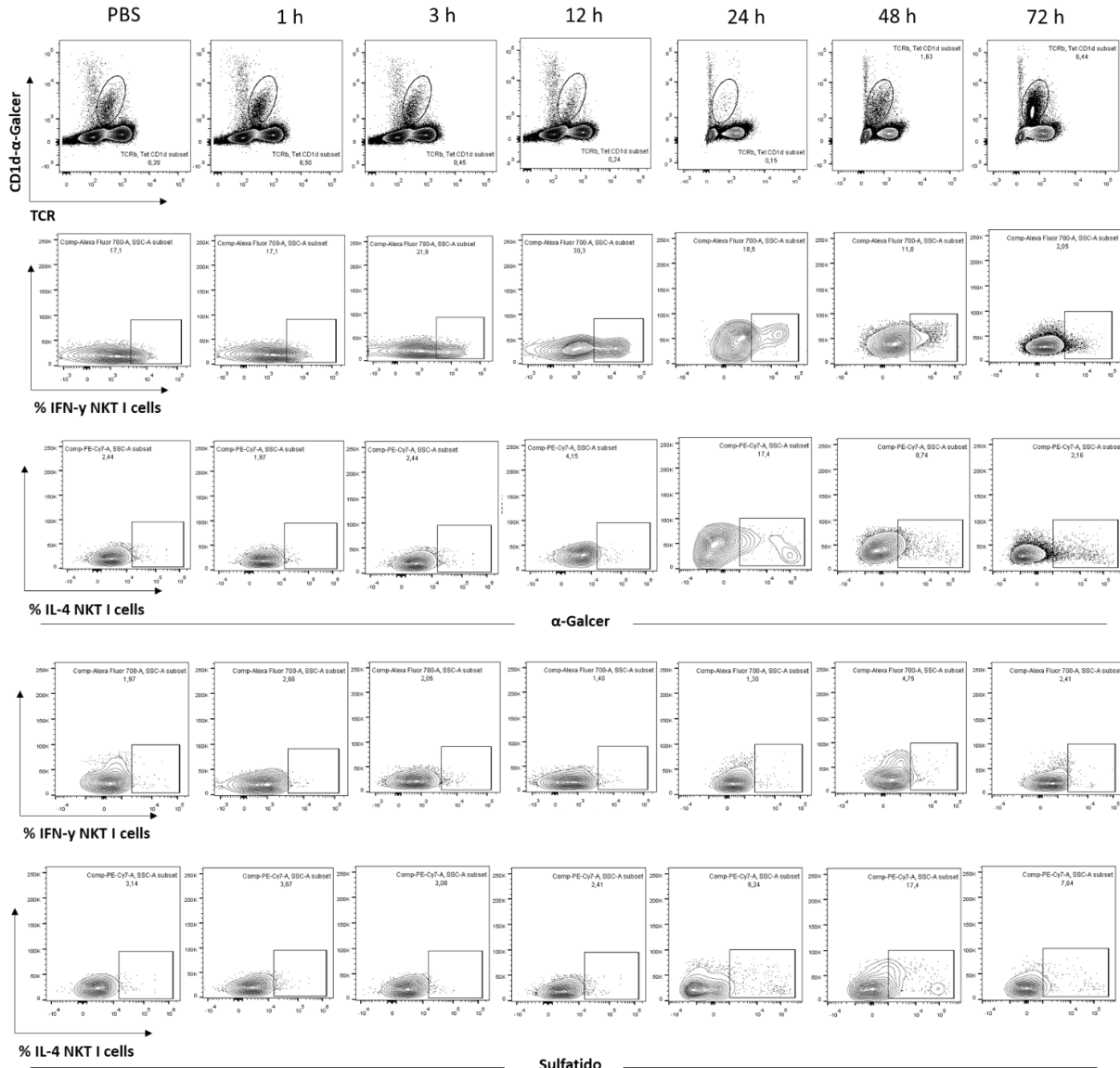
Para poder evaluar si la administración de estos lípidos estaba estimulando a las células NKT I y células NKT tipo II, se realizó la evaluación cinética de citoquinas a través de citometría de flujo del bazo. Para detectar la población de células NKT tipo I a través de citometría de flujo se utilizó los tetrámeros CD1d/ $\alpha$ -Galcer. El porcentaje de células NKT tipo I se contrajo, disminuyendo significativamente luego de administrado  $\alpha$ -Galcer (4 ug) a las 12 horas y se incrementó significativamente a las 72 horas de administrado  $\alpha$ -Galcer conocida como expansión celular (Figura 15). El porcentaje de células NKT tipo I productoras de IFN- $\gamma$  se incrementó significativamente a 1, 3, 12, 24 y 48 horas de administrado  $\alpha$ -Galcer en comparación al grupo control. El porcentaje de células NKT tipo I productoras de IL-4 se incrementó significativamente a las 24 horas de administrado  $\alpha$ -Galcer en comparación al grupo control.

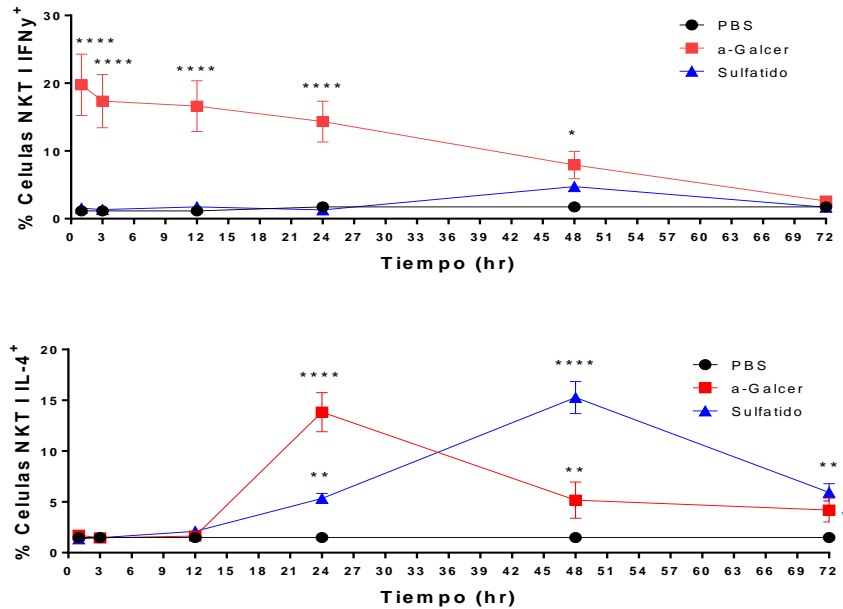
El porcentaje de células NKT tipo I se contrajo también luego de administrado sulfátido a las 12-24 horas y, a las 48 horas volvió a su valor basal (Figura 15). El porcentaje de células NKT tipo I productoras de IL-4 se incrementó significativamente a las 24-48-72 horas de administrado sulfátido en comparación al grupo control. Mientras que el porcentaje de células NKT tipo I productoras de IFN- $\gamma$  no se vio afectado por la administración de sulfátido.

Se puede observar que las células NKT tipo I estimuladas con  $\alpha$ -Galcer son capaces de producir IFN- $\gamma$  y no con la estimulación con sulfátido. Sin embargo, las células NKT tipo I al ser estimuladas tanto con  $\alpha$ -Galcer como sulfátido fueron capaces de producir IL-4. Por lo tanto, sulfátido tiene efectos sobre la producción de IL-4 por las células NKT tipo I y no por la producción de IFN- $\gamma$ .

Varios estudios han mostrado que rápidamente (dentro de las 8-12 horas) después de la activación, las células NKT se vuelven indetectables [115, 116]. La desaparición aparente ha sido demostrada en el contexto *in vivo* con  $\alpha$ -Galcer y se ha correlacionado con una mayor apoptosis y expresión de Fas y FasL por parte de las células NKT, lo que sugiere que son sensibles a la muerte celular inducida por activación mediada por Fas [117, 118]. La repoblación de estas células observada es debido a la proliferación homeostática del reservorio de células NKT en el hueso de la medula [117]. La cinética de la expresión mRNA de las citoquinas ha sido evaluada a diferentes tiempos luego de la inyección con  $\alpha$ -Galcer, demostrando la expresión de transcritos como IFN- $\gamma$  e IL-4 [119]. La expresión génica de IFN- $\gamma$  muestra su peak alrededor de las 24 horas de administrado  $\alpha$ -Galcer para luego disminuir a las 48 horas. La expresión génica de IL-4 es detectada a tiempos tempranos (8 horas) cuando las células tetrámero-positivas no son detectadas. Luego su expresión se incrementa a las 24 horas de administrado  $\alpha$ -Galcer [119]. Esto corrobora lo observado en este trabajo. No hay evidencia hasta ahora de que la administración de sulfátido promueva la producción de IL-4 por las células NKT tipo I a las 48 horas.



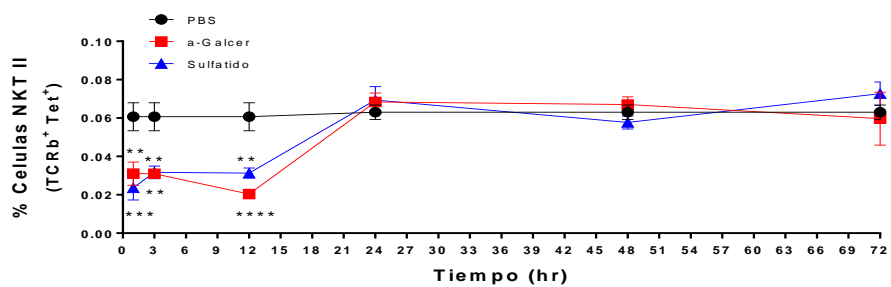
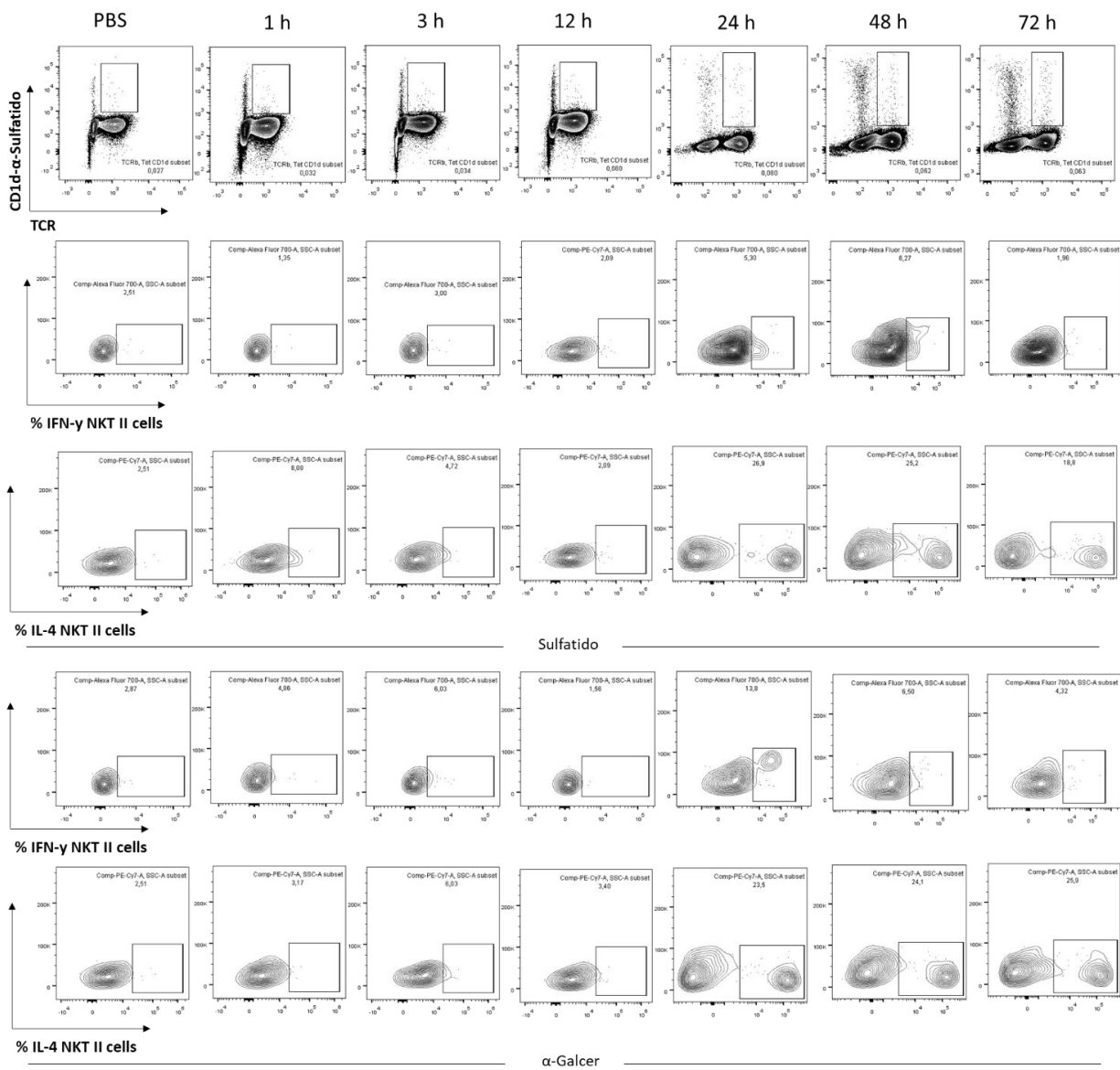


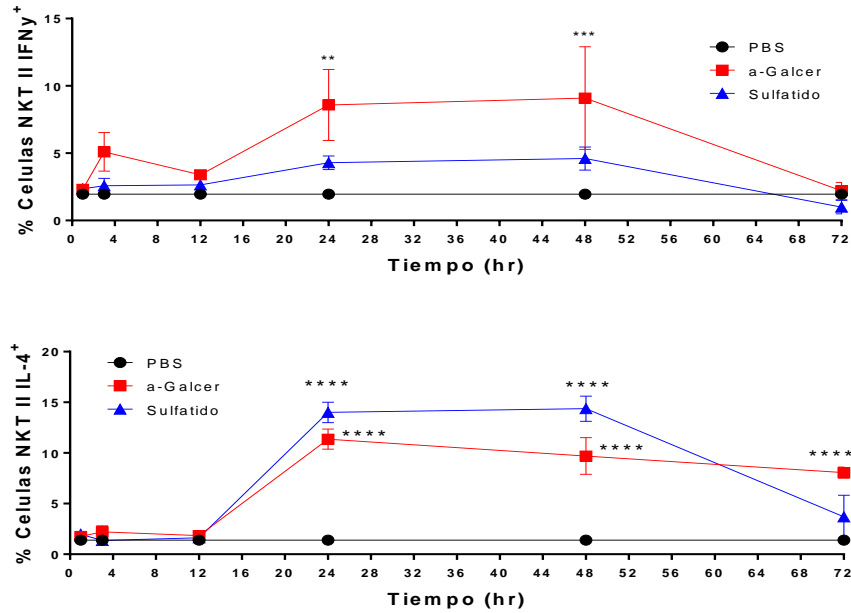


**Figura 15: Evaluación cinética de citoquinas liberadas por las células NKT tipo I a diferentes tiempos en ratones wild type a través de citometría de flujo.** Citometría de flujo de células NKT tipo I utilizada para el estudio de su cinética luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer y sulfátido a 1, 3, 12, 24, 48, 72 horas y citometría de flujo de células NKT tipo I productoras de IFN- $\gamma$  e IL-4. Las diferencias estadísticas están dadas por la aplicación de la prueba de comparación múltiple Two way ANOVA y como análisis post-hoc a la prueba de Dunnett entre los grupos controles y tratados. (P < 0.05; \*); (P < 0.01; \*\*); (P < 0.001; \*\*\*).

Para detectar la población de células NKT tipo II a través de citometría de flujo se utilizó los tetrámeros CD1d-sulfátido. El porcentaje de células NKT tipo II se contrajo, disminuyendo significativamente luego de administrado sulfátido a las 1-3-12 horas y luego encuentra un plató y llega a su valor basal a las 24 horas (Figura 16). El porcentaje de células NKT tipo II productoras de IFN- $\gamma$  se incrementó significativamente a las 24-48 horas de administrado  $\alpha$ -Galcer en comparación al grupo control. El porcentaje de células NKT tipo II productoras de IL-4 se incrementó significativamente a las 24-48-72 horas de administrado  $\alpha$ -Galcer en comparación al grupo control.

El porcentaje de células NKT tipo II se contrajo también luego de administrado sulfátido a las 1-3-12 horas y, a las 24 horas volvió a su valor basal (Figura 16). El porcentaje de células NKT tipo II productoras de IFN- $\gamma$  no se vio afectado luego de la administración de sulfátido en comparación al grupo control. El porcentaje de células NKT tipo II productoras de IL-4 se incrementó significativamente a las 24-48 horas de administrado sulfátido en comparación al grupo control.





**Figura 16: Evaluación cinética de citoquinas liberadas por las células NKT tipo II a diferentes tiempos en ratones wild type a través de citometría de flujo.** Citometría de flujo de células NKT tipo II utilizada para el estudio de su cinética luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer y sulfátido a 1, 3, 12, 24, 48, 72 horas y citometría de flujo de células NKT tipo II productoras de IFN- $\gamma$  e IL-4. Las diferencias estadísticas están dadas por la aplicación de la prueba de comparación múltiple Two way ANOVA y como análisis post-hoc a la prueba de Dunnett entre los grupos controles y tratados. (P < 0.05; \*); (P < 0.01; \*\*); (P < 0.001; \*\*\*).

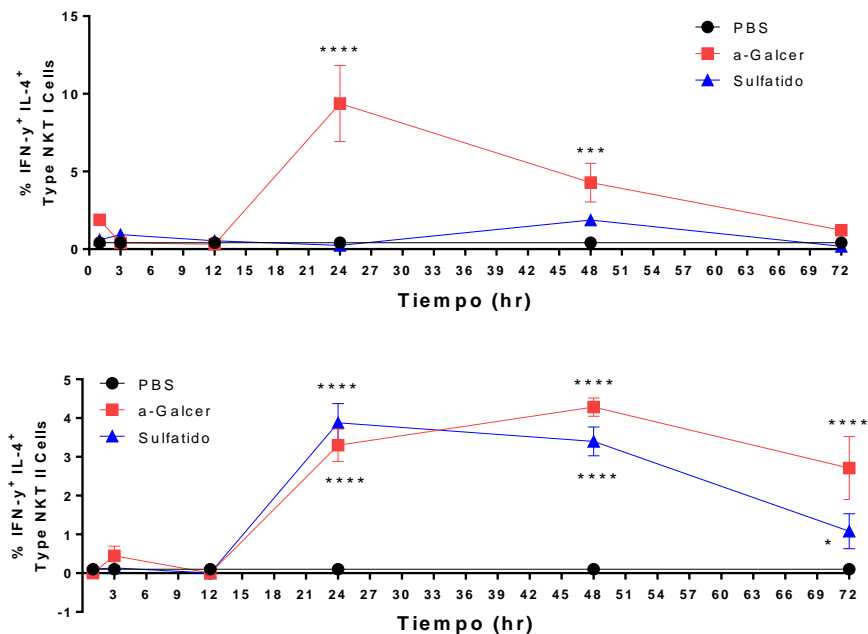
Se puede observar además que las células NKT tipo II estimuladas con sulfátido son capaces de producir solo IL-4 y no IFN- $\gamma$ . Sin embargo, la estimulación con  $\alpha$ -Galcer si promovió la producción tanto de IFN- $\gamma$  como de IL-4 por las células NKT tipo II.

Entonces en ambas células NKT, la estimulación con  $\alpha$ -Galcer promovió la producción de IL-4 e IFN- $\gamma$ . Además, en ambas células NKT, la estimulación con sulfátido promovió la producción solo de IL-4.

Estos datos demuestran que hay una correlación entre la presencia de las citoquinas IFN- $\gamma$  e IL-4 en muestras de suero y la producción de citoquinas por las células NKT tipo I y células NKT tipo II en el bazo cuando son estimuladas con  $\alpha$ -Galcer y sulfátido, respectivamente, y que este aumento coincide con la estimulación de estas células a la 1, 3, 12, 24 y 48 horas luego de su administración.

Además, de acuerdo con estos resultados, ambos tipos de células NKT mantienen su estado de activación hasta las 72 horas luego de su estimulación y regulan el receptor TCR disminuyendo su expresión alrededor de las 12 horas.

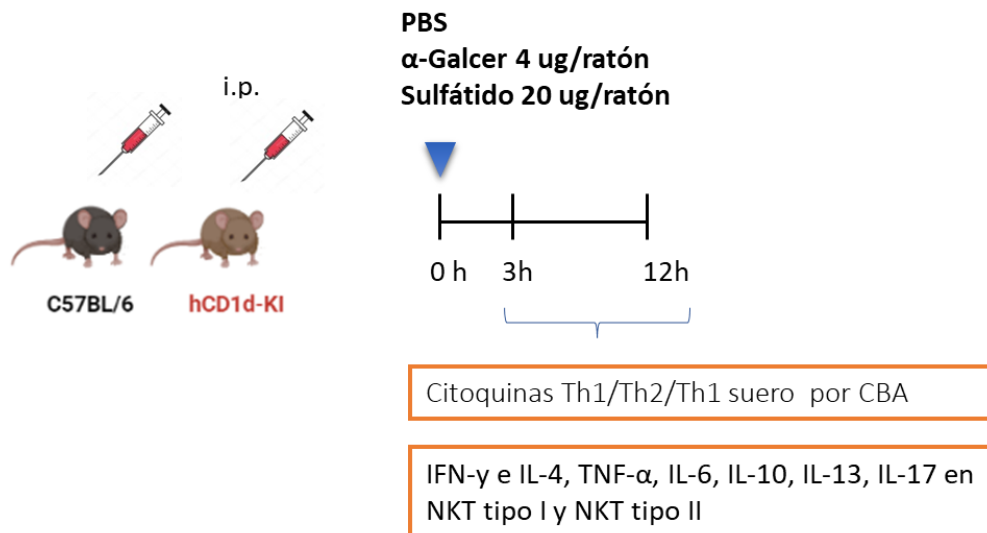
Se realizó un nuevo análisis de citometría para evaluar si las células NKT tipo I y NKT tipo II se encontraban produciendo al mismo tiempo las citoquinas IFN- $\gamma$  e IL-4 (Figura 17).  $\alpha$ -Galcer y sulfátido se han descrito como inductores simultáneos de citoquinas tipo Th1 y Th2 [120-122]. Se observó que las células NKT tipo I estimuladas solo con  $\alpha$ -Galcer, y no con sulfátido, fueron capaces de producir al mismo tiempo ambas citoquinas alrededor de las 24 horas tal como se observó en la figura 15. En el caso de las células NKT tipo II, se observó que tanto la estimulación con  $\alpha$ -Galcer como sulfátido promovió la producción de ambas citoquinas en alrededor de un 4% a las 24 horas. Por lo tanto, existe un porcentaje de células NKT tipo I y tipo II que se encuentran produciendo ambas citoquinas al mismo tiempo incrementándose significativamente alrededor de las 24 horas del estímulo con los lípidos (Figura 17).



**Figura 17: Evaluación cinética de las citoquinas IFN- $\gamma$  e IL-4 liberadas al mismo tiempo por las células NKT tipo I y células NKT tipo II en ratones wild type a través de citometría de flujo.** Las diferencias estadísticas están dadas por la aplicación de la prueba de comparación múltiple Two way ANOVA y como análisis post-hoc a la prueba de Dunnett entre los grupos controles y tratados. ( $P < 0.05$ ; \*); ( $P < 0.01$ ; \*\*); ( $P < 0.001$ ; \*\*\*).

## 2.2. Evaluación de la modulación de las funciones de las células NKT tipo I por las células NKT tipo II en ratones C57BL/6 y C57BL/6 Knock-in para CD1d humano a través de citometría de flujo.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se decidió realizar el siguiente experimento para evaluar la capacidad de las células NKT tipo II activadas por el lípido sulfátido de inducir una respuesta inmunomoduladora *in vivo* en ratones C57BL/6 sobre las células NKT tipo I activadas por  $\alpha$ -Galcer a las 3 y 12 horas, con el fin de evaluar el efecto de sulfátido a tiempos tempranos en la producción de citoquinas por las células NKT tipo I. En la figura 18 se muestra el diseño experimental. A cada grupo se le administró los lípidos  $\alpha$ -Galcer y sulfátido, en forma separada y en forma conjunta, los cuales fueron evaluados a las 3 y 12 horas de su administración.



**Figura 18:** Diseño experimental de la evaluación de la capacidad de las células NKT tipo II activadas por el lípido sulfátido de inducir una respuesta inmunomoduladora *in vivo* en ratones C57BL/6 y C57BL/6 Knock-in para CD1d sobre las células NKT tipo I activadas por  $\alpha$ -Galcer. Se hizo una evaluación de las citoquinas liberadas a las 3 y 12 horas de administrado los lípidos en forma libre a través de CBA y citometría de flujo. C57BL/6 (mCD1d); Knock-in CD1d (hCD1d); C57BL/6 N=3 por tratamiento con PBS;  $\alpha$ -Galcer; sulfátido;  $\alpha$ -Galcer + sulfátido; C57BL/6 Knock-in CD1d N=3 por tratamiento con PBS;  $\alpha$ -Galcer; sulfátido;  $\alpha$ -Galcer + sulfátido.

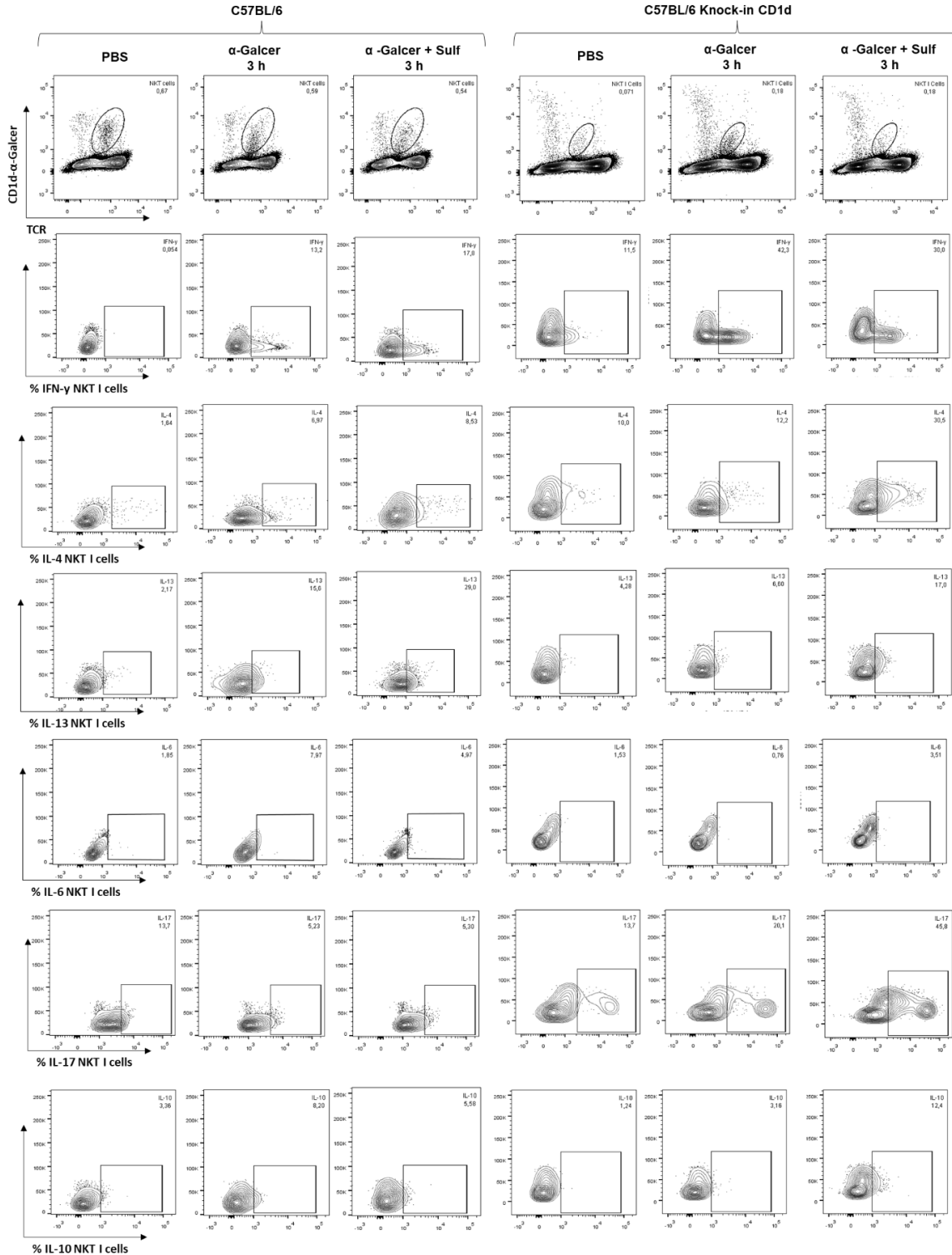
Con respecto al porcentaje de células NKT tipo I productoras de citoquinas en ratones C57BL/6 a través de citometría de flujo, el porcentaje de células NKT tipo I productoras de IFN- $\gamma$  e IL-13 se incrementó significativamente luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer a las 3 y 12 horas en comparación al grupo control, mientras que el porcentaje de células NKT tipo I productoras de IL-4 se incrementó significativamente luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer a las 3 horas en comparación al grupo control. Con respecto al porcentaje de células NKT tipo I productoras de IL-6 se incrementó significativamente luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer a las 12 horas en comparación al grupo control (Figuras 19, 20 y 21).

Además, el porcentaje de células NKT tipo I productoras de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17 en ratones C57BL/6 no disminuyeron significativamente luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer más sulfátido ni a las 3 ni 12 horas en comparación a la administración de solo  $\alpha$ -Galcer. Solo el porcentaje de células NKT tipo I productoras de IL-13 en ratones C57BL/6 disminuyó significativamente luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer más sulfátido en comparación a la administración de  $\alpha$ -Galcer a las 12 horas (Figuras 20 y 21).

Con respecto al porcentaje de células NKT tipo I productoras de citoquinas en ratones C57BL/6 Knock-in para CD1d humano a través de citometría de flujo, los porcentajes de células NKT tipo I productoras de IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17 se incrementaron significativamente luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer más sulfátido en comparación a la administración de  $\alpha$ -Galcer a las 3 horas (Figuras 19, 20 y 21).

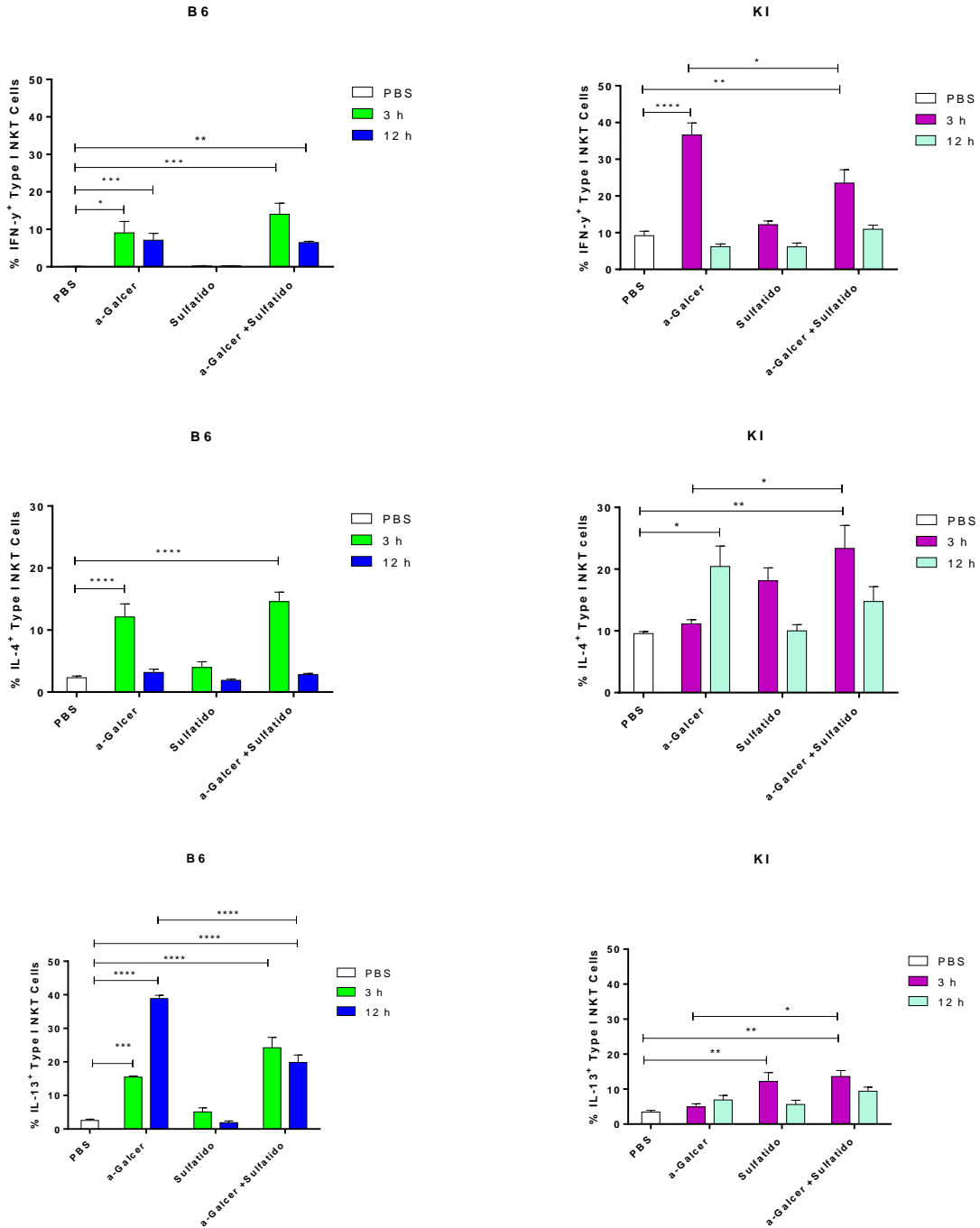
Solo el porcentaje de células NKT tipo I productoras de IFN- $\gamma$  disminuyó significativamente luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer más sulfátido en comparación a la administración de  $\alpha$ -Galcer a las 3 horas (Figuras 19, 20 y 21).

El porcentaje de células NKT tipo I productoras de citoquinas IL-10, IL-13, IL-17 se incrementaron significativamente luego de la administración de sulfátido a las 3 horas mientras que el porcentaje de células NKT tipo I productoras de IL-6 e IL-10 se incrementaron luego de la administración de sulfátido a las 12 horas en comparación al grupo control (Figuras 19, 20 y 21).

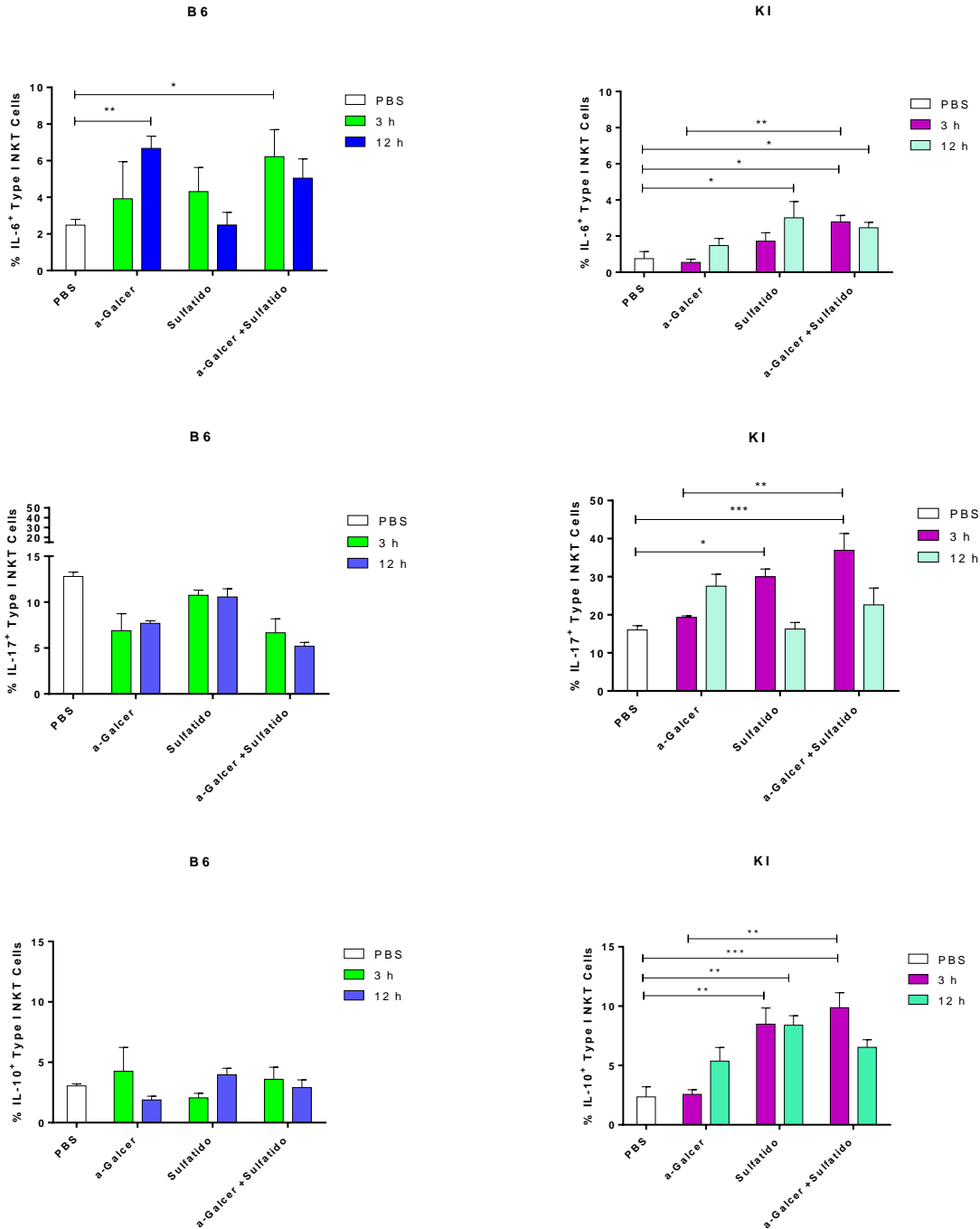


**Figura 19:** Citometría de flujo de células NKT tipo I productoras de citoquinas IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13, IL-6, IL-17 e IL-10 a las 3 horas para evaluar la capacidad de las células NKT tipo II activadas por el lípido sulfátido de inducir una respuesta inmunomodulatoria *in vivo* en ratones C57BL/6 y C57BL/6 Knock-in para CD1d sobre las células NKT tipo I activadas por  $\alpha$ -Galcer.





**Figura 20:** Porcentaje de células NKT tipo I productoras de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-13 a las 3 y 12 horas para evaluar la capacidad de las células NKT tipo II activadas por el lípido sulfátido de inducir una respuesta inmunomodulatoria *in vivo* en ratones C57BL/6 (B6) y C57BL/6 Knock-in (KI) para CD1d sobre las células NKT tipo I activadas por a-Galcer. Las diferencias estadísticas están dadas por la aplicación de la prueba de comparación múltiple One way ANOVA y como análisis post-hoc a la prueba de Dunnett entre los grupos controles y tratados. (P < 0.05; \*); (P < 0.01; \*\*); (P < 0.001, \*\*\*).



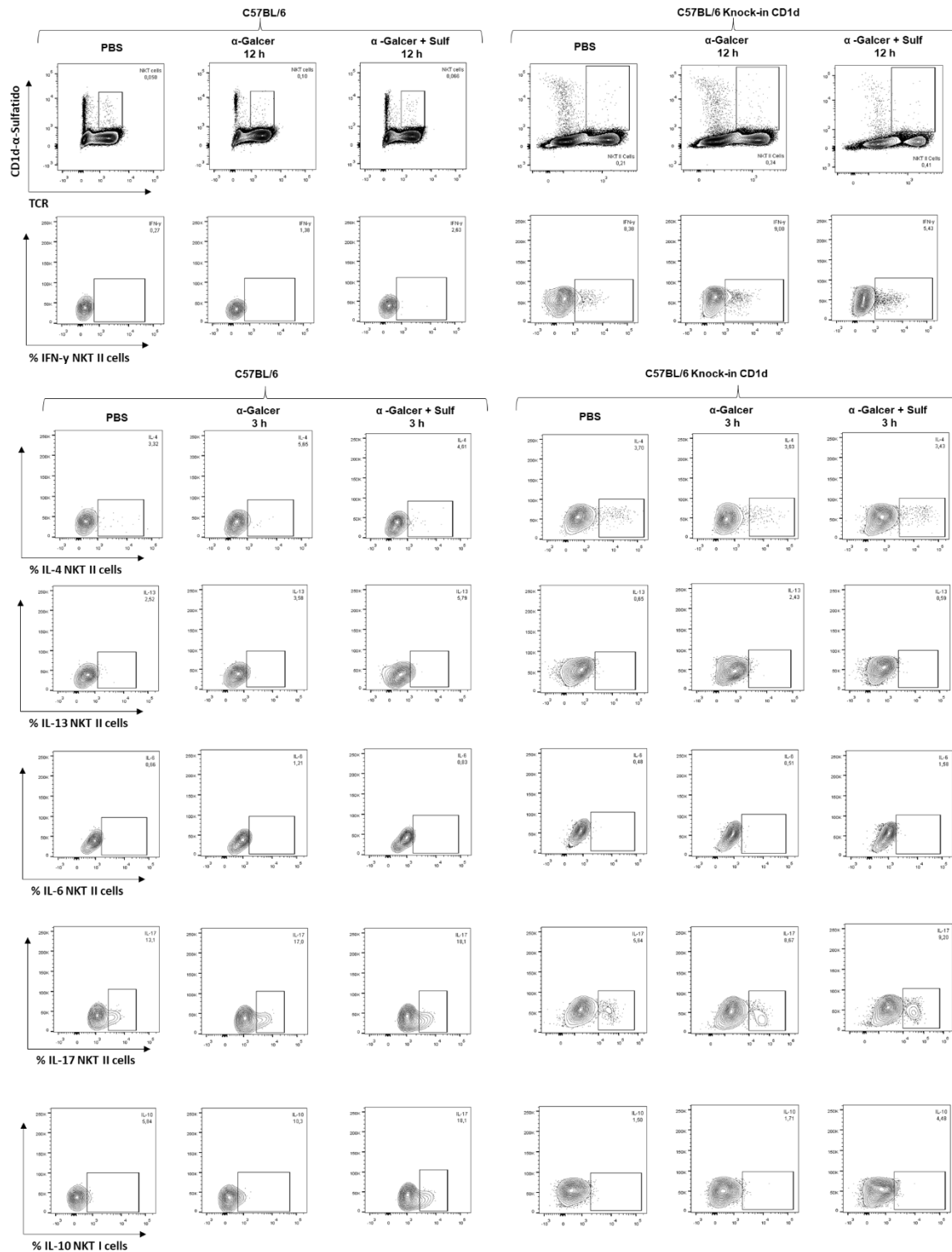
**Figura 21:** Porcentaje de células NKT tipo I productoras de IL-6, IL-17 e IL-10 a las 3 y 12 horas para evaluar la capacidad de las células NKT tipo II activadas por el lípido sulfátido de inducir una respuesta inmunomodulatoria *in vivo* en ratones C57BL/6 (B6) y C57BL/6 Knock-in (KI) para CD1d sobre las células NKT tipo I activadas por a-Galcer. Las diferencias estadísticas están dadas por la aplicación de la prueba de comparación múltiple One way ANOVA y como análisis post-hoc a la prueba de Dunnett entre los grupos controles y tratados. (P < 0.05; \*); (P < 0.01; \*\*); (P < 0.001, \*\*\*).

Los porcentajes de células NKT tipo II productoras de IFN- $\gamma$  en ratones C57BL/6 se incrementó a las 3 horas y el porcentaje de IL-13 se incrementó a las 12 horas luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer. El porcentaje de células NKT tipo II productoras de IL-6 en ratones C57BL/6 se incrementó significativamente luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer más sulfátido en comparación a la administración de  $\alpha$ -Galcer a las 12 horas (Figuras 22, 23 y 24).

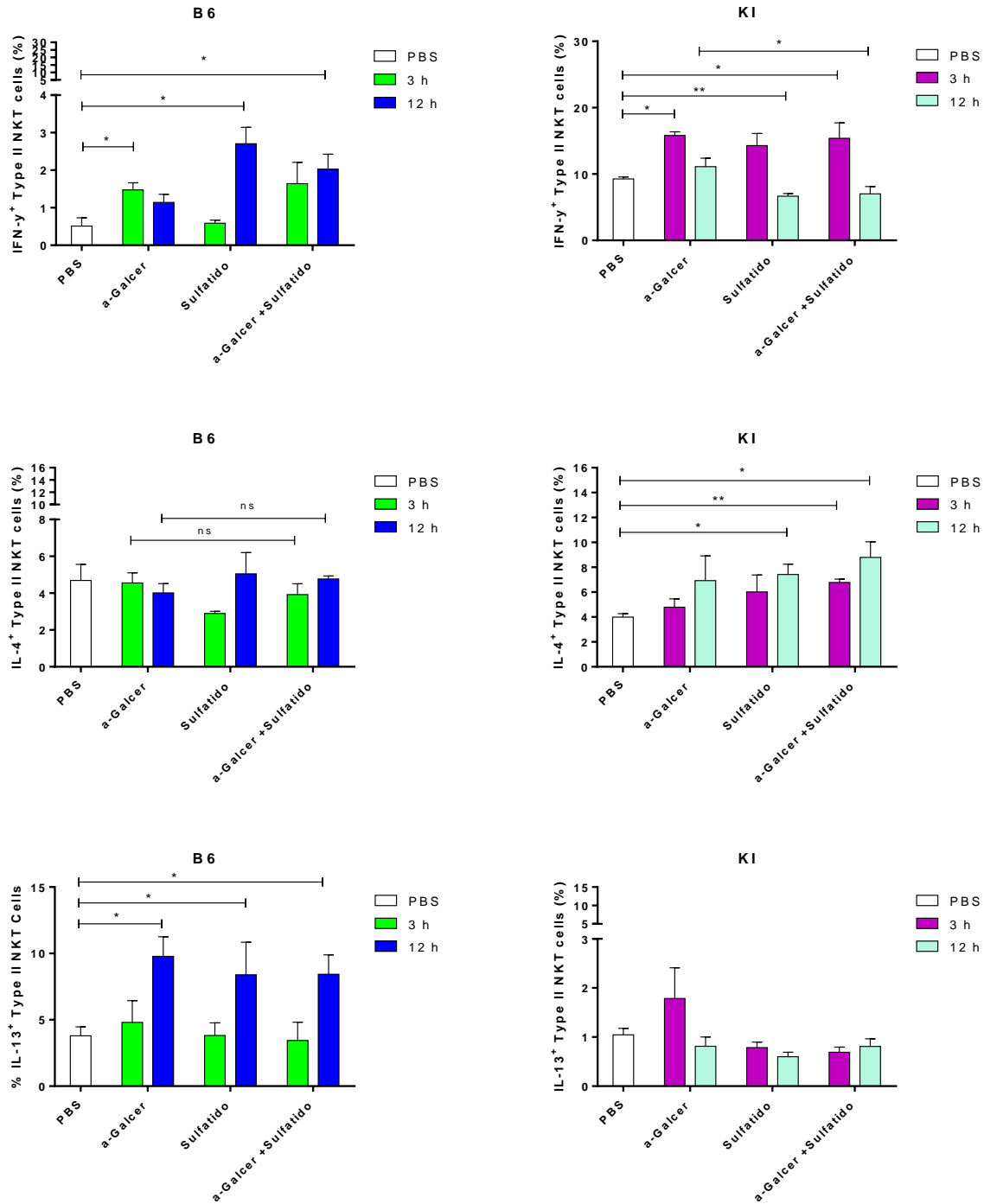
El porcentaje de células NKT tipo II productoras de IFN- $\gamma$  e IL-17 en ratones C57BL/6 Knock-in para CD1d humano se incrementó a las 3 horas luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer. El porcentaje de células NKT tipo II productoras de IL-4, IL-6 e IL-10 en ratones C57BL/6 Knock-in para CD1d humano se incrementó a las 12 horas luego de la administración de sulfátido.

Con respecto al porcentaje de células NKT tipo II productoras de citoquinas en ratones C57BL/6 Knock-in para CD1d humano a través de citometría de flujo, los porcentajes de células NKT tipo II productoras de IL-6 e IL-10 se incrementaron y los porcentajes de células NKT tipo II productoras de IFN- $\gamma$  disminuyeron significativamente luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer más sulfátido en comparación a la administración de  $\alpha$ -Galcer a las 3 horas.

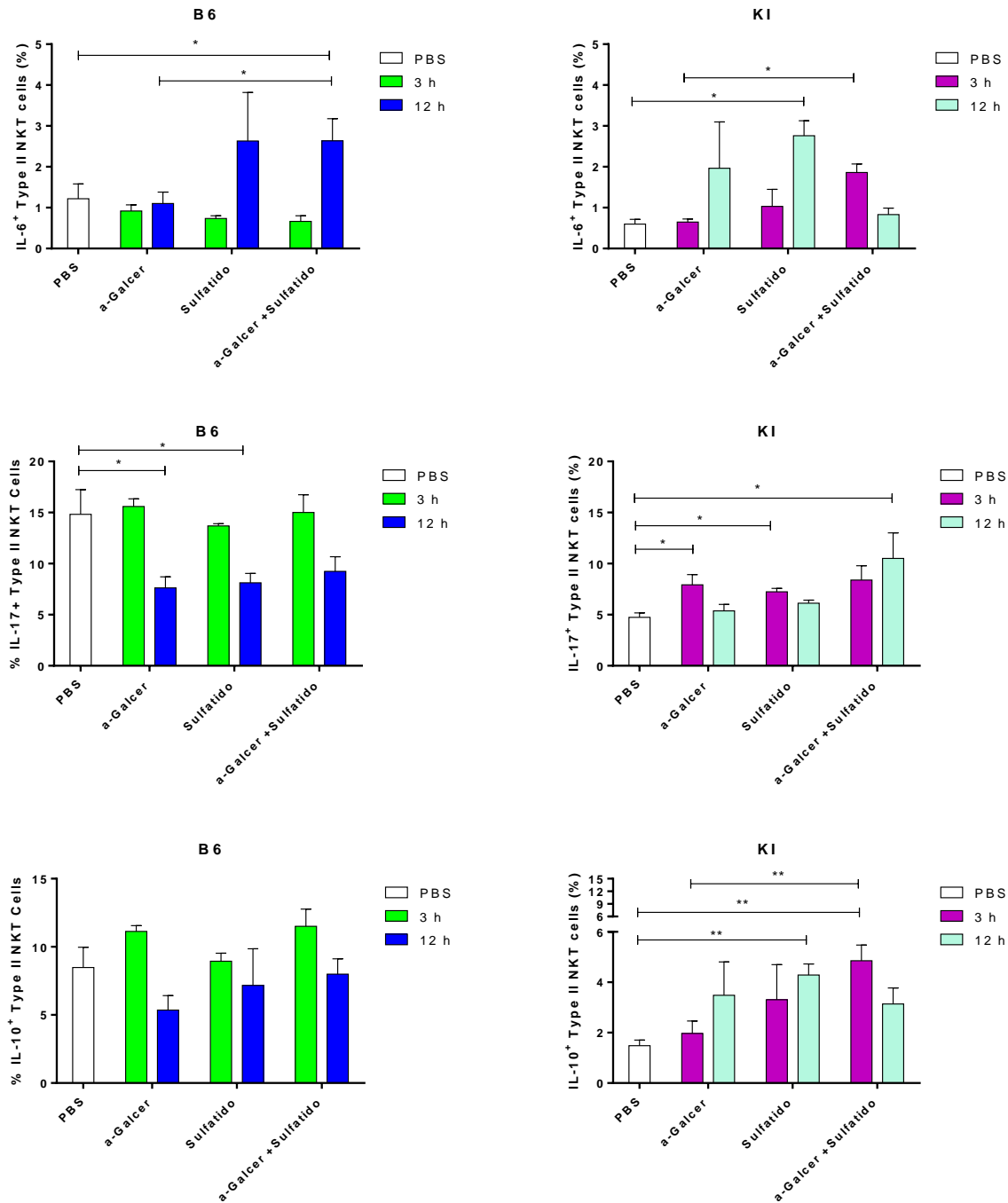
No hay evidencia hasta ahora del estudio cinético de la liberación de citoquinas por la administración de sulfátido en el bazo. Solo hay un estudio previo donde se encontró que la activación hepática de las células NKT tipo II resultó en un incremento selectivo de citoquinas. Ellos encontraron que luego de la inyección i.p. de 20  $\mu$ g de sulfátido en ratones C57BL/6, el porcentaje de células tetrámero sulfátido/CD1d+ se incrementaron en 1 hr, el peak se produjo a las 3 horas y retornó a las 24 hrs [97].



**Figura 22:** Citometría de flujo de células NKT tipo II productoras de citoquinas IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13, IL-6, IL-17 e IL-10 a las 3 y 12 horas para evaluar la capacidad de las células NKT tipo II activadas por el lípido sulfatido de inducir una respuesta inmunomodulatoria *in vivo* en ratones C57BL/6 (B6) y C57BL/6 Knock-in (KI) para CD1d sobre las células NKT tipo I activadas por  $\alpha$ -Galcer.

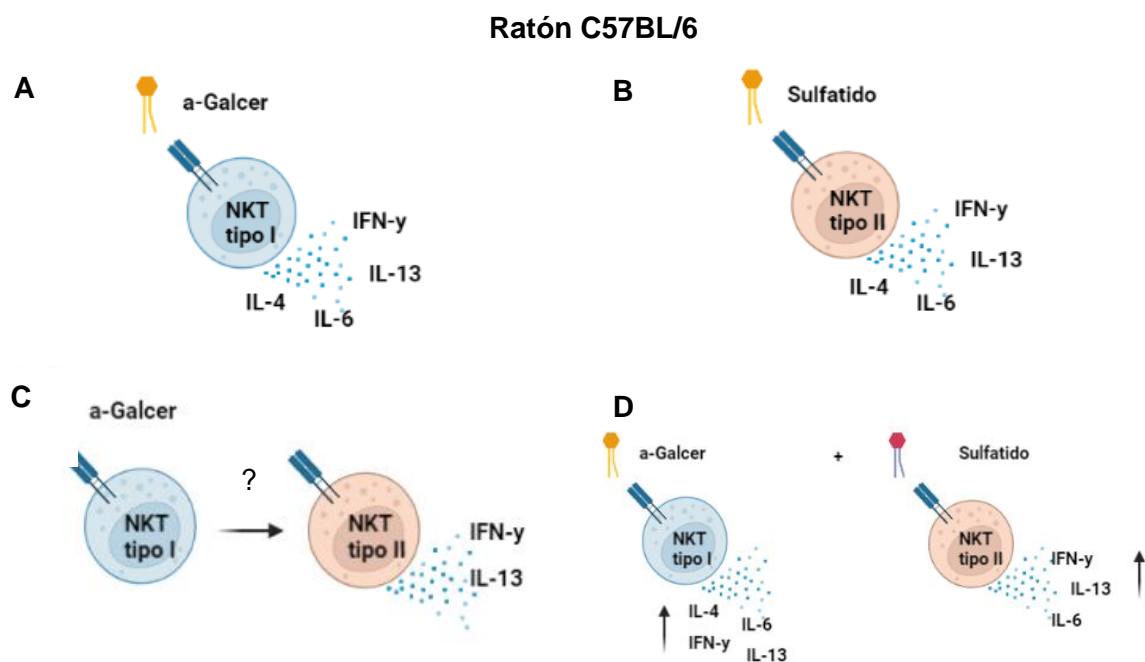


**Figura 23:** Porcentaje de células NKT tipo II productoras de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-13 a las 3 y 12 horas para evaluar la capacidad de las células NKT tipo II activadas por el lípido sulfátido de inducir una respuesta inmunomodulatoria *in vivo* en ratones C57BL/6 (B6) y C57BL/6 Knock-in (KI) para CD1d sobre las células NKT tipo I activadas por a-Galcer. Las diferencias estadísticas están dadas por la aplicación de la prueba de comparación múltiple One way ANOVA y como análisis post-hoc a la prueba de Dunnett entre los grupos controles y tratados. (P < 0.05; \*); (P < 0.01; \*\*); (P < 0.001; \*\*\*).



**Figura 24:** Porcentaje de células NKT tipo II productoras de IL-6, IL-17 e IL-10 a las 3 y 12 horas para evaluar la capacidad de las células NKT tipo II activadas por el lípido sulfátido de inducir una respuesta inmunomodulatoria *in vivo* en ratones C57BL/6 (B6) y C57BL/6 Knock-in (KI) para CD1d sobre las células NKT tipo I activadas por a-Galcer. Las diferencias estadísticas están dadas por la aplicación de la prueba de comparación múltiple One way ANOVA y como análisis post-hoc a la prueba de Dunnett entre los grupos controles y tratados. (P < 0.05; \*); (P < 0.01; \*\*); (P < 0.001; \*\*\*).

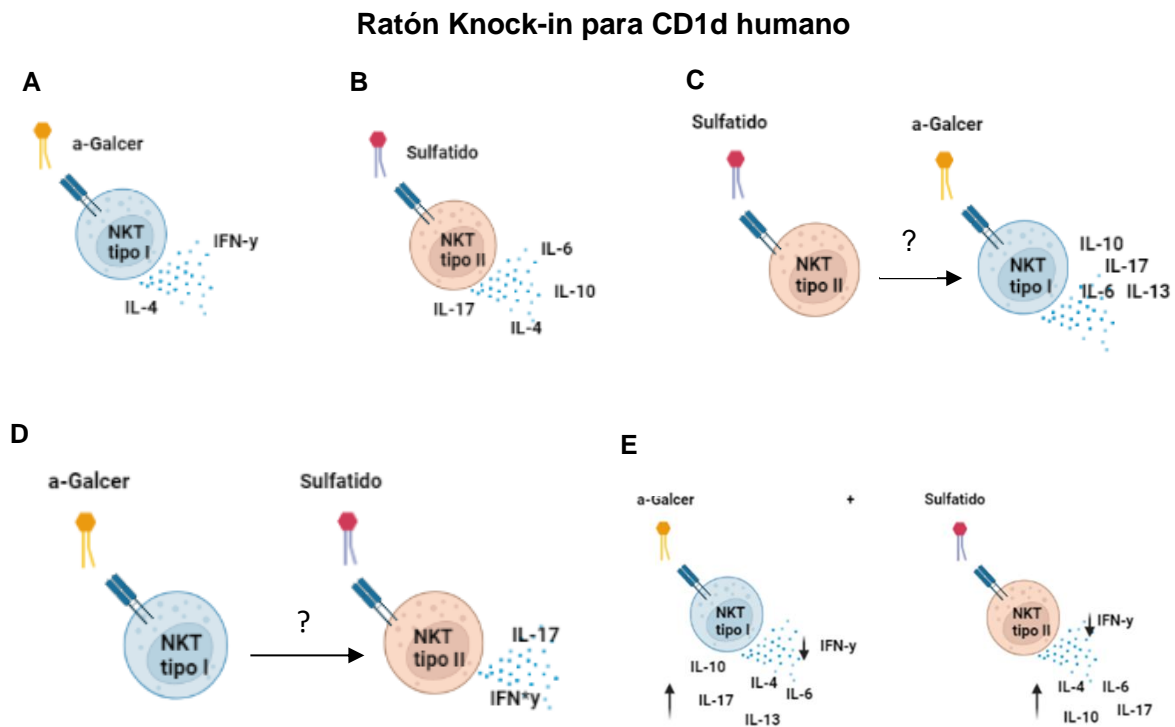
La activación directa de las células NKT ocurre cuando el TCR interactúa con un ligando presentado por una molécula CD1d presente en las células dendríticas (Figura 25). Estas presentan  $\alpha$ -GalCer y, posteriormente, activan a la célula NKT tipo I. Esta activación dependiente de CD1d es seguida por la producción de citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-4 tal como es descrito en la literatura en ratones wild-type [123]. Además de estas citocinas se observó la producción de citocinas como IL-13 e IL-6. La producción de IL-13 por las células NKT tipo I ha demostrado que exacerba la fibrosis hepática [124] y regula las respuestas inmunitarias en el asma [75] y la colitis inducida por oxazolona [125]. La IL-6 promueve la producción de inmunoglobulina IgG en los linfocitos B activados [126] y se produce en una variedad de situaciones clínicas asociadas con la inflamación [127]. Las células dendríticas también pueden presentar sulfátido y posteriormente activan a la célula NKT tipo II. Esta activación fue seguida de la producción de IL-4, IL-6, IL-13 e IFN- $\gamma$ . La activación de ambas células NKT promueve la producción de una variedad de citocinas (IL-4, IL6, IL-13 e IFN- $\gamma$ ) y  $\alpha$ -GalCer estimula la producción de IFN e IL-13 por las células NKT tipo II (Figura 25).



**Figura 25:** Modelo propuesto de inmunoregulación de las funciones efectoras entre las células NKT tipo I y tipo II en ratones C57BL/6. A)  $\alpha$ -Galcer activa a las células NKT tipo I y promueve la producción de citocinas. B) Sulfátido activa a las células NKT tipo II y promueve la producción de citocinas. C) y D) La activación de ambas células NKT promueve la producción de una variedad de citocinas y  $\alpha$ -Galcer estimula la producción de IFN e IL-13 por las células NKT tipo II.

Como puede observarse en la figura 26, las células dendríticas a través de la molécula CD1d presentan  $\alpha$ -GalCer y, posteriormente, activan a la célula NKT tipo I a través de su receptor TCR. Esta activación dependiente de CD1d es seguida por la producción de citoquinas como IFN- $\gamma$  e IL-4 por las células NKT tipo I en ratones Knock-in para CD1d tal como se ha descrito en la literatura [128].

Las células dendríticas también pueden presentar sulfátido a través de CD1d y posteriormente activan a la célula NKT tipo II a través de su receptor TCR. Esta activación fue seguida de la producción de IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17. En comparación a ratones wild-type, las células NKT tipo II provenientes de ratones knock-in produjeron la producción de IL-10. Además, en comparación a ratones wild type, sulfátido promovió la producción de IL-6, IL-10, IL-13 e IL-17.  $\alpha$ -Galcer promovió la producción de IFN- $\gamma$  e IL-17 por las células NKT tipo II. La activación de ambas células NKT promovió la producción de una variedad de citoquinas tales como IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17. Cuando ambas células NKT fueron activadas, se produjo una disminución de la producción de IFN- $\gamma$  por ambas células (Figura 26).



**Figura 26:** Modelo propuesto de inmunoregulación de las funciones efectoras entre las células NKT tipo I y tipo II en ratones C57BL/6 Knock-in. A)  $\alpha$ -Galcer activa a las células NKT tipo I y promueve la producción de citoquinas. B) Sulfátido activa a las células NKT tipo II y promueve la producción de citoquinas. C), D) y E) La activación de ambas células NKT promueve la producción de una variedad de citoquinas y  $\alpha$ -Galcer estimula la producción de IFN e IL-17 por las células NKT tipo II y sulfátido estimula la producción de IL-6, IL-10, IL-13 e IL-17.



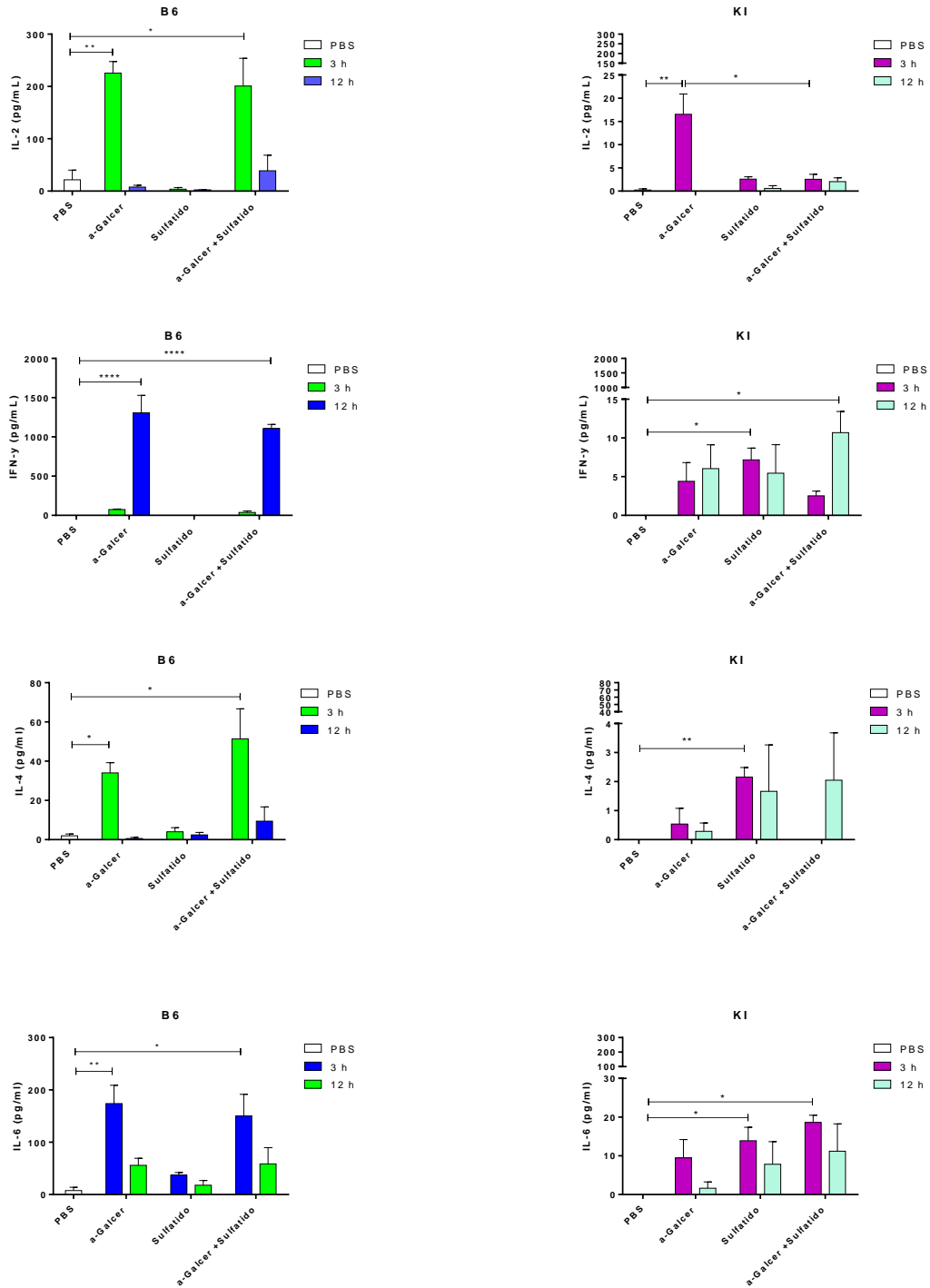
### **2.3 Cuantificación de citoquinas en ratones C57BL/6 y C57BL/6 Knock-in para CD1d humano a través de CBA.**

En los experimentos descritos anteriormente fueron evaluadas las concentraciones de citoquinas a las 3 y 12 horas luego del tratamiento. Estas fueron determinadas a través del uso del kit de citoquinas CBA (Cytometric Bead Array mouse Th1/Th2/Th17) por citometría de flujo. Las curvas de calibración correspondieron a curvas de intensidad de fluorescencia media (MFI) versus concentración de las citoquinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-17A e IL-10. El límite de detección para cada citoquina a través de este método se encuentra al pie de la figura suplementaria 3.

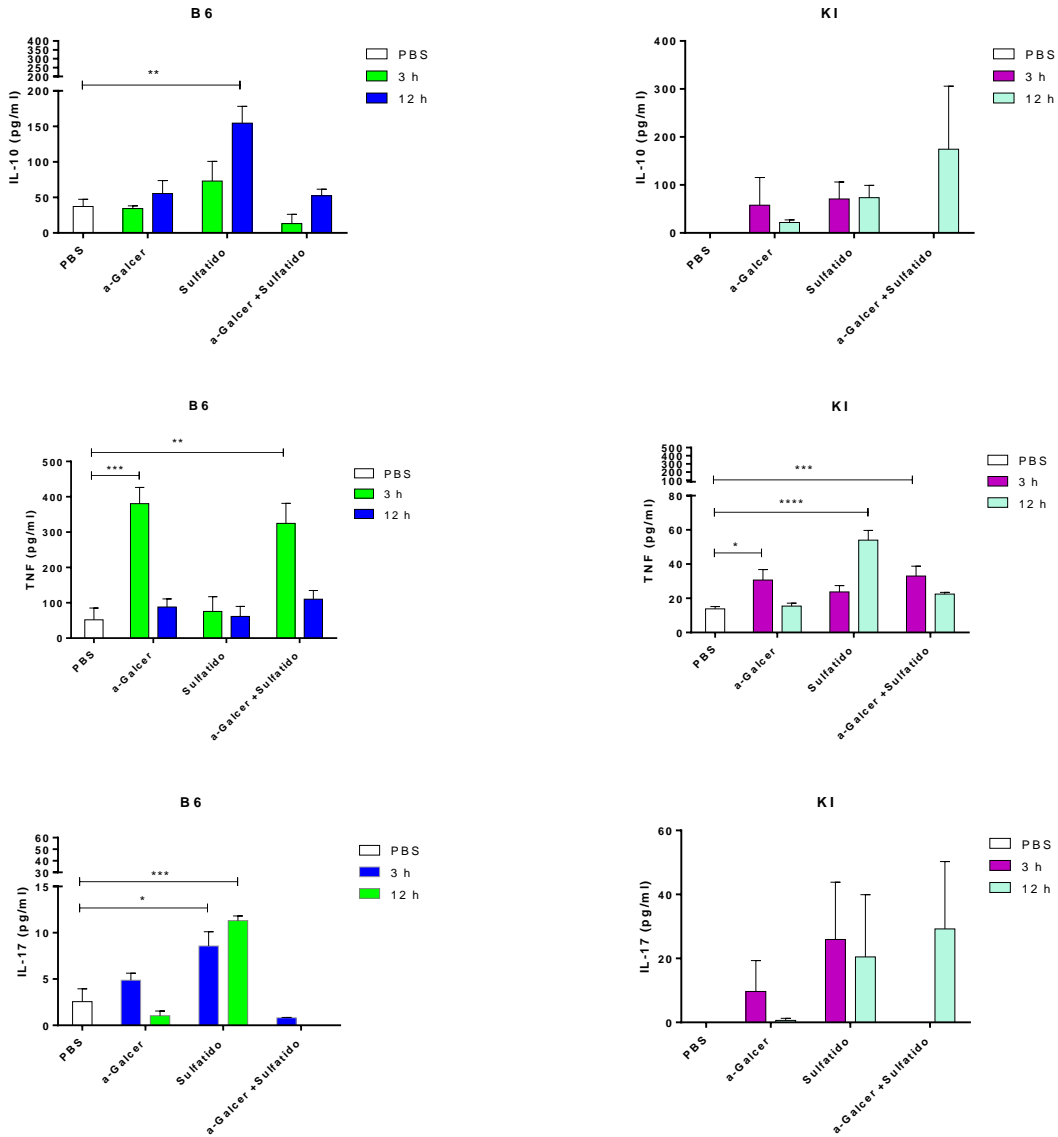
Las concentraciones de IL-2 en suero de ratones C57BL/6 se incrementaron luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer en comparación al grupo control a las 3 horas. La concentración de IL-2 se mantuvieron en niveles basales luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer más sulfátido en comparación al grupo  $\alpha$ -Galcer ni a las 3 ni 12 horas luego de su administración. Mientras que las concentraciones de IL-2 en suero de ratones Knock-in para CD1d humano se incrementaron significativamente luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer a las 3 horas en comparación al grupo control. La concentración de IL-2 disminuyó significativamente luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer más sulfátido en comparación al grupo  $\alpha$ -Galcer a las 3 horas luego de su administración (Figura 27).

Las concentraciones de IFN- $\gamma$  en suero de ratones C57BL6 se incrementaron significativamente luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer a las 12 horas en comparación al grupo control. Mientras que las concentraciones de IFN- $\gamma$  en suero de ratones Knock-in para CD1d humano se incrementaron significativamente luego de la administración de sulfátido a las 3 horas y  $\alpha$ -Galcer más sulfátido a las 12 horas en comparación al grupo control. Las concentraciones de IFN- $\gamma$  no disminuyó ni se incrementó luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer más sulfátido en comparación al grupo  $\alpha$ -Galcer ni a las 3 ni 12 horas luego de su administración (Figura 27).

Las concentraciones de IL-4 en suero de ratones C57BL6 se incrementó significativamente luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer a las 3 horas en comparación al grupo control. Mientras que las concentraciones de IL-4 en suero de ratones Knock-in para CD1d humano se incrementó significativamente luego de la administración de sulfátido a las 3 horas en comparación al grupo control. La concentración de IL-4 se mantuvo en sus niveles basales luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer y sulfátido en comparación al grupo  $\alpha$ -Galcer a las 3 ni 12 horas luego de su administración (Figura 27).



**Figura 27:** Concentraciones de citoquinas IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-6 en suero determinadas por la técnica CBA en ratones C57BL6 (B6) y C57BL6 Knock-in (KI) para CD1d humano a las 3 y 12 horas de administrado los lípidos,  $\alpha$ -Galcer y sulfátido. Las diferencias estadísticas están dadas por la aplicación de la prueba de comparación múltiple One way ANOVA y como análisis post-hoc a la prueba de Dunnett entre los grupos controles y tratados. ( $P < 0.05$ ; \*); ( $P < 0.01$ ; \*\*); ( $P < 0.001$ ; \*\*\*).



**Figura 28:** Concentraciones de citoquinas IL-10, TNF e IL-17 en suero determinadas por la técnica CBA en ratones C57BL6 (B6) y C57BL6 Knock-in (KI) para CD1d humano a las 3 y 12 horas de administrado los lípidos, a-Galcer y sulfátido para evaluar la capacidad de las células NKT tipo II activadas por el lípido sulfátido de inducir una respuesta inmunomoduladora sobre las células NKT tipo I activadas por a-Galcer. Las diferencias estadísticas están dadas por la aplicación de la prueba de comparación múltiple One way ANOVA y como análisis post-hoc a la prueba de Dunnett entre los grupos controles y tratados. (P < 0.05; \*); (P < 0.01; \*\*); (P < 0.001; \*\*\*).

Las concentraciones obtenidas así como los tiempos en horas son similares a lo descrito luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer [129, 130]. Para IFN- $\gamma$  se describe que presenta un peak a las 16 horas después de la administración de  $\alpha$ -Galcer a una concentración similar a la obtenida en este trabajo [129, 130]. Se ha descrito que los niveles de IFN- $\gamma$  en el suero se incrementan a las 3 horas de administrado sulfátido mientras que los niveles de IL-4 son indetectables hasta las 48 horas [97].

Las concentraciones de IL-6 en suero de ratones C57BL6 se incrementó significativamente luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer a las 3 horas en comparación al grupo control. Mientras que las concentraciones de IL-6 en suero de ratones C57BL6 Knock-in para CD1d humano se incrementó significativamente luego de la administración de sulfátido a las 3 horas en comparación al grupo control.

La concentración de IL-6 no disminuyó ni se incrementó luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer y sulfátido, en comparación al grupo  $\alpha$ -Galcer ni a las 3 ni 12 horas luego de su administración (Figura 27).

Las concentraciones de IL-10 en suero de ratones C57BL6 se incrementó significativamente luego de la administración de sulfátido a las 12 horas en comparación al grupo control. Mientras que las concentraciones de IL-10 en suero de ratones Knock-in para CD1d humano no disminuyó ni se incrementó luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer y sulfátido, en comparación al grupo  $\alpha$ -Galcer ni a las 3 ni 12 horas luego de su administración (Figura 28).

Las concentraciones de TNF en suero de ratones C57BL6 se incrementaron significativamente luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer a las 3 horas en comparación al grupo control. Mientras que las concentraciones de TNF en suero de ratones Knock-in para CD1d humano se incrementaron significativamente luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer a las 3 horas y, de sulfátido a las 12 horas en comparación al grupo control. La concentración de TNF no disminuyó ni se incrementó luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer y sulfátido en comparación al grupo  $\alpha$ -Galcer (Figura 28).

Las concentraciones de IL-17 en suero de ratones C57BL6 se incrementaron significativamente luego de la administración de sulfátido a las 3 y 12 horas en comparación al grupo control. Mientras que las concentraciones de IL-17 en suero de ratones Knock-in para CD1d humano no disminuyó ni se incrementó luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer y sulfátido, en comparación al grupo  $\alpha$ -Galcer ni a las 3 ni 12 horas (Figura 28).

Se ha descrito que las células microgliales y astrocitos de rata activados por sulfátido incrementan los niveles de citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  [131] y los macrófagos murinos producen TGF- $\beta$  e IL-6 luego de fagocitar células apoptóticas recubiertas de sulfátido [132].

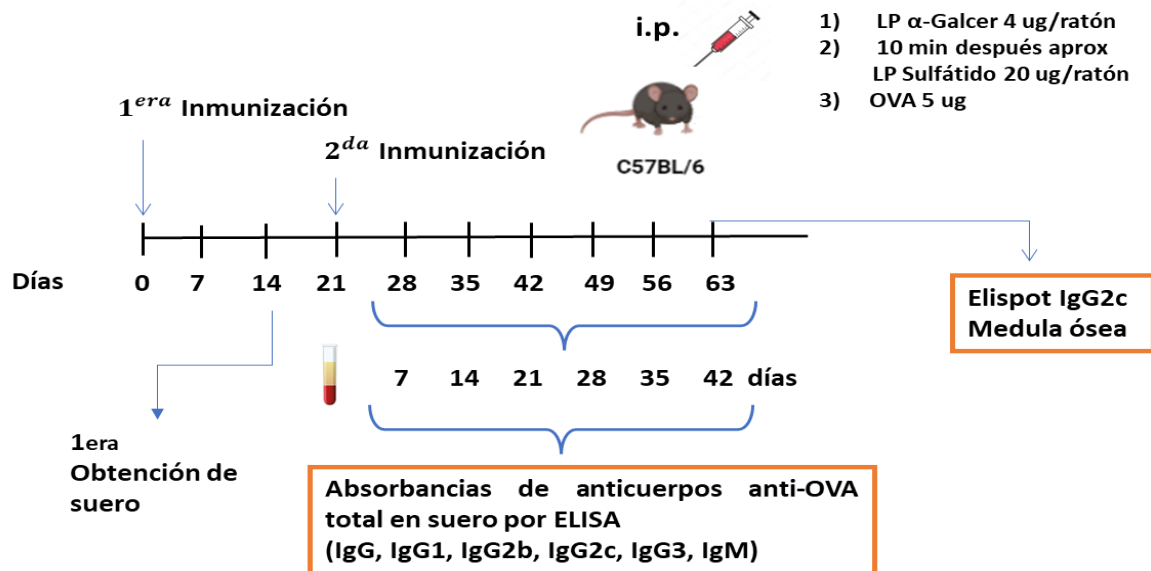
Además de estos efectos, las células NKT tipo II protegen de la encefalomiелitis autoinmune experimental al suprimir la producción de IFN- $\gamma$  e IL-4 [17]. Más aún, la activación de las células NKT tipo II por sulfátido previene el daño por reperfusión isquémica hepática al reducir la producción de IFN- $\gamma$  por las células NKT tipo I [91]. También previene la enfermedad hepática inflamatoria inducida por concavalina A por inducción de anergia de las células NKT tipo I [97]. Asimismo, el efecto protector de las células NKT tipo I en la inmunidad tumoral es suprimido por células NKT tipo II activadas por sulfátido [37]. Por otro lado, las células NKT tipo II productoras de IL-13, induce la producción de TGF- $\beta$  por células mieloides en la inmunovigilancia tumoral [96, 133]. Estos estudios apoyan la existencia de una modulación de las funciones efectoras de las células NKT tipo I por las células NKT tipo II observada en la producción de citoquinas en este trabajo.

### **3. Evaluar el efecto de la activación de células NKT tipo II sobre las funciones efectoras de las células NKT tipo I y linfocitos B en ratones wild type tratados con el lípido sulfátido libre o contenido en liposomas.**

Se ha demostrado que los liposomas actúan como potentes adyuvantes y los conjugados de liposomas con el antígeno son aplicables al desarrollo de vacunas [134]. Los efectos sobre la respuesta inmune varían según la naturaleza del enlace de los antígenos ligados a la superficie y encapsulados en liposomas ya que poseen propiedades distintas [135]. Esta diferencia se cree que se debe a la activación diferencial de las poblaciones de células T helper. Donde los ligandos unidos a la superficie del liposoma parecen estimular preferentemente a las células T CD4, donde estas proliferan y maduran hasta convertirse en células T helper mientras que encapsuladas no [135]. La activación de estas células provee ayuda para estimular la proliferación de las células B y su diferenciación hacia células B de memoria y células plasmáticas secretoras de anticuerpo. Se ha demostrado en los últimos años que las células NKT tipo I influyen la producción de anticuerpos [136, 137]. Primero se demostró que las células NKT de sangre periférica humana estimularon la producción de anticuerpo por células B autólogas en respuesta a  $\alpha$ -galactosylceramida [136]. También se demostró que la producción de IgM inducida por un alérgeno de contacto por células B (células B-1 expresando CD1d) de la zona marginal esplénica murina fue dependiente de células NKT restringidas por CD1d y de IL-4, en donde IgM indujo la fijación del complemento [138]. Además, se ha encontrado que  $\alpha$ -Galcer tuvo un efecto adyuvante en las respuestas humorales a los antígenos dependientes e independientes de células T [44]. Las respuestas anti-OVA o KLH específicas mejoraron considerablemente con la co-

administración de  $\alpha$ -Galcer durante la vacunación [44]. Estos hallazgos respaldan la noción de que las células NKT pueden proporcionar ayuda para la producción de anticuerpos y pueden explotarse en situaciones en las que se sabe que la inmunidad mediada por anticuerpos es beneficiosa.

Dada esta información se realizó un ensayo *in vivo* para evaluar el efecto de la estimulación de células NKT tipo II activadas por sulfátido C24:1 y el efecto de la estimulación de células NKT tipo I activadas por  $\alpha$ -Galcer sobre las funciones efectoras de células B en ratones C57BL/6. La dosis propuesta del lípido sulfátido fue de 20 ug, del lípido  $\alpha$ -Galcer 4 ug y de la proteína OVA EndoFit 5 ug (Figura 29).



**Figura 29:** Diseño experimental que muestra dos inmunizaciones y su vía de administración realizadas a ratones C57BL/6 con el objetivo de evaluar la respuesta inmune humoral por modulación de las funciones de las células NKT tipo I y células B por la activación de las células NKT tipo II mediante el uso de liposomas conteniendo el ligando lipídico sulfátido y antígeno Ovalbumina. Los días 14, 28, 35, 42 y 63 días desde la primera inmunización se obtuvieron muestras de suero para analizar los distintos isotipos de anticuerpo IgM e IgGs (IgG1, IgG2b, IgG2c, IgG3). La segunda inmunización se realizó a los 21 días de la primera inmunización. 7 semanas post segunda inmunización se evaluó las células secretoras de anticuerpos IgG2c en la medula ósea. C57BL/6 N=5 por tratamiento con PBS, OVA, OVA  $\alpha$ -Galcer, OVA sulfátido C24:1 y OVA  $\alpha$ -Galcer + sulfátido C24:1; LP, LP OVA, LP OVA  $\alpha$ -Galcer, LP OVA sulfátido C24:1, LP OVA  $\alpha$ -Galcer + LP sulfátido C24:1, LP OVA  $\alpha$ -Galcer + sulfátido C24:1, LP OVA  $\alpha$ -Galcer + LP OVA sulfátido C24:1, CFA OVA.

Cada grupo correspondía a 5 ratones de 6 a 8 meses de edad. Se realizaron dos inmunizaciones, al día 1 y 21. Los días 14, 28, 35, 42 y 63 días desde la primera inmunización se obtuvieron muestras de suero para analizar los distintos isotipos de anticuerpo IgM e IgG (IgG1, IgG2b, IgG2c, IgG3). La segunda inmunización se realizó a los 21 días de la primera inmunización. 6 semanas post segunda inmunización se evaluó las células secretoras de

anticuerpo en la medula ósea. Se sintetizaron 5 tipos de liposomas conteniendo: liposoma solo, liposoma conteniendo sulfátido, liposoma conteniendo OVA, liposoma conteniendo sulfátido más OVA, liposoma conteniendo  $\alpha$ -Galcer más OVA. Los liposomas estuvieron compuestos por 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine (EPC), colesterol, PEG-2000, Biotinyl CAP PE y el lípido sulfátido o el lípido  $\alpha$ -Galcer. La composición liposomal es indicada en la tabla 2.

Posteriormente para unir OVA a la superficie del liposoma, la OVA fue biotinilada a 4°C durante la noche. Para obtener solo OVA biotinilada, ésta debió ser purificada mediante cromatografía de exclusión molecular empleando una columna de desalinización obteniendo alrededor de 7 a 10 fracciones. Para cada fracción se determinó la concentración de la proteína mediante el método de ácido bicinconínico. Además, se cuantificó el grado de biotinilación de la proteína a través de la utilización de un Kit (1,5 mmol de biotina/mmol OVA). Para unir la OVA biotinilada a la superficie del liposoma, el liposoma contenía fosfolípidos biotinilados, y a través del uso de estreptavidina, la OVA quedó en la superficie de éste. La incubación fue realizada a 4°C durante la noche, a una razón molar de 2:1:2 OVA/Estreptavidina/Liposoma. Al día siguiente, se ultracentrifugó a 80.000 g por 30 min y el pellet se resuspendió en PBS.

El tamaño promedio de los liposomas caracterizado por el equipo Nanosight fueron liposomas conteniendo solo OVA:  $164,1 \pm 55,8$  nm, OVA más lípido  $\alpha$ -Galcer  $161,7 \pm 54,0$  nm y, OVA más lípido sulfátido  $166,7 \pm 70,5$  nm. El tamaño promedio de los liposomas caracterizado por la microscopía electrónica fueron liposomas conteniendo solo OVA:  $128.9 \pm 24.0$  nm, OVA más lípido  $\alpha$ -Galcer  $175.2 \pm 13.4$  nm y, OVA más lípido sulfátido  $164.6 \pm 39.1$  nm (Figura 30).

**Tabla 2:** Composición liposomal para anclar OVA en la superficie de los diferentes liposomas utilizados. En la tabla se muestra el porcentaje, nmoles y ug de fosfatidilcolina de huevo (EPC), colesterol (CHOL), polietilenglicol 2000 (PEG 2000), biotinyl CAP PE,  $\alpha$ -Galcer y sulfátido C24:1.

LP Solo con OVA				
Composición Liposoma para anclar OVA	%	nmoles	PM (g/mol)	ug
EPC	60,2	52,00	770,123	40,05
CHOL	33,8	29,20	388,84	11,35
PEG 2000	4,4	3,80	2791	10,61
BIOTINYL CAP PE	1,6	1,38	1105,469	1,53
<b>Suma %</b>	<b>100,0</b>	<b>86,38</b>		

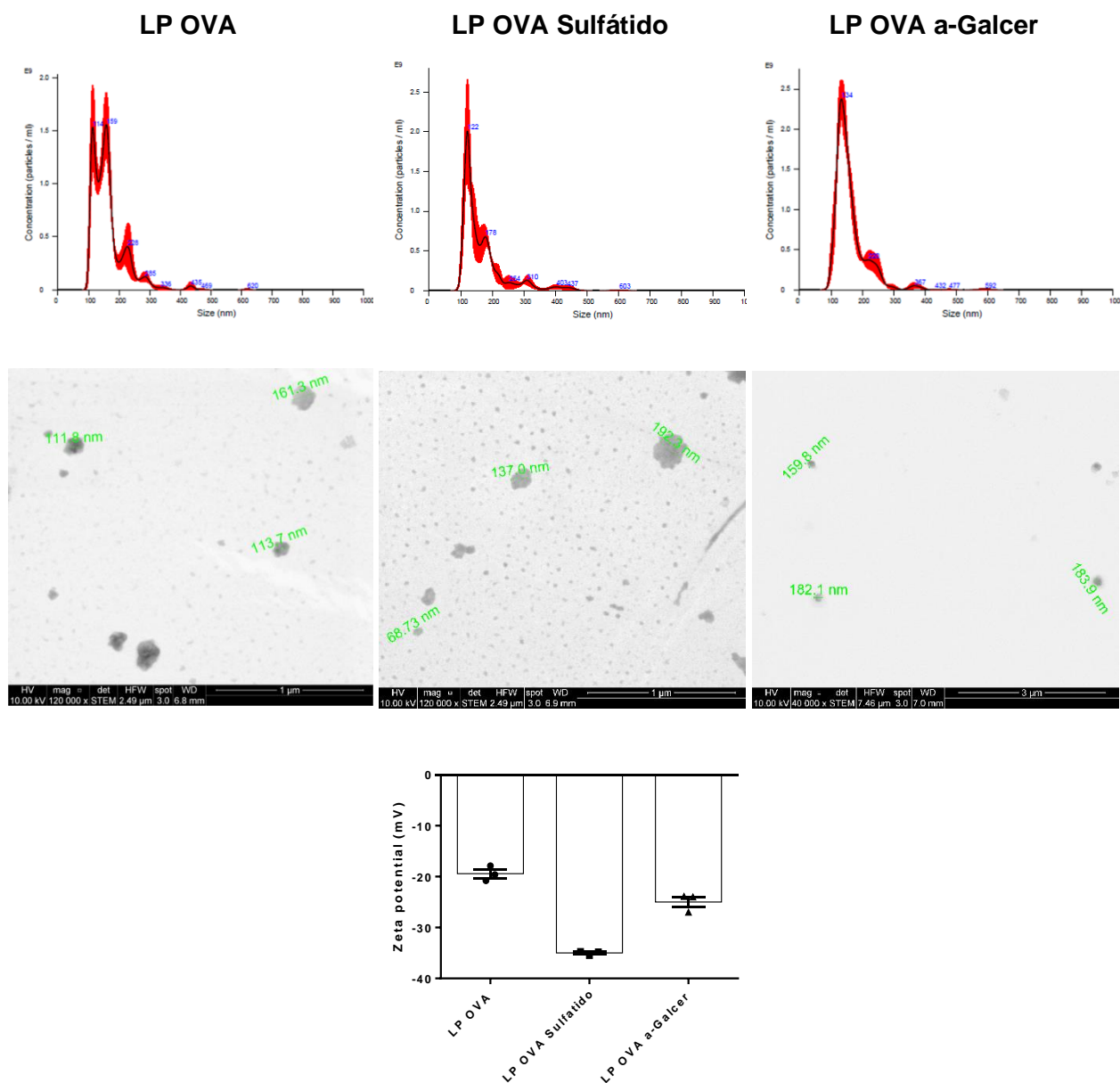
LP $\alpha$ -Galcer con OVA				
Composición Liposoma para anclar OVA	%	nmoles	PM (g/mol)	ug
EPC	57,3	51,00	770,123	39,28
CHOL	31,5	28,00	388,84	10,89
PEG 2000	4,4	3,94	2791	11,00
BIOTINYL CAP PE	1,6	1,38	1105,469	1,53
<b>a-Galcer (4 ug)</b>	<b>5,2</b>	<b>4,66</b>	<b>858,34</b>	<b>4,00</b>
<b>Suma %</b>	<b>100,0</b>	<b>88,99</b>		

LP Sulfatido con OVA				
Composición Liposoma para anclar OVA	%	nmoles	PM (g/mol)	ug
EPC	44,3	39,18	770,123	30,17
CHOL	24,9	21,99	388,84	8,55
PEG 2000	4,4	3,87	2791	10,80
BIOTINYL CAP PE	1,6	1,38	1105,469	1,53
<b>Sulfatido C24:1 (20 ug)</b>	<b>24,9</b>	<b>22,04</b>	<b>907,332</b>	<b>20,00</b>
<b>Suma %</b>	<b>100,0</b>	<b>88,46</b>		

También se caracterizó a los liposomas por el potencial zeta. Este es una propiedad física, una magnitud de atracción o repulsión de carga entre las partículas, exhibida por cualquier partícula en suspensión. La carga que adquiere una partícula o molécula en un medio específico es su potencial zeta, que resulta de la carga superficial, la concentración y los tipos de iones presentes en la solución. El potencial zeta para cada liposoma fue el siguiente. Liposomas conteniendo solo OVA:  $-19.4 \pm 0.8$  mV, OVA más lípido  $\alpha$ -Galcer  $-24.9 \pm 1.0$  mV y, OVA más lípido sulfátido  $-35.0 \pm 0.2$  mV (Figura 30).

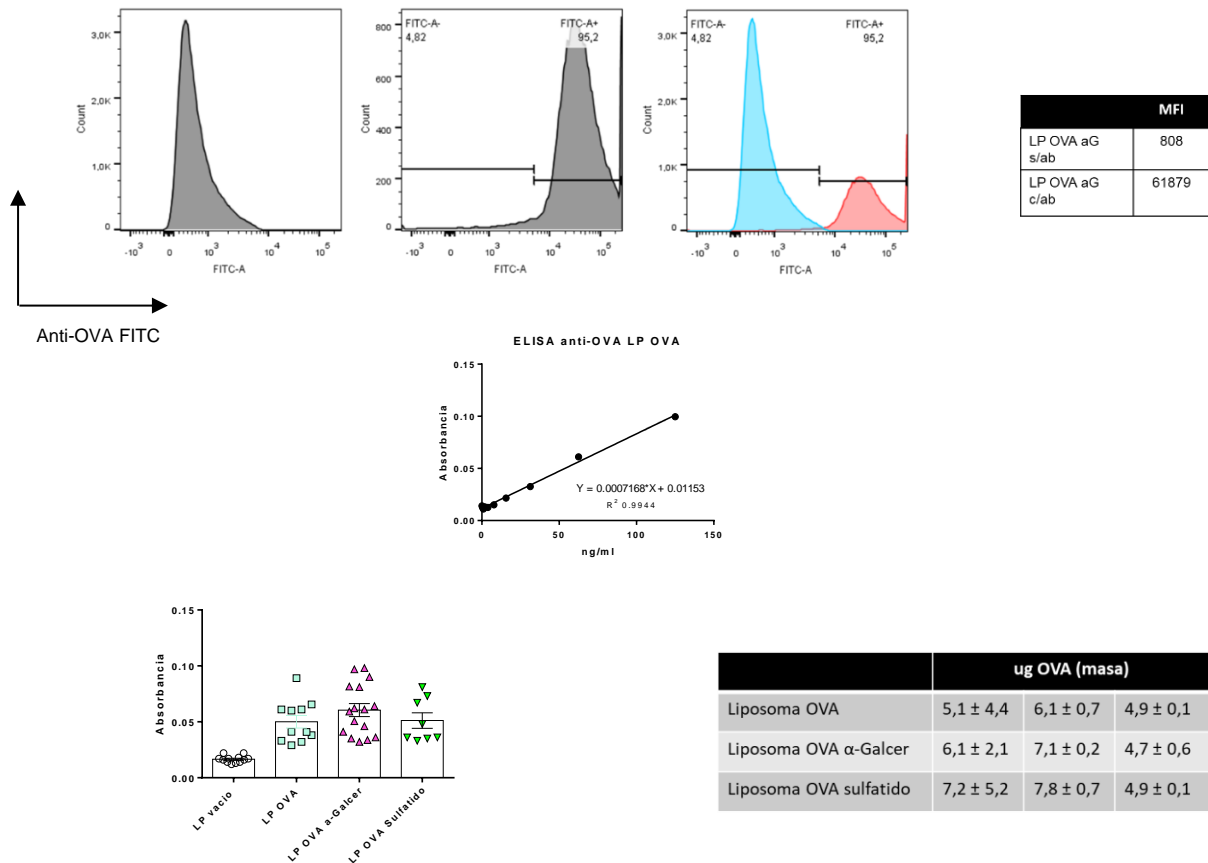




**Figura 30:** Caracterización de los liposomas conteniendo OVA en su superficie. Se muestra la distribución del tamaño versus concentración de Liposomas conteniendo solo OVA, OVA más lípido α-Galcer y, OVA más lípido sulfátido. Además, se indica el tamaño promedio de cada liposoma en nm. Las imágenes corresponden a microscopia electrónica de cada liposoma y se indica el tamaño de éste en nm. El grafico corresponde a la determinación del potencial zeta para cada liposoma.

Para corroborar que la proteína se encontraba en la superficie del liposoma, se marcó la OVA unida a éste empleando un anticuerpo anti-OVA FITC por 2 h a 4°C y luego se ultracentrifugó a 80.000 g por 30 min para lavar y descartar el anticuerpo. Estos liposomas marcados con OVA FITC fueron analizados a través de un citómetro de flujo. Aquellos liposomas conteniendo sulfátido y OVA presentaron una población positiva para el marcaje anti-OVA FITC en

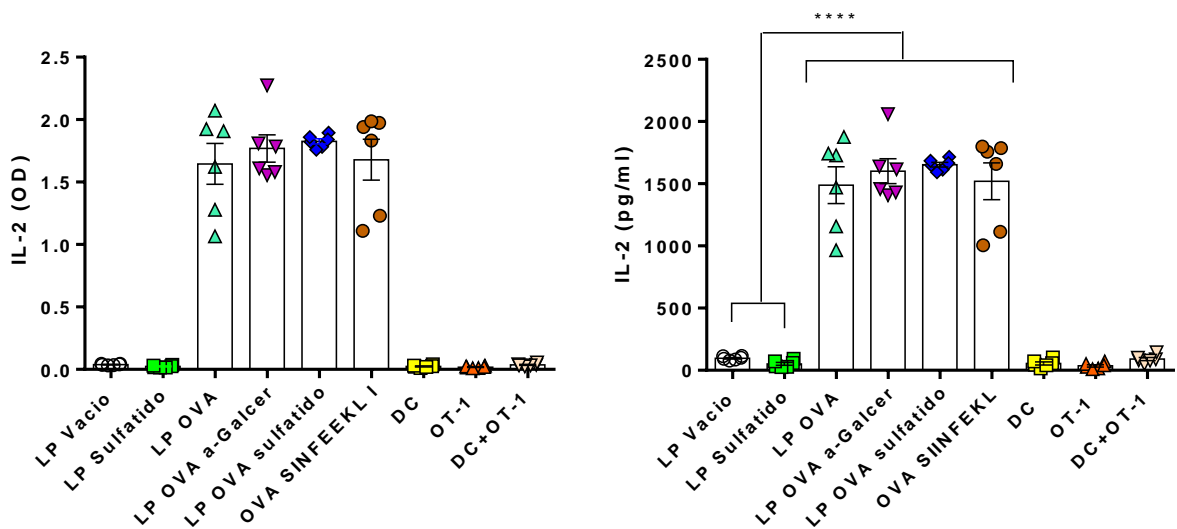
comparación a aquellos liposomas conteniendo sulfatido, pero no OVA en su superficie. Esto fue corroborado a través de un histograma para evaluar la intensidad media geométrica en donde se observó un desplazamiento de la curva a la derecha correspondiente a la población de liposomas marcados con anti-OVA FITC (Figura 31). Se realizó la cuantificación de la OVA en la superficie del liposoma a inyectar en cada uno de los tratamientos a través de un ensayo de ELISA anti-OVA. Los datos de masa en ug de OVA se indican en la figura 31.



**Figura 31:** Cuantificación de OVA en la superficie del liposoma. Se muestra el histograma correspondiente a la tinción del liposoma con anticuerpo anti-OVA FITC, cuya tinción nos indica que la proteína se encuentra en la superficie del liposoma y además se evalúa la intensidad media de fluorescencia indicándonos el corrimiento de la curva hacia la derecha correspondiente a los liposomas teñidos con anti-OVA FITC en comparación a la curva de intensidad media de fluorescencia de los liposomas sin teñir. La OVA anclada en la superficie del liposoma fue cuantificada a través de ELISA a través de la interpolación de las absorbancias en la curva de calibración mostrada y posteriormente multiplicada por el factor de dilución y por el volumen total de la preparación liposomal.

Con el objetivo de evaluar funcionalmente los liposomas conteniendo OVA en su superficie, se realizó primero un ensayo *in vitro*, que consistió en evaluar la presentación de liposomas con OVA por parte de células dendríticas derivadas de la médula ósea a esplenocitos OT-1. El receptor del esplenocito OT-1 reconoce los residuos de Ovalbumina 257-264 en el

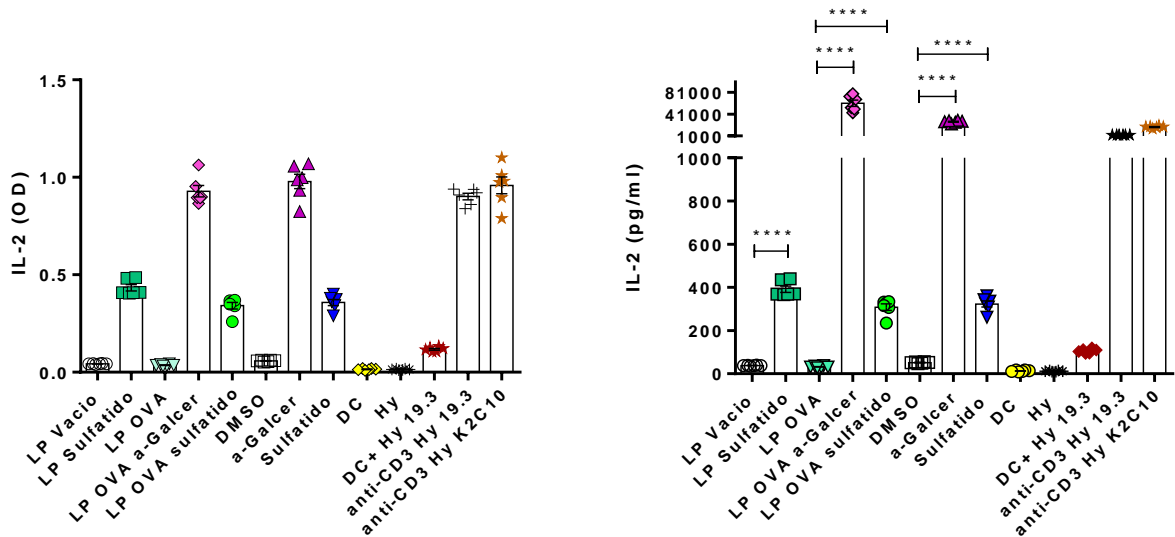
contexto de MHC clase I, produciendo su activación. El ensayo fue el siguiente: células dendríticas derivadas de células progenitoras de médula ósea (100.000 cells/pocillo) de ratones C57BL/6 fueron pulsadas con: liposoma vacío, liposoma conteniendo sulfátido, liposoma conteniendo OVA, liposoma conteniendo  $\alpha$ -Galcer y liposoma conteniendo OVA sulfátido. Se estimuló con 50 ug/ml (5 ug) de OVA por pocillo. Como control positivo se estimuló con el péptido SIINFEKL a una concentración de 10 nM y, luego de 24 horas, fueron co-cultivadas con esplenocitos de ratones OT-1 (100.000 cells/pocillo). Los sobrenadantes fueron evaluados a través de ELISA para determinar la producción de IL-2, indicando su reconocimiento y activación. Aquellos liposomas conteniendo OVA (LP OVA, LP OVA  $\alpha$ -Galcer, LP OVA sulfátido) significativamente estimularon la producción de IL-2 en comparación al liposoma vacío y liposoma sulfátido (Figura 32). El péptido OVA SIINFEKL también estimuló la producción de IL-2.



**Figura 32:** Ensayo *in vitro* de células DCs de ratones C57BL/6 pulsadas y co-cultivadas con esplenocitos de ratones OT-1 para evaluar funcionalmente liposomas conteniendo OVA. Triplicados, N=2. La concentración de OVA/pocillo corresponde a 50 ug/ml. Las diferencias estadísticas están dadas por la aplicación de la prueba de comparación múltiple One way ANOVA y como análisis post-hoc a la prueba de Dunnett entre los grupos controles y tratados. (P < 0.05; \*); (P < 0.01; \*\*); (P < 0.001; \*\*\*).

Paralelamente se realizó otro ensayo *in vitro* con el objetivo de evaluar funcionalmente los liposomas conteniendo OVA en su superficie. Este consistió en evaluar la presentación de liposomas con OVA por parte de células dendríticas derivadas de la medula ósea a los hibridomas de célula NKT tipo I y II. Células dendríticas derivadas de células progenitoras de médula ósea (100.000 cells/pocillo) de ratones C57BL/6 fueron pulsadas con el liposoma (LP) vacío, LP sulfátido, LP OVA, LP OVA  $\alpha$ -Galcer, LP OVA sulfátido, vehículo (DMSO),  $\alpha$ -Galcer y sulfátido. Luego de 24 horas, fueron co-cultivadas con los hibridomas de NKT (100.000 cells/pocillo). Los

sobrenadantes fueron evaluados a través de ELISA para determinar la producción de IL-2, indicando su reconocimiento y activación. Aquellos liposomas conteniendo sulfátido (LP sulfátido, LP OVA sulfátido) y sulfátido libre significativamente estimularon la producción de IL-2 por el hibridoma de células NKT tipo II en comparación al liposoma vacío, liposoma OVA y al vehículo (DMSO). Mientras que el liposoma conteniendo  $\alpha$ -Galcer y  $\alpha$ -Galcer libre significativamente estimularon la producción de IL-2 por el hibridoma de células NKT tipo I en comparación al liposoma vacío, al liposoma OVA y al vehículo (Figura 33).



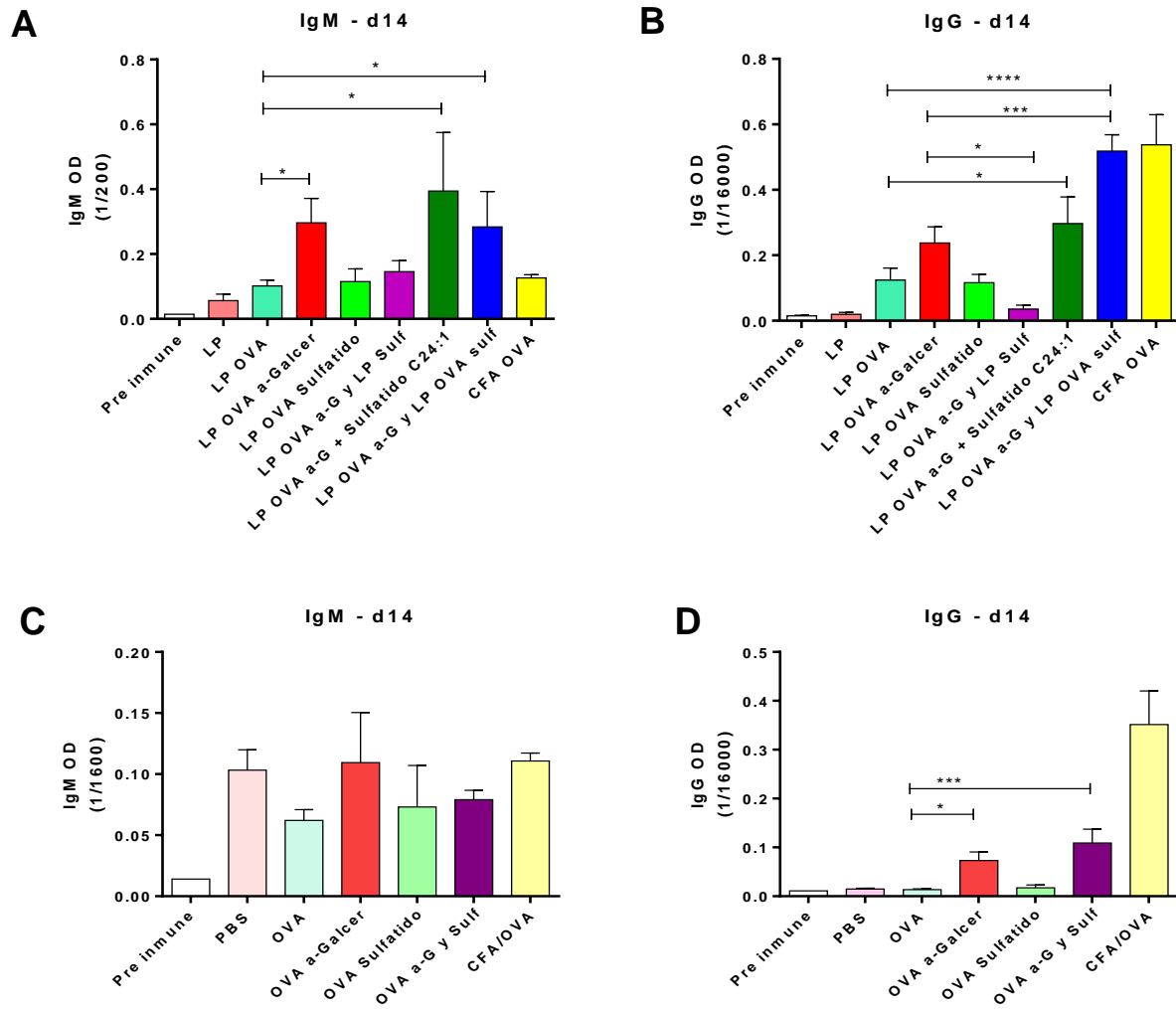
**Figura 33:** Ensayo *in vitro* de células DCs de ratones C57BL/6 pulsadas y co-cultivadas con los hibridomas de células NKT tipo I y II para evaluar funcionalmente liposomas conteniendo  $\alpha$ -Galcer y sulfátido. Triplicados, N=2. Sulfátido 10  $\mu$ M,  $\alpha$ -Galcer 0,01  $\mu$ M. Hibridoma NKT tipo I, K2C10. Hibridoma NKT tipo II, Hy 19.3. Las diferencias estadísticas están dadas por la aplicación de la prueba de comparación múltiple One way ANOVA y como análisis post-hoc a la prueba de Dunnett entre los grupos controles y tratados. (P < 0.05; \*); (P < 0.01; \*\*); (P < 0.001; \*\*\*).

### 3.1 Evaluar la modulación de las funciones de las células NKT tipo I y células B por las células NKT tipo II mediante el ligando lipídico sulfátido en su forma libre o contenido en liposomas en ratones C57BL/6.

En el experimento siguiente se quiso evaluar el efecto de la estimulación de células NKT tipo II activadas tanto por sulfátido C24:1 administrado en forma libre y contenido en liposomas sobre las funciones efectoras de las células NKT tipo I y células B en ratones C57BL/6.

Cada grupo correspondía a 5 ratones de 6 a 8 meses de edad. Se realizaron dos inmunizaciones, al día 1 y 21. Los días 14, 28, 35, 42 y 63 días desde la primera inmunización se obtuvieron muestras de suero para analizar los distintos isotipos de anticuerpo IgM e IgG (IgG1, IgG2b, IgG2c, IgG3). La segunda inmunización se realizó a los 21 días de la primera

inmunización. 6 semanas post segunda inmunización se evaluó las células secretoras de anticuerpo IgG2c en la medula ósea.



**Figura 34:** Absorbancias de los isotipos de anticuerpos IgM e IgG en el día 14, pre-segunda inmunización de los tratamientos con lípidos y antígeno libres (C y D) y también contenido en liposomas (A y B).

Se evaluaron las absorbancias de los anticuerpos IgM e IgG en el día 14, pre-segunda inmunización, para evaluar la respuesta primaria, es decir, cuando se produce el contacto con el antígeno OVA por primera vez y el cambio de isotipo de IgM a IgG, dos semanas después del encuentro con el antígeno. Con respecto a los resultados de las absorbancias del isotipo IgM anti-OVA en el día 14 de los distintos tratamientos con lípidos libres o contenido en liposomas y Ovalbumina, se observó un incremento significativo en la absorbancia del grupo LP OVA  $\alpha$ -Galcer, LP OVA  $\alpha$ -Galcer más sulfátido C24:1 y LP OVA  $\alpha$ -Galcer más LP OVA sulfátido C24:1 en comparación a la administración de LP OVA (Figura 34).

Con respecto a los resultados de las absorbancias del isotipo IgG anti-OVA de los distintos tratamientos con lípidos libres y Ovalbumina en el día 14, la absorbancia del isotipo de anticuerpo IgG se incrementó significativamente luego de la administración de OVA  $\alpha$ -Galcer más sulfátido y, de OVA más  $\alpha$ -Galcer en comparación a la administración de OVA (Figura 34).

Con respecto a los resultados de las absorbancias del isotipo IgG anti-OVA en el día 14 de los distintos tratamientos con liposomas conteniendo lípidos y Ovalbumina, la absorbancia del isotipo de anticuerpo IgG disminuyó significativamente luego de la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer más LP sulfátido en comparación a la administración de liposoma conteniendo solo OVA  $\alpha$ -Galcer.

La absorbancia del isotipo de anticuerpo IgG se incrementó significativamente luego de la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer más LP OVA sulfátido en comparación a la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer (Figura 34).

Se evaluó la cinética de la respuesta inmune humoral del isotipo de anticuerpo IgG1, IgG2b, IgG2c e IgG3 para evaluar la modulación de las funciones de las células NKT tipo I y células B por la activación de las células NKT tipo II en los días 14, 28, 35, 42 y 63 de la primera inmunización.

Con respecto a los resultados de las absorbancias de los distintos tratamientos con lípidos libres y Ovalbumina. La absorbancia del isotipo de anticuerpo IgG1 se incrementó significativamente luego de la administración de OVA  $\alpha$ -Galcer en comparación a la administración de solo OVA al día 28 de la primera inmunización (14 días post segunda inmunización) (Figura 37).

Con respecto a los resultados de las absorbancias del isotipo IgG1 anti-OVA de los distintos tratamientos con liposomas conteniendo lípidos y Ovalbumina (Figura 35). La absorbancia del isotipo de anticuerpo IgG1 al día 28 de la primera inmunización (7 días post segunda inmunización), se incrementó significativamente luego de la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer y LP OVA sulfátido en comparación a la administración de LP OVA al día 28 de la primera inmunización (7 días post segunda inmunización) (Figura 35).

Además, la absorbancia del isotipo de anticuerpo IgG1 disminuyó significativamente luego de la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer más LP sulfátido y de LP OVA  $\alpha$ -Galcer más sulfátido en comparación a la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer al día 28 de la primera inmunización (7 días post segunda inmunización) (Figura 35).

Con respecto a las absorbancias del isotipo IgG2b anti-OVA de los distintos tratamientos con lípidos libres y Ovalbumina, la absorbancia del isotipo de anticuerpo IgG2b se incrementó significativamente luego de la administración de OVA  $\alpha$ -Galcer en comparación a la

administración de solo OVA al día 35 de la primera inmunización (7 días post segunda inmunización) (Figura 37).

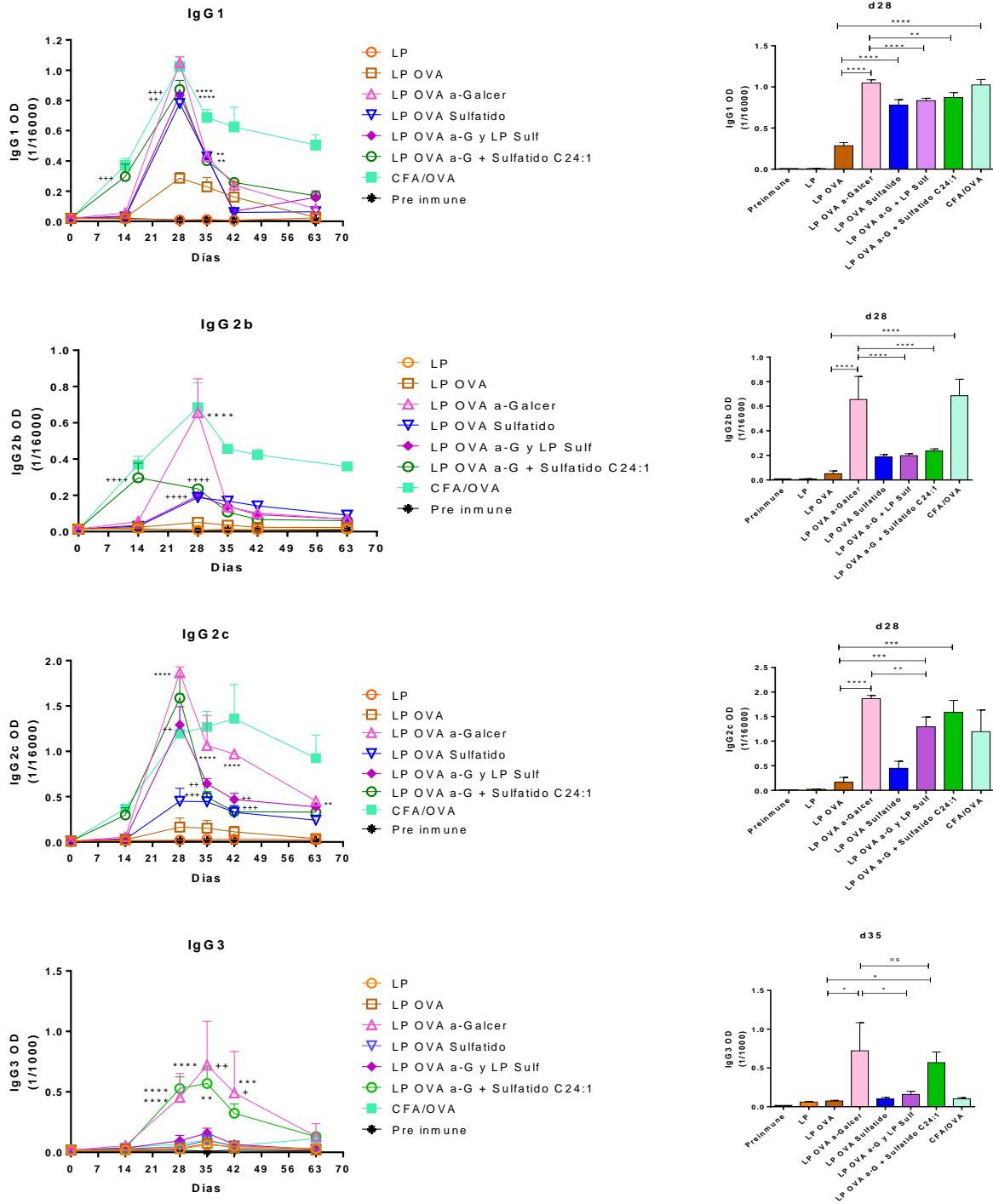
Con respecto a las absorbancias del isotipo IgG2b anti-OVA de los distintos tratamientos con liposomas conteniendo lípidos y Ovalbumina, la absorbancia del isotipo de anticuerpo IgG2b se incrementó significativamente luego de la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer en comparación a la administración de LP OVA al día 28 de la primera inmunización (7 días post segunda inmunización) (Figura 35). Además, la absorbancia del isotipo de anticuerpo IgG2b disminuyó significativamente luego de la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer más LP sulfátido y de LP OVA  $\alpha$ -Galcer más sulfátido en comparación a la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer al día 28 de la primera inmunización (Figura 35).

Con respecto a las absorbancias del isotipo IgG2c anti-OVA de los distintos tratamientos con lípidos libres y Ovalbumina, la absorbancia del isotipo de anticuerpo IgG2c se incrementó significativamente luego de la administración de OVA más  $\alpha$ -Galcer en comparación a la administración de solo OVA al día 28 de la primera inmunización (7 días post segunda inmunización) (Figura 37).

Con respecto a las absorbancias del isotipo IgG2c anti-OVA de los distintos tratamientos con liposomas conteniendo lípidos y Ovalbumina, la absorbancia del isotipo de anticuerpo IgG2c se incrementó significativamente luego de la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer en comparación a la administración de LP OVA al día 28 de la primera inmunización (7 días post segunda inmunización) (Figura 35). Además, la absorbancia del isotipo de anticuerpo IgG2c disminuyó significativamente luego de la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer más LP sulfátido en comparación a la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer. al día 28 de la primera inmunización (7 días post segunda inmunización) (Figura 35).

Con respecto a las absorbancias del isotipo IgG3 anti-OVA de los distintos tratamientos con lípidos libres y Ovalbumina, no se observaron diferencias significativas en los distintos tratamientos (Figura 37).

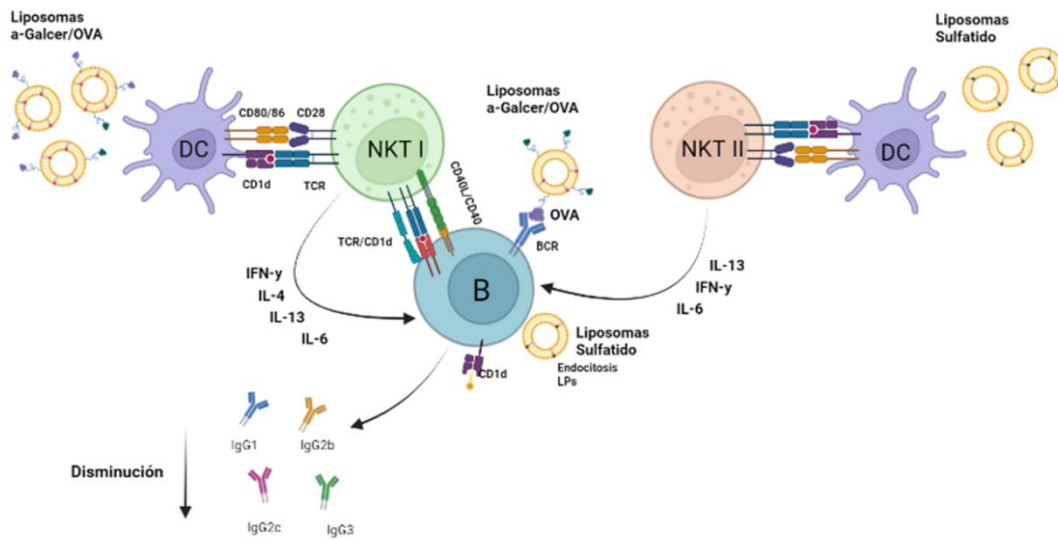
Con respecto a las absorbancias del isotipo IgG3 anti-OVA de los distintos tratamientos con liposomas conteniendo lípidos y Ovalbumina, la absorbancia del isotipo de anticuerpo IgG3 se incrementó significativamente luego de la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer en comparación a la administración de LP OVA al día 28 de la primera inmunización (7 días post segunda inmunización) (Figura 35). Además, la absorbancia del isotipo de anticuerpo IgG3 disminuyó significativamente luego de la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer y LP sulfátido en comparación a la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer. al día 28 de la primera inmunización (7 días post segunda inmunización) (Figura 35).



**Figura 35:** Cinética de la respuesta inmune humoral de los isotipos IgG1, IgG2b, IgG2c e IgG3 para evaluar la modulación de las funciones de las células NKT tipo I y células B por la activación de las células NKT tipo II mediante el uso de liposomas conteniendo los ligandos lipídicos y el antígeno Ovalbumina. Aplicación de la prueba de comparación múltiple Two way ANOVA y como análisis post-hoc a la prueba de Dunnett entre los grupos controles y tratados. ( $P < 0.05$ ; \*); ( $P < 0.01$ ; \*\*); ( $P < 0.001$ ; \*\*\*).



La regulación de las respuestas de células B foliculares no se restringe a células T helper, ya que existen señales adicionales que pueden provenir de otros subconjuntos de linfocitos T, como son las células NKT. Los liposomas son internalizados por las células dendríticas presentes en órganos linfoides secundarios como bazo y ganglios linfáticos y los lípidos son presentados por las células dendríticas a las células NKT a través de la molécula CD1d (Figura 36). Las células NKT tipo I pueden activarse por el lípido  $\alpha$ -Galcer y estimular la producción de citoquinas tales como IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6 e IL-13. En conjunto con las citoquinas liberadas, las células NKT tipo I proporcionan ayuda a los linfocitos B mediante la capacidad de expresar CD40L. Posteriormente, se produce la expansión de las células T helper lo que conduce a la formación de un centro germinal que induce la producción de IgG, maduración de afinidad a través de la hipermutación somática y a la memoria inmunológica. De acuerdo con los resultados obtenidos, la administración de liposomas conteniendo  $\alpha$ -Galcer/OVA promovieron la generación de los isotipos de anticuerpos IgG1, IgG2b, IgG2c e IgG3 y esto se corresponde con lo publicado en la literatura [113].



**Figura 36:** Modelo propuesto de modulación inmune de las células NKT tipo I y tipo II sobre las células B inducida por liposomas conteniendo  $\alpha$ -Galcer/OVA y liposomas conteniendo sulfátido en ratones C57BL/6.

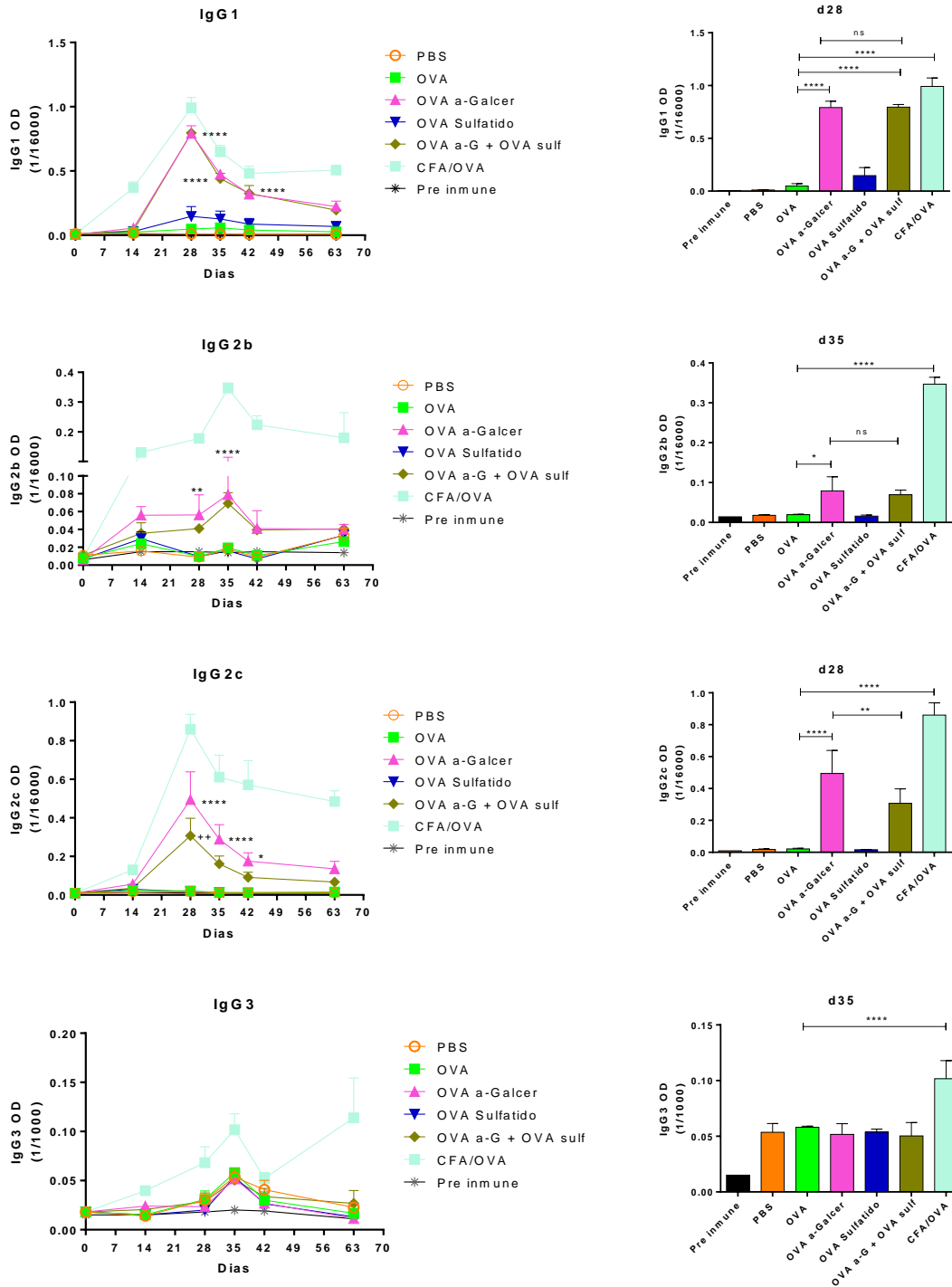
Por otro lado, los liposomas conteniendo sulfátido son internalizados y los lípidos son presentados por las células dendríticas a las células NKT a través de la molécula CD1d. Las células NKT tipo II pueden activarse por el lípido sulfátido y estimular la producción de citoquinas tales como IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-13. De acuerdo con los resultados obtenidos, la

administración de liposomas conteniendo sulfátido promovió la generación del isotipo de anticuerpo IgG1.

La administración de ambos liposomas, liposoma  $\alpha$ -Galcer/OVA y liposoma sulfátido, redujo la producción de los isotipos IgG1, IgG2b, IgG2c e IgG3. Una explicación a este mecanismo regulatorio, del efecto de la administración de sulfátido sobre la activación de las células NKT tipo I inducidas por  $\alpha$ -Galcer, se ha explicado por una reducción en la formación de complejos CD1d/ $\alpha$ -Galcer en las células dendríticas y en la producción de IFN- $\gamma$  por las células NKT tipo I [110].

En el experimento anterior, se observó el efecto de liposomas conteniendo sulfátido y su efecto en la generación de isotipos producidos por liposomas conteniendo  $\alpha$ -Galcer, en donde, la absorbancia de los isotipos de anticuerpos IgM, IgG, IgG1, IgG2b, IgG2c e IgG3 disminuyó significativamente luego de la administración de liposomas conteniendo OVA más  $\alpha$ -Galcer y liposomas conteniendo sulfátido (LP OVA  $\alpha$ -Galcer más LP sulfátido) en comparación a la administración de liposomas conteniendo OVA  $\alpha$ -Galcer (LP OVA  $\alpha$ -Galcer), demostrando el efecto inmunomodulatorio negativo de sulfátido sobre  $\alpha$ -Galcer en la generación de anticuerpos promovidos por las células B.

Las diluciones seriadas de los isotipos de anticuerpos IgGs y sus respectivas absorbancias en los días 14, 28, 35, 42 y 63 días desde la primera inmunización se muestran en las figuras suplementarias 4 y 5.



**Figura 37:** Cinética de la respuesta inmune humoral de los isotipos IgG1, IgG2b, IgG2c e IgG3 para evaluar la modulación de las funciones de las células NKT tipo I y células B por la activación de las células NKT tipo II mediante el uso de ligandos lipídicos libres y el antígeno Ovalbumina. Aplicación de la prueba de comparación múltiple Two way ANOVA y como análisis post-hoc a la prueba de Dunnett entre los grupos controles y tratados. ( $P < 0.05$ ; \*); ( $P < 0.01$ ; \*\*); ( $P < 0.001$ ; \*\*\*).

### **3.2 Evaluar la modulación de las funciones de las células NKT tipo I y células B por las células NKT tipo II mediante el uso de liposomas conteniendo el ligando lipídico sulfátido y el antígeno Ovalbumina en ratones C57BL/6.**

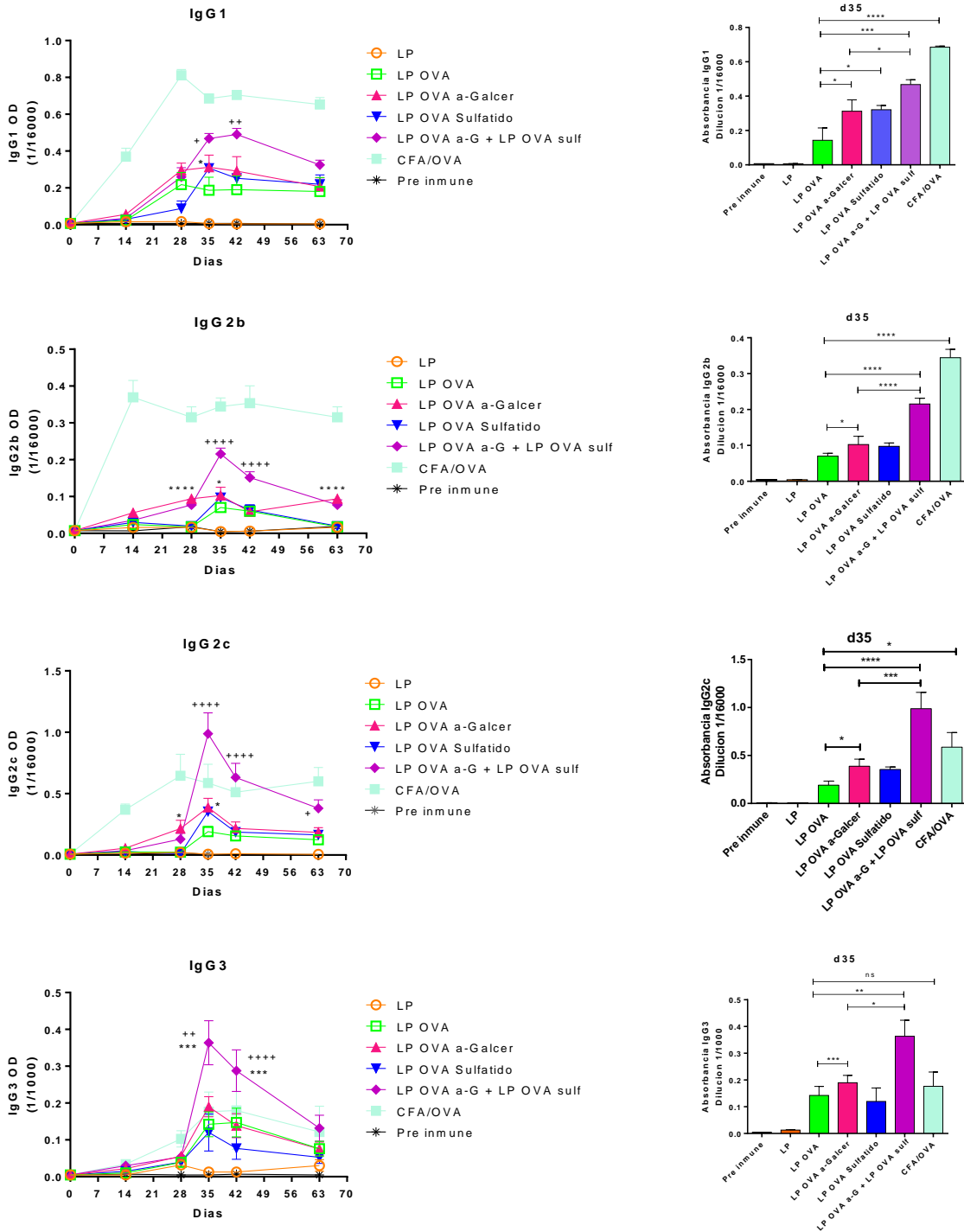
En el experimento siguiente, se quiso evaluar el efecto de la estimulación de células NKT tipo II activadas por sulfátido C24:1 administrado en liposomas junto con el antígeno OVA, sobre la estimulación de células NKT tipo I y células B activadas por  $\alpha$ -Galcer y OVA en ratones C57BL/6. Se realizaron dos inmunizaciones, al día 1 y 21. Los días 14, 28, 35, 42 y 63 días desde la primera inmunización se obtuvieron muestras de suero para analizar los distintos isotipos de anticuerpo.

Con respecto a la cinética de la respuesta inmune humoral del isotipo de anticuerpo IgG1, en el día 35 (14 días de la segunda inmunización), la absorbancia del isotipo de anticuerpo IgG1 se incrementó significativamente luego de la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer en comparación a la administración de LP OVA (Figura 38). Además, la absorbancia del isotipo de anticuerpo IgG1 se incrementó significativamente luego de la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer más LP OVA sulfátido en comparación a la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer (Figura 38).

Con respecto a la cinética de la respuesta inmune humoral del isotipo de anticuerpo IgG2b, en el día 35 (14 días de la segunda inmunización), la absorbancia del isotipo de anticuerpo IgG2b se incrementó significativamente luego de la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer en comparación a la administración de LP OVA (Figura 38). Además, la absorbancia del isotipo de anticuerpo IgG2b se incrementó significativamente luego de la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer más LP OVA sulfátido en comparación a la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer (Figura 38).

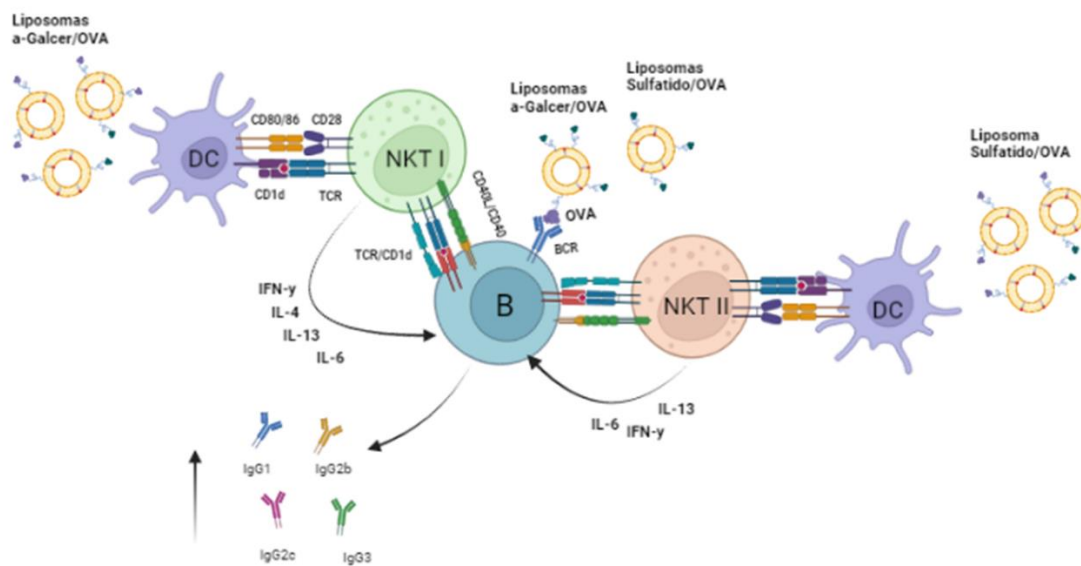
Con respecto a la cinética de la respuesta inmune humoral del isotipo de anticuerpo IgG2c, en el día 35 (14 días de la segunda inmunización), la absorbancia se incrementó significativamente luego de la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer en comparación a la administración de LP OVA (Figura 38). Además, la absorbancia del isotipo de anticuerpo IgG2c se incrementó significativamente luego de la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer más LP OVA sulfátido en comparación a la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer (Figura 38).

Con respecto a la cinética de la respuesta inmune humoral del isotipo de anticuerpo IgG3, en el día 35 (14 días de la segunda inmunización), la absorbancia se incrementó significativamente luego de la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer en comparación a la administración de LP OVA (Figura 38). Además, la absorbancia del isotipo de anticuerpo IgG3 se incrementó significativamente luego de la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer más LP OVA sulfátido en comparación a la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer (Figura 38).



**Figura 38:** Cinética de la respuesta inmune humoral de los isotipos IgG1, IgG2b, IgG2c e IgG3 para evaluar la modulación de las funciones de las células NKT tipo I y células B por la activación de las células NKT tipo II mediante el uso de liposomas conteniendo los ligandos lipídicos junto con el antígeno Ovalbumina. Aplicación de la prueba de comparación múltiple Two way ANOVA y como análisis post-hoc a la prueba de Dunnett entre los grupos controles y tratados. (P < 0.05; \*); (P < 0.01; \*\*); (P < 0.001; \*\*\*). N=2

Los liposomas son internalizados por las células dendríticas presentes en órganos linfoides secundarios como bazo y ganglios linfáticos y los lípidos son presentados por las células dendríticas a las células NKT a través de la molécula CD1d (Figura 39). Las células NKT tipo I pueden activarse por el lípido  $\alpha$ -Galcer y estimular la producción de citoquinas tales como IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6 e IL-13. En conjunto con las citoquinas liberadas, las células NKT tipo I proporcionan ayuda a los linfocitos B mediante la capacidad de expresar CD40L. Posteriormente, se produce la expansión de las células T helper lo que conduce a la formación de un centro germinal que induce la producción de IgG, maduración de afinidad a través de la hipermutación somática y a la memoria inmunológica. De acuerdo con los resultados obtenidos, la administración de liposomas conteniendo  $\alpha$ -Galcer/OVA promovieron la generación de los isotipos de anticuerpos IgG1, IgG2b, IgG2c e IgG3 y esto se corresponde con lo publicado en la literatura [113]. En el modelo propuesto tanto las células NKT tipo I como NKT tipo II interactúan con las células B directamente a través de CD1d, CD40L a la célula B.



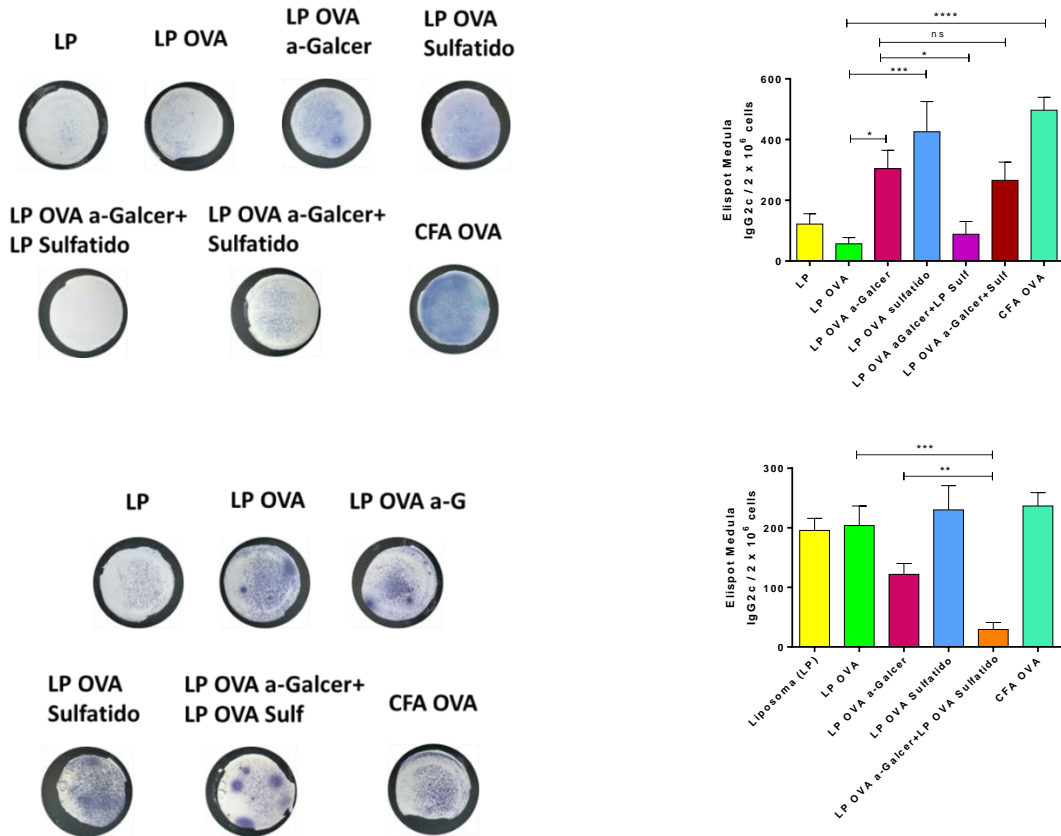
**Figura 39:** Modelo propuesto de modulación inmune de las células NKT tipo I y tipo II sobre las células B inducida por liposomas conteniendo  $\alpha$ -Galcer/OVA y liposomas conteniendo sulfátido/OVA en ratones C57BL/6.

Por otro lado, los liposomas conteniendo sulfátido/OVA son internalizados y los lípidos son presentados por las células dendríticas a las células NKT a través de la molécula CD1d. Las células NKT tipo II pueden activarse por el lípido sulfátido y estimular la producción de citoquinas tales como IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-13. De acuerdo con los resultados obtenidos, la administración de liposomas conteniendo sulfátido/OVA promovió la generación del isotipo de anticuerpo IgG1.

La administración de ambos liposomas, liposoma  $\alpha$ -Galcer/OVA y liposoma sulfátido/OVA, incrementó la producción de los isotipos IgG1, IgG2b, IgG2c e IgG3.

Las células B secretoras de anticuerpo IgG2c específicas de antígeno OVA provenientes de la medula ósea de ratones C57BL/6 fueron determinadas para evaluar la modulación de las funciones de las células NKT tipo I y células B por la activación de las células NKT tipo II mediante el uso de liposomas conteniendo el ligando lipídico sulfátido y antígeno Ovalbumina,

Las células B secretoras de anticuerpo IgG2c específicas de antígeno OVA provenientes de la medula ósea de ratones C57BL/6 disminuyó significativamente luego de la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer más LP sulfátido en comparación a la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer al día 60 de la primera inmunización (42 días post segunda inmunización) (Figura 40). Además, las células B secretoras de anticuerpo IgG2c específicas de antígeno OVA disminuyen significativamente luego de la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer y LP OVA sulfátido en comparación a la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer al día 60 de la primera inmunización (42 días post segunda inmunización) (Figura 40).



**Figura 40:** Ensayo ELISPOT de células B secretoras de anticuerpo IgG2c específicas de antígeno OVA provenientes de la medula ósea de ratones C57BL/6, para evaluar la modulación de las funciones de las células NKT tipo I, células B y células NKT tipo II mediante liposomas conteniendo los ligandos lipídicos y antígeno Ovalbumina, *in vivo* en ratones C57BL/6. Las diferencias estadísticas están dadas por la aplicación de la prueba de comparación múltiple One way ANOVA y como análisis post-hoc a la prueba de Dunnett entre los grupos controles y tratados. ( $P < 0.05$ ; \*); ( $P < 0.01$ ; \*\*); ( $P < 0.001$ ; \*\*\*).



## Discusión

Dentro de los hallazgos importantes que fueron encontrados en esta tesis fue que el ligando sulfátido fue capaz de ser presentado por las células dendríticas de ratones Knock-in para CD1d humano pulsadas con lípidos libres o contenidos en liposomas y fue capaz de estimular los hibridomas de células NKT tipo II. Cuando este ligando fue evaluado en ratones hCD1d-KI del gen de CD1d humano se observó que solo la producción de la citoquina IFN- $\gamma$  por las células NKT tipo I activadas por  $\alpha$ -Galcer se redujo luego de la administración en conjunto de  $\alpha$ -Galcer y sulfátido en comparación a la administración de solo  $\alpha$ -Galcer, Este fenómeno no fue observado en ratones wild-type. Esto puede ser explicado por la diferencia existente entre la proporción de células NKT tipo I/NKT tipo II en ambos ratones. Además, un resultado que no se esperaba fue que en el ratón hCD1d-KI del gen de CD1d humano, las citoquinas IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, IL-6 incrementaron su producción luego de la administración en conjunto de  $\alpha$ -Galcer y sulfátido en comparación a la administración de solo  $\alpha$ -Galcer, demostrando que las células NKT tipo II tienen un efecto estimulador de la respuesta inmune y no solo inhibidor.

A pesar del alto grado de conservación de la molécula CD1d, existen diferencias importantes entre las vías de presentación del antígeno en humanos y ratones. El ratón Knock-in para CD1d humano constituye un modelo para estudiar *in vivo* la presentación del antígeno por la molécula CD1d humana. Se ha demostrado que la sustitución de mCD1d por hCD1d selecciona una población de células NKT tipo I en el ratón Knock-in para CD1d humano, más parecida funcionalmente a la humana [22]. No había evidencia hasta ahora del estudio de las células NKT tipo II en ratones Knock-in para CD1d humano. La comprensión actual de la diversidad de reconocimiento del TCR en las células NKT tipo II es limitada. En la actualidad se han identificado fosfolípidos capaces de activar a células NKT tipo II murinas en ratones C57BL/6 y hCD1d-KO, pero no se había estudiado en ratones Knock-in para CD1d humano. Las células NKT tipo II son activadas por lípidos propios tales como fosfolípidos y sulfátido presentados por CD1d [17, 139, 140].

Las proteínas CD1d humana y de ratón son grandemente conservadas en su secuencia aminoacídica y en su estructura 3D [141]. Sin embargo, hay diferencias sutiles pero importantes que existen tales como su afinidad a varios ligandos lipídicos [142] y receptores T presentes en las células NKTs [143] así como diferencias en sus estructuras 3D. Estudiando la estructura del complejo de unión de un TCR de una célula NKT tipo I humana con la molécula CD1d unida a su potente agonista  $\alpha$ -galactosylceramida observaron que la variabilidad de la cadena beta del TCR de la célula NKT puede afectar el reconocimiento de otros complejos antigénicos CD1d [144]. Otros estudios estructurales han esclarecido la base molecular de la autorreactividad del TCR de

las células NKT tipo I y han encontrado que la cadena TCR $\alpha$  domina la interacción, de manera similar al reconocimiento de  $\alpha$ -GalCer/CD1d. La diferencia clave entre el reconocimiento de los lípidos propios y el lípido canónico está en el papel de CDR3 $\beta$ . Este bucle contribuye de manera insignificante al reconocimiento de  $\alpha$ -GalCer/CD1d, pero media el contacto directo con CD1d que presenta lípidos propios [145-148]. Además, el bucle CDR3 $\beta$  hipervariable determina la especificidad del antígeno de las células NKT de tipo II [149]. El análisis estructural del complejo TCR-CD1d-sulfatido del hibridoma XV19 ha demostrado que las cadenas TCR $\alpha$  y TCR $\beta$  contribuyen por igual a la unión del antígeno CD1d, con los seis bucles de la región determinante de la complementariedad (CDR) en contacto directo con CD1d/sulfatido, aunque los bucles CDR3 dominan estos contactos estructurales, ya que el bucle CDR3 $\alpha$  contacta con los dominios  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 de CD1d y, el bucle CDR3 $\beta$  se une a CD1d y al antígeno [149].

Interesantemente, una de las más llamativas diferencias entre las moléculas CD1d de ratón y humana es encontrada en la posición 155 (equivalente a la posición 153 en humanos) de la hélice  $\alpha$ 2, donde un residuo de glicina es sustituido por un residuo de triptófano, lo que provoca un desplazamiento del residuo de hexosa [150].

Además, los polimorfismos, generados a través de un estudio, en los alelos de CD1d de ratones Wild-type, afectan la presentación de ligandos endógenos y exógenos a células T restringidas a CD1d [151]. Por otra parte, en este trabajo fueron evaluados lípidos que poseían varias características importantes en relación con la longitud de la cadena de ácidos grasos que activaron los hibridomas de célula NKT tipo II reactivo a sulfátido. Las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos se unen dentro del sitio de unión hidrofóbico. El sitio de unión contiene 2 principales bolsillos, A' y C' para CD1d Humano y, A' y F' para el CD1d murino. La cadena de ácido graso se une al bolsillo A y la cadena de esfingosina se une al bolsillo C'/F'. La estabilidad de la unión del lípido a las moléculas CD1d está relacionada con la longitud y la estructura de la cadena hidrocarbonada del lípido [20, 22]. Un estudio reciente reveló a través de análisis mutacional de la molécula CD1d, que los TCRs de las células NKT tipo II pueden adoptar diferentes estrategias de posicionamiento para interactuar con los complejos específicos CD1d/antígeno [152].

El sulfátido nativo es una mezcla de isoformas de sulfátido (C24:1, C24:0, C22:0) con diferentes longitudes de cadenas de ácido graso, bases de cadena larga y saturación. El sulfátido C24:1 presenta su base estructural llamada ceramida formada por una cadena de esfingosina y una cadena de ácido graso monoinsaturado unido a su grupo amino mediante enlace amida. El sulfátido fue capaz de ser presentado por la molécula mCD1d y hCD1d y estimular los hibridomas de células NKT tipo II. El lípido, lyso-sulfatido se caracteriza por carecer de una cadena de ácido graso y solo estimuló a los hibridomas de células NKT tipo II estando contenido dentro de

liposomas utilizando BMDCs de ratones Knock-in para CD1d. Los Lyso-fosfolípidos, Lyso PE, Lyso PC, Lyso PAF y Lyso SM, mostraron una gran estimulación a los hibridomas de células NKT tipo II en aquellas BMDCs de ratones C57BL/6 de una manera dependiente de CD1d, lo que también se corrobora con estudios previos [20-22, 153].

Es importante mencionar que el uso de liposomas conteniendo diferentes lípidos, promovió la estimulación de los hibridomas de célula NKT tipo II presentados por la molécula CD1d humana y de ratón. Esto estaría dado por sus ventajas como ser biodegradables, tener baja toxicidad e incrementar la eficacia terapéutica.

Las células NKT poseen potentes propiedades inmunorreguladoras. Las células NKT pueden contribuir a la inmunidad antitumoral o protumoral según el perfil de citoquinas expresado y el tipo de cáncer. Se ha demostrado que las células NKT tipo II reactivas al lípido sulfátido es capaz de modular la respuesta de las células NKT tipo I activadas por  $\alpha$ -Galcer, contrarrestando la actividad de las células NKT tipo I [37, 154]. Cuando ambas células NKT fueron estimuladas simultáneamente, las células NKT tipo II suprimieron la activación *in vitro* y el efecto protector *in vivo* de las células NKT tipo I en un modelo metastásico de pulmón. Por lo tanto, en la inmunidad tumoral las células NKT tipo I y tipo II tienen funciones opuestas y contrapuestas y pueden aprovecharse para la intervención terapéutica en el cáncer [37]. Las funciones antitumorales de las células NKT tipo I dependen principalmente de su capacidad para secretar citoquinas tipo Th1, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  [84, 85] y, la activación de células NK y células T CD8+ [94], mientras que las células NKT tipo II activadas por sulfátido ha demostrado promover el crecimiento tumoral [16, 37, 88].

También se ha sugerido una función reguladora de las células NKT tipo II en la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), un modelo murino de esclerosis múltiple. Se descubrió que las células NKT tipo II potencian el tratamiento junto con células dendríticas tolerogénicas. La ablación de la molécula co-inhibidora PD-L1 (B7-H1) en la célula dendrítica administrada, liberó la activación de las células NKT tipo II por la célula dendrítica, seguida de un aumento de los niveles séricos de IL-4 e IL-13 derivados de las células NKT tipo II [155]. Otro estudio encontró que la administración de sulfátido en el momento de la inducción de la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) condujo a una disminución de la producción de IFN- $\gamma$  e IL-4 por las células T reactivas a autoantígenos y previno casi por completo la enfermedad [17]. Por lo tanto, en la autoinmunidad las células NKT tipo I y tipo II tienen funciones opuestas y pueden aprovecharse para la intervención terapéutica de enfermedades autoinmunes.

También se ha observado un mecanismo inmunoregulatorio entre las células NKT de tipo II y las DCs hepáticas que dan como resultado la regulación de la actividad de las células NKT

tipo I a través de la inducción de anergia en un modelo de hepatitis inducida por concavalina A, demostrando que las células NKT tipo II podían regular la función de las células NKT tipo I [156]. Tras la administración intraperitoneal de sulfátido, hubo una rápida acumulación de células NKT de tipo II reactivas a sulfátido en el hígado. Esto resultó en la activación de las células dendríticas plasmocitoides y la producción de IL-12 y MIP-2 que produjeron anergia en las células NKT tipo I. Así, en el modelo de hepatitis inducida por concavalina A se demostró que las células NKT tipo II podrían regular la función de las células NKT tipo I e inducir su anergia [97].

De acuerdo con estos estudios, estos mecanismos regulatorios entre las células NKT tipo I y NKT tipo II podrían aprovecharse para intervenir en enfermedades inflamatorias, incluidas la autoinmunidad, hepatitis y el asma. Si bien los resultados de esta tesis no se encuentran en el contexto de una enfermedad, los resultados encontrados sí indican de un mecanismo regulatorio entre ambas células. Nosotros observamos que los isotipos de anticuerpos IgG1, IgG2b, IgG2c e IgG3 disminuyeron su generación luego de la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer más LP sulfátido en comparación a la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer posterior a la segunda inmunización. Una explicación a este mecanismo regulatorio, del efecto de la administración de sulfátido sobre la activación de las células NKT tipo I inducidas por  $\alpha$ -Galcer, se ha explicado por una reducción en la formación de complejos CD1d/ $\alpha$ -Galcer en las células dendríticas, reducción de la expresión de CD40L y en la producción de IFN- $\gamma$  por las células NKT tipo I [110].

Este mecanismo regulatorio promovido por las células NKT tipo II activadas por sulfátido sobre la disminución en la generación de isotipos de anticuerpos IgG producidos por las células B, podría ser utilizado para regular la respuesta inmune. Es así como se podría proponer la administración de liposomas conteniendo sulfátido administrado en conjunto con el antígeno y ser evaluado en enfermedades autoinmunes tales como la encefalomiелitis autoinmune experimental con el objetivo de modular la producción de autoanticuerpos producidos en el SNC a proteínas de mielina así como también reducir la producción de citoquinas por linfocitos T autoantígenos específicos de la enfermedad.

En el ratón hCD1d-KI del gen de CD1d humano, cuyas células NKT tipo II son más prevalentes que las células NKT tipo I, nosotros encontramos que solo la producción de la citoquina IFN- $\gamma$  por las células NKT tipo I activadas por  $\alpha$ -Galcer se redujo luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer más sulfátido en comparación a la administración de solo  $\alpha$ -Galcer. Se ha evidenciado que, en ratones BALB/c, la estimulación de las células NKT tipo II por sulfátido reduce la proliferación de las células NKT tipo I activadas por  $\alpha$ -Galcer y la producción de IFN- $\gamma$  [37, 86].

Además, en el ratón hCD1d-KI del gen de CD1d humano, las citoquinas IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, IL-6 incrementaron su producción luego de la administración de  $\alpha$ -Galcer más sulfátido en comparación a la administración de solo  $\alpha$ -Galcer. En ratones hCD1d-KI, el patrón temporal de la producción de citoquinas fue muy similar a la observada en ratones Wild type, aunque las cantidades absolutas de IFN- $\gamma$  e IL-4 fueron sustancialmente más bajas [128].

Actualmente se sabe que la citoquina IL-4, en el contexto de células NKT, tiene propiedades tipo Th2, suprimiendo la producción de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  por monocitos [79] y programa la activación alternativa de macrófagos. Macrófagos activados alternativamente contrarrestan la inflamación a través de la liberación del antagonista del receptor de IL-1 (IL-1 $\alpha$ ), IL-10, TGF $\beta$  y promueve además la reparación de tejidos y la cicatrización de heridas [80-82]. Recientes estudios han demostrado que el aumento de IL-4 en tejidos puede ser satisfactorio para el tratamiento de la inflamación [83, 84]. IL-4 actúa sobre las células B como un factor de inducción de cambio de clase a IgG1 e IgE [157].

Se ha evidenciado que la administración de sulfátido a ratones NOD (Non-Obese Diabetic) reduce la incidencia de diabetes tipo 1 por la producción de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 provenientes de DCs [92, 158]. También las células NKT tipo II han demostrado tener un efecto protector en la injuria por isquemia-reperfusión renal, donde la capacidad protectora de estas células activadas por sulfátido fue asociada con su habilidad para estimular vías como IL-10 y HIF-1 $\alpha$  [19]. Además, la activación de las células NKT tipo II reduce la producción de IFN- $\gamma$  por las células NKT tipo I y previene la injuria por isquemia-reperfusión hepática por inactivación de las células NKT tipo I mediada por sulfátido y que fue asociada con reducción de diferentes poblaciones de células mieloides [91].

IL-13 actúa en diferentes etapas de la vía de maduración de las células B, aumentando la expresión de CD23/Fc $\epsilon$ RII y MHC de clase II en las células B, estimula la proliferación de células B e induce la síntesis de IgE [159]. Además es capaz de antagonizar la respuesta inmunitaria proinflamatoria impulsada por Th1. Es esencial para la inmunidad contra infecciones parasitarias extracelulares al promover la expresión de IgG1 e IgE, activar mastocitos y basófilos que liberan mediadores inflamatorios y la expulsión del parásito [160]. La citoquina IL-13 producida por las células NKT se ha asociado a tener un efecto directo sobre las células epiteliales en la colitis ulcerosa. La evidencia de varios modelos animales de enfermedad inflamatoria intestinal ha demostrado que las células NKT tipo I pueden ser protectoras o patógenas [161]. Las células NKT tipo II parecen promover la inflamación intestinal y mediar una respuesta patógena cuando tanto la expresión de CD1d como la

frecuencia de células NKT tipo II productoras de IL-13 aumentan en ratones y en pacientes con colitis ulcerosa [18, 28, 133].

La citoquina IL-17 se ha identificado como un regulador importante de la respuesta inflamatoria [162, 163]. IL-17 ha reportado ser producida por las células NKT tipo I y tipo II [164]. Ha estado implicada como mediador proinflamatorio en varios modelos experimentales de inflamación asociados con autoinmunidad como artritis y encefalomiелitis autoinmune experimental [165, 166]. Sin embargo, también ha demostrado ser capaz de suprimir las respuestas inflamatorias en modelos murinos experimentales de asma [167], gastritis [168] y colitis [169, 170]. Durante la inflamación de las vías respiratorias inducida por la activación pulmonar de las células NKT con  $\alpha$ -GalCer, la IL-17 contribuyó a la infiltración de neutrófilos en las vías respiratorias [171].

IL-6 es un factor de diferenciación de células B que induce la diferenciación de células B hacia células plasmáticas y promueve la producción de IgG [126, 172]. IL-6 influye en las funciones efectoras de las células T CD4<sup>+</sup> al promover la diferenciación de células Th2 [173] y simultáneamente inhibe la polarización de Th1. IL-6 activa la transcripción mediada por el factor nuclear de células T activadas (NFAT) que conduce a la producción de IL-4 por células T CD4<sup>+</sup> vírgenes y su diferenciación en células efectoras Th2. En combinación con TGF- $\beta$  es indispensable para la diferenciación de las células T CD4 a Th17. La IL-6 es necesaria para mediar en la producción de IL-21 en células T CD4<sup>+</sup> vírgenes durante la estimulación con antígeno, promoviendo la producción de anticuerpos en las células B indirectamente mediante la regulación positiva de la expresión de IL-21 en las células T CD4<sup>+</sup> y que esta IL-21 luego actúa sobre las células B [174]. Además, induce la diferenciación de las células T CD8 a células T citotóxicas y es capaz de inducir la diferenciación de las células B activadas hacia células plasmáticas productoras de anticuerpo, entre otras [59, 175-177].

Otro de los hallazgos de esta tesis fue que los isotipos de anticuerpos IgG1, IgG2b, IgG2c e IgG3 mostraron un incremento luego de la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer más LP OVA sulfátido en comparación a la administración de LP OVA  $\alpha$ -Galcer posterior a la segunda inmunización. Este resultado no esperado puede explicarse porque tanto el lípido como el antígeno contenido en liposomas fueron presentadas a células B y ambas células NKT potenciaron sus efectos en la producción de los anticuerpos por las células B. Por lo tanto, ambos lípidos  $\alpha$ -Galcer y sulfátido presentan un comportamiento estimulador de la respuesta inmune humoral cuando son administrados a través de liposomas conteniendo el antígeno. De acuerdo con estos resultados, la administración de liposomas conteniendo sulfátido junto con el antígeno podrían ser utilizados como adyuvantes.

Recientemente se ha demostrado que las células NKT tipo II activadas por sulfátido, es un adyuvante eficaz en vacunas orales contra el cólera en un modelo de ratón, mejorando las respuestas inmunitarias Th1 y Th17 así como el título de IgA, respaldando el potencial de los adyuvantes dirigidos a las células NKT como nuevas estrategias de vacunas [178]. En relación con  $\alpha$ -Galcer, ha sido utilizado como adyuvante en vacunas contra varios patógenos [43], cáncer [179], VIH [180], influenza [181], entre otros estudios. Recientemente se ha descrito que la administración sublingual de liposomas que contienen  $\alpha$ -Galcer actúa como adyuvante eficaz en la inmunoterapia con alérgenos en un modelo de rinitis alérgica [182].

Se sabe que IFN- $\gamma$  estimula fuertemente a las células B para secretar IgG2a/c. El anticuerpo IgG2a/c junto con IFN- $\gamma$  se encuentran asociados a la respuesta inmune Th1. Los anticuerpos IgG2a/c activan el sistema del complemento más fácilmente que los anticuerpos IgG1 [183]; se unen a receptores Fc específicos que se expresan en macrófagos murinos y están involucrados en la fagocitosis [183].

Dependiendo del patrón de citoquina, las células promueven su actividad adyuvante como Th1 (por ej. CpG) o Th2 (por ej. Alum) y en ratones este patrón se correlaciona con la producción prevalente de los isotipos de anticuerpos IgG2a/c e IgG1, respectivamente. El lípido  $\alpha$ -Galcer no polariza la respuesta Th sino más bien genera una respuesta balanceada Th0 con producción de anticuerpos IgG1 e IgG2a/c [43], lo que también es observado en nuestros resultados, ya que las absorbancias de los isotipos de anticuerpo más altos corresponden a IgG1 y a IgG2a/c. Un análisis el transcriptoma de las células NKT tipo II reactivas a sulfátido indica que esta célula tiene un perfil de expresión génica distinto pero similar a las células NKT tipo I, en contraste con Th2, Th0 [184].

Se ha demostrado que IgG1 de ratón es deficiente para destruir tumores, pero desempeña un papel importante en el control de parásitos gastrointestinales [185, 186]. IgG1 no es capaz de fijar el complemento y se une ávidamente al receptor inhibitor Fc $\gamma$ RIIb que a uno estimulador [187, 188]. La producción de IgG1 se incrementa en respuesta a Th2 e IL-4. En presencia de IL-4 e IFN- $\gamma$  se producen tanto IgG1 como IgG2a [189].

Las células Th1 activan macrófagos, células NK y células T CD8+ para combatir los patógenos intracelulares. Las células Th1 también estimulan el cambio de clase de inmunoglobulina en las células B para la producción de anticuerpos de inmunoglobulina IgG2a que optimizan la eliminación de virus y bacterias extracelulares. IgG2a e IgG2b son capaces de fijar complemento y se unen a todos los receptores Fc $\gamma$ R [188]. El cambio de isotipo a IgG2b es promovido por TGF- $\beta$  [190]. IgG2b es considerado parte de la respuesta T independiente [190].

IgG3 es la primera clase de IgG producida en ratones, es independiente de células T, donde el cambio de clase es promovido por IFN- $\gamma$ , producido principalmente a partir de células NK y NKT. Reconoce principalmente carbohidratos y antígenos con epítomos repetidos y promueve la activación de células presentadoras de antígenos como macrófagos y algunas DCs. A través de la interacción de IgG3 unida a antígeno con sus Fc $\gamma$ RI, contribuiría a las respuestas innatas y proporcionaría un vínculo con la respuesta adaptativa al presentar a las células T, antígenos de complejos inmunes independientes de células T [191-193]. IgG3 es inducido por respuestas Th1 (IL-12 e IFN- $\gamma$ ).

Como fue demostrado en ratones C57BL/6, las citoquinas producidas por las células NKT tipo I en presencia de células NKT tipo II fueron IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-13, mientras que las células NKT tipo II en presencia de células NKT tipo I produjeron IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-13. Estas cuatro citoquinas, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6 e IL-13 se encuentran promoviendo el cambio de isotipo en las células B por las células NKT. La administración de liposomas conteniendo OVA y  $\alpha$ -Galcer promueven la generación de los isotipos IgG1, IgG2b, IgG2c e IgG3. En presencia de las células NKT tipo II activadas por sulfátido se produce una reducción en la generación de todos los isotipos por las células B que fueron moduladas por las células NKT tipo I, dando cuenta de la modulación negativa de las células NKT tipo II sobre las células NKT tipo I.

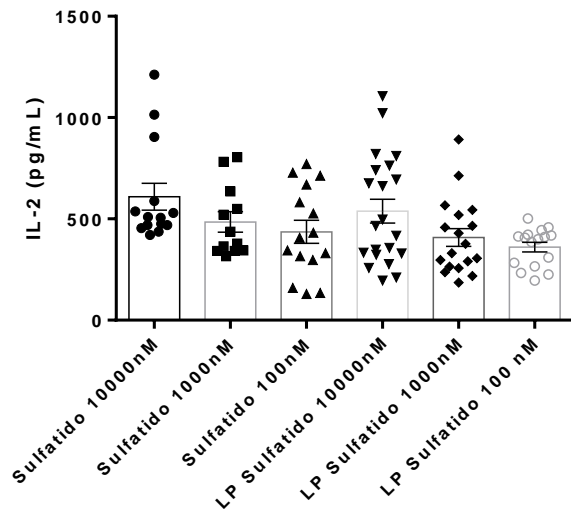
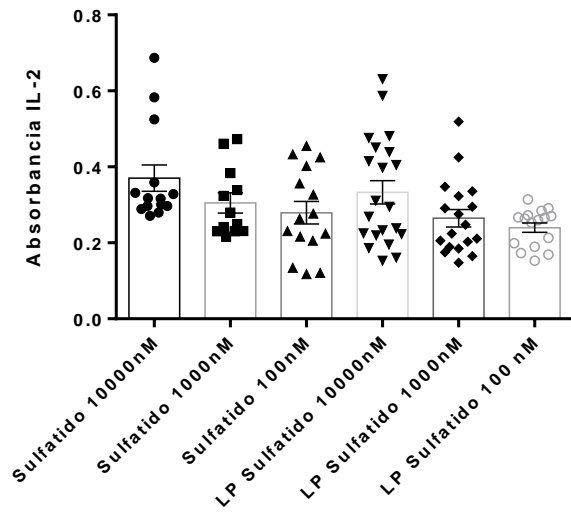
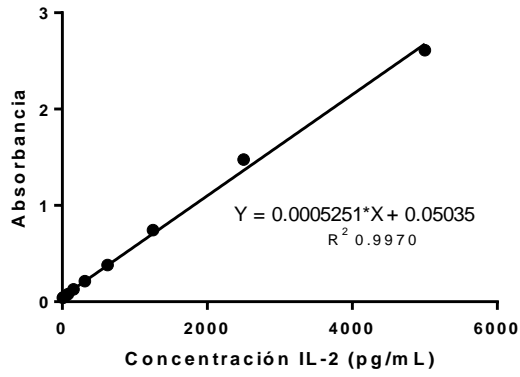
En el contexto en que se administran los lípidos  $\alpha$ -Galcer y sulfátido en conjunto con el antígeno OVA en ratones C57BL/6, ambos liposomas son procesados por los linfocitos B y las correspondientes células NKT junto con los linfocitos T CD4+ promueven el cambio de isotipo a través de la producción de citoquinas dando cuenta de la modulación de las células NKT tipo I y células NKT tipo II sobre las células B.

El sistema de entrega de los lípidos y el antígeno utilizados en esta tesis muestra que la administración a través de liposomas conteniendo tanto el lípido como OVA siempre presentó una absorbancia mayor que la administración en forma libre tanto del lípido como de OVA. Cuando el antígeno OVA y  $\alpha$ -Galcer son entregados a la misma célula B a través de liposomas, fuerza la interacción directa entre la célula B y la célula NKT, permitiendo la entrada simultánea de ambos componentes vía BCR [113, 194].

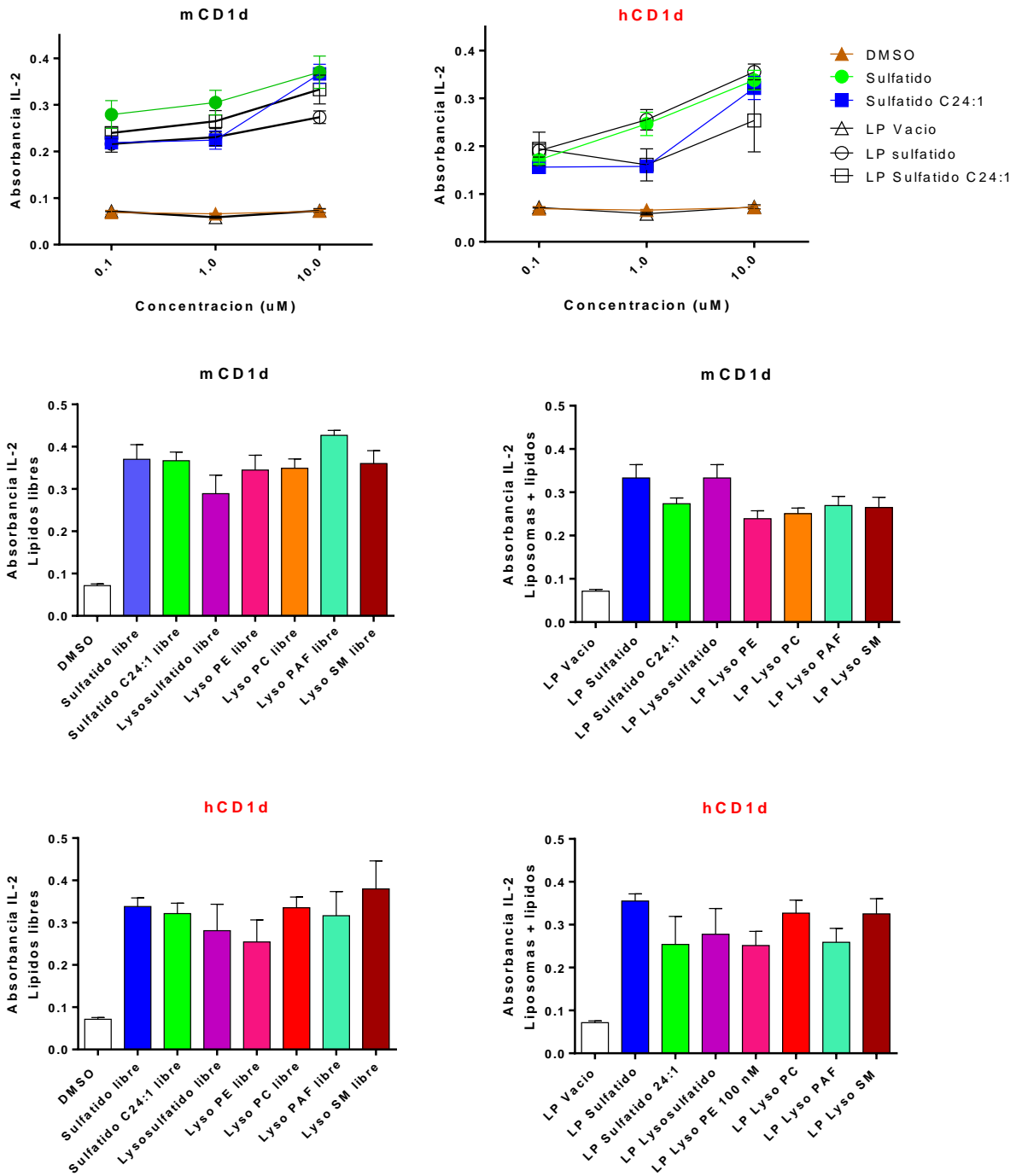
Los resultados obtenidos en esta tesis apoyan el papel de  $\alpha$ -Galcer y sulfátido como adyuvantes que pueden ser añadidos a vacunas para mejorar la respuesta inmunológica. Se muestra además que, como adyuvantes e inmunomoduladores incrementan o disminuyen la absorbancia de los isotipos de anticuerpos en la respuesta inmune secundaria de acuerdo a las citoquinas producidas [195]. Además, reclutan y activan células inmunes como células dendríticas, células T CD4, T CD8 y células B. Estos lípidos incluidos en liposomas demuestran



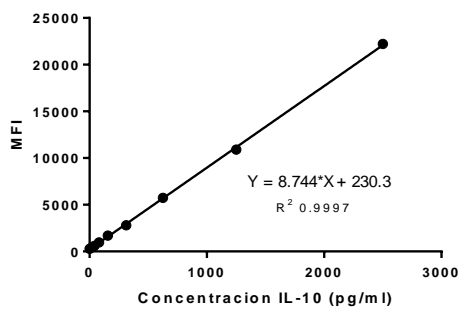
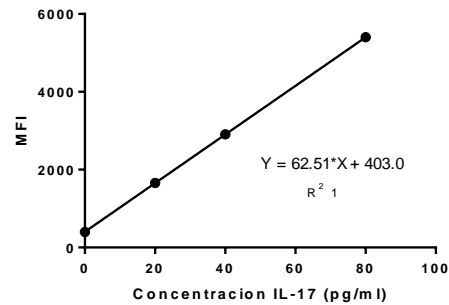
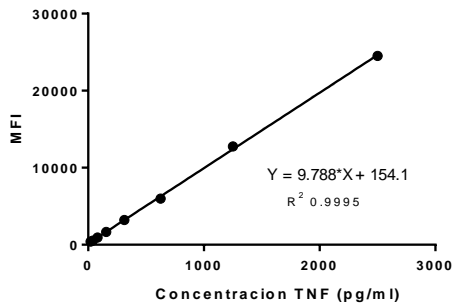
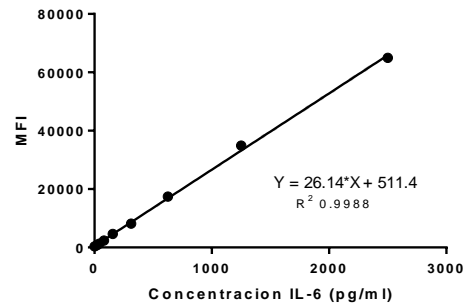
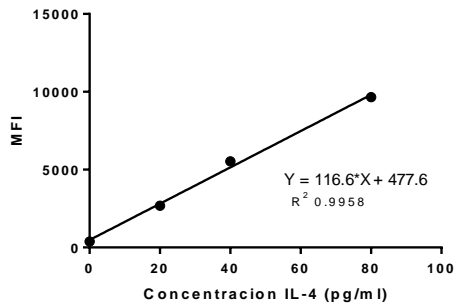
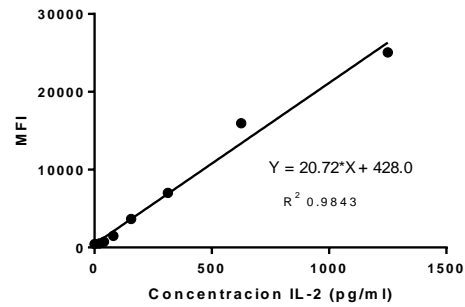
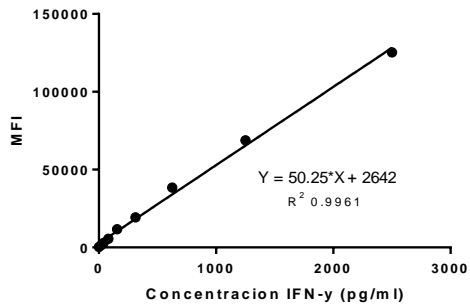
que la respuesta es más efectiva que su administración en forma libre. Su administración junto con el antígeno encontrado en la superficie del liposoma demostró incrementar la entrada del antígeno y estimular a las células inmunes. La comprensión de como inducir y modular los efectos de las células NKT tanto en modelos animales como en humanos es esencial para su posible uso en enfermedades como en el desarrollo de vacunas.



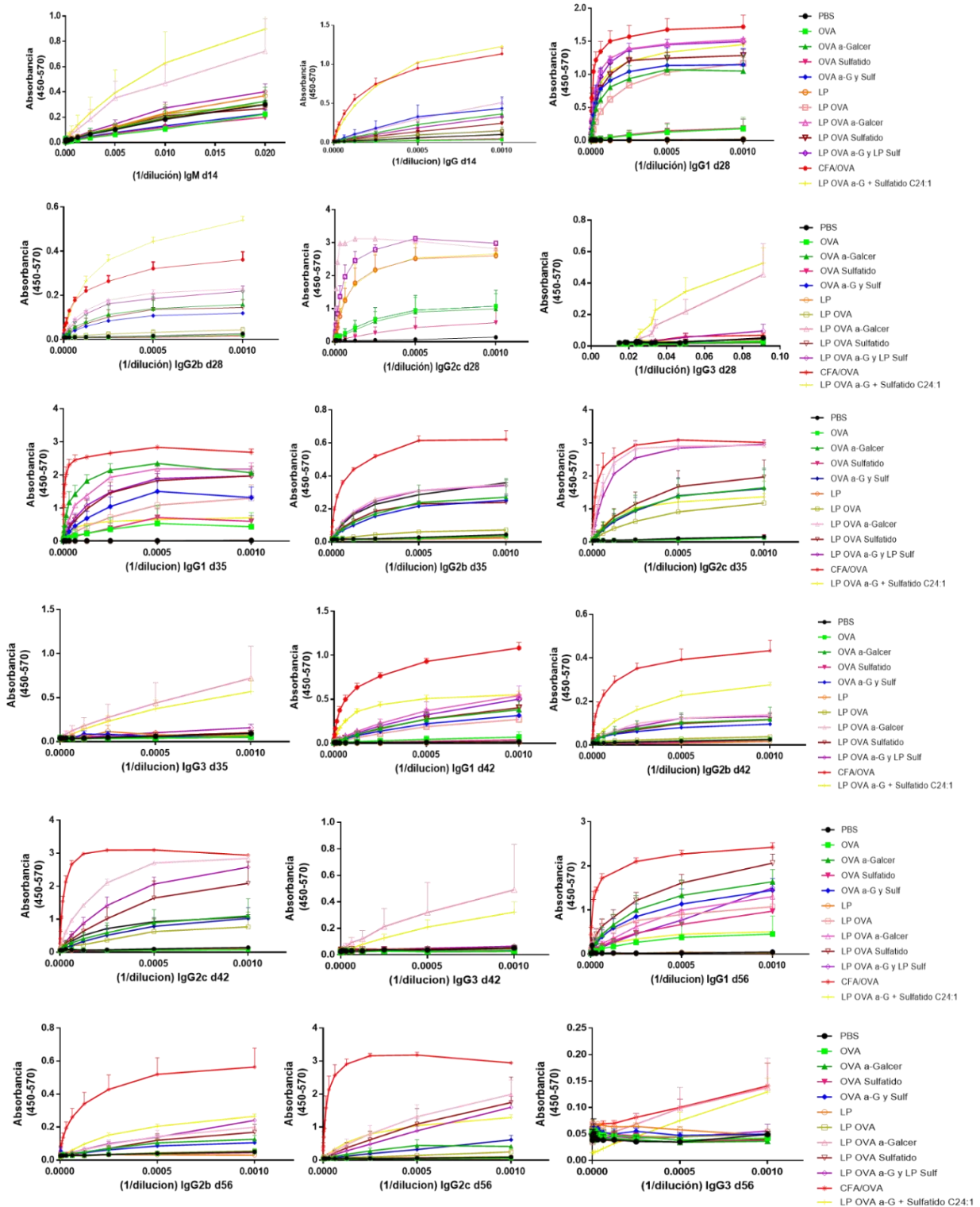
**Figura suplementaria 1:** Cuantificación de la citoquina IL-2 utilizando una curva de calibración, modelo de regresión lineal. Las absorbancias son interpoladas en la curva y graficadas utilizando el software Graphpad.



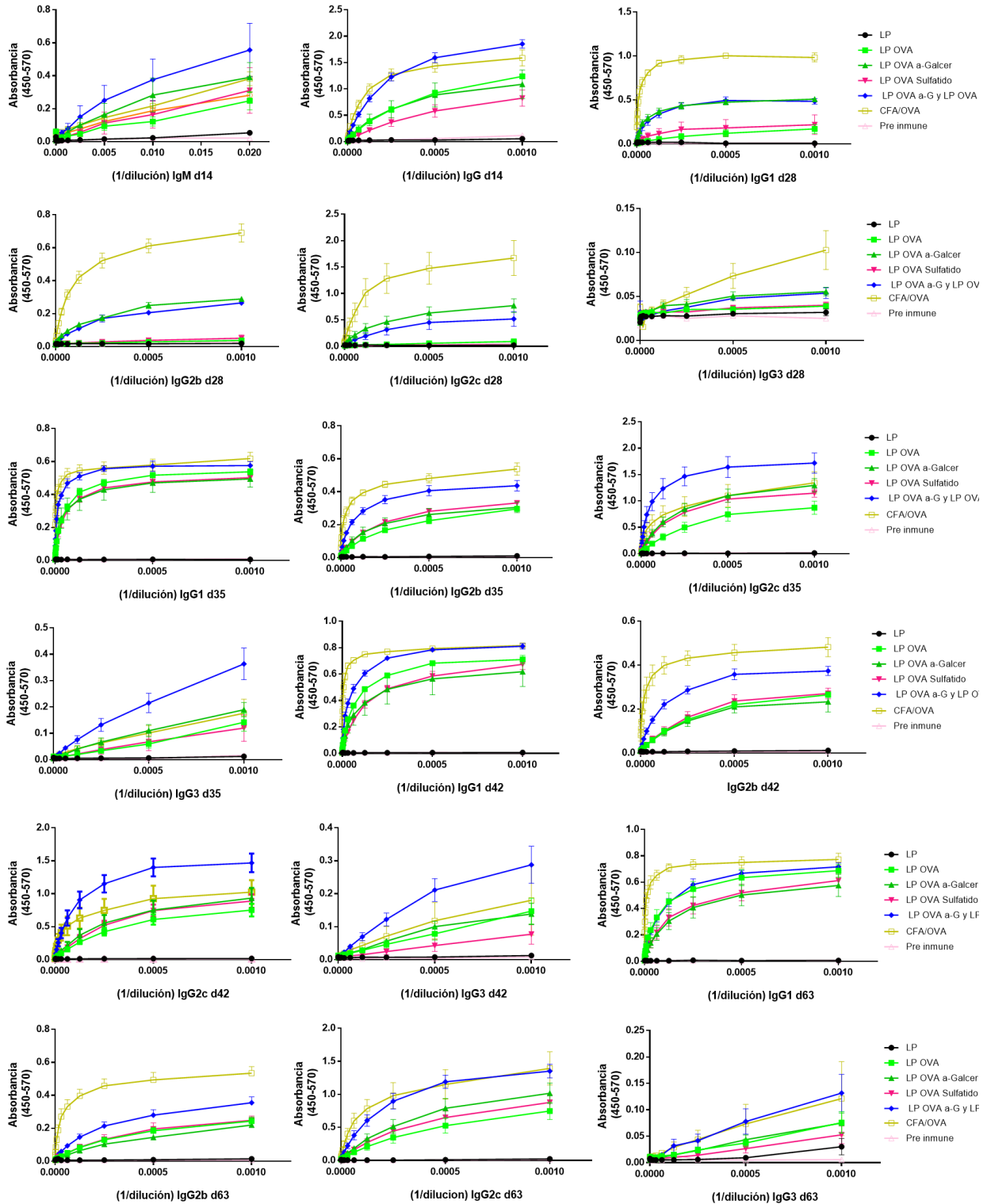
**Figura suplementaria 2:** Absorbancias y concentraciones de IL-2 determinadas a través de ensayos *in vitro* con BMDC C57BL/6 y CD1d-Knock-in pulsadas con sulfátido, sulfátido C24:1, Liosulfatido, Lyso PE, Lyso PC, Lyso PAF y Lyso SM, en forma libre y contenido en liposomas (LP), co-cultivadas con los hibridomas de células NKT tipo II. BMDC C57BL/6 (mCD1d); BMDC Knock-in CD1d (hCD1d); C57BL/6 N=6; hCD1d-KI N=6. (P<0.05, \*); (P<0.01, \*\*); (P<0.001, \*\*\*). Las diferencias estadísticas están dadas por la aplicación de la prueba One-way ANOVA y la aplicación de la prueba de comparación múltiple Two way ANOVA y como análisis post-hoc a la prueba de Dunnett entre los grupos controles y tratados.



**Figura suplementaria 3:** Curvas de intensidad de fluorescencia media (MFI) versus concentración de las citoquinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-17A e IL-10 del kit de citoquinas CBA (Cytometric Bead Array mouse Th1/Th2/Th17) utilizadas para determinar las concentraciones de suero. El límite de detección teórico para cada citoquina es el siguiente: 0.1 pg/ml para IL-2; 0.03 pg/ml para IL-4; 1.4 pg/ml para IL-6; 0.5 pg/ml para IFN- $\gamma$ ; 0.9 pg/ml para TNF; 0.8 pg/ml para IL-17A; 16.8 pg/ml para IL-10.



**Figura suplementaria 4:** Datos crudos graficados en curvas de absorbancia versus isotipos de anticuerpos correspondientes al estudio cinético de la respuesta inmune humoral para evaluar la modulación de las funciones de las células NKT tipo I y células B por la activación de las células NKT tipo II mediante el uso de liposomas y ligandos lipídicos libres.



**Figura suplementaria 5:** Datos crudos graficados en curvas de absorbancia versus isotipos de anticuerpos correspondientes al estudio cinético de la respuesta inmune humoral para evaluar la modulación de las funciones de las células NKT tipo I y células B por la activación de las células NKT tipo II mediante el uso de liposomas y ligandos lipídicos libres junto con el antígeno OVA.

Santiago, a 30 de octubre de 2018

Certificado n°: 18193-MED-UCH


### CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile certifica que en el Protocolo CBA 1032 FMUCH, del Proyecto de Investigación titulado: "Papel de las células Natural Killer T tipo II sobre la modulación de las respuestas de linfocitos T y B en un ratón Knock-in para CD1d humano", de la Srta. Daniela Schneider Melgarejo, Tesista del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile y cuyo Investigador Responsable y Patrocinador es el Dr. Leandro Javier Carreño Bórquez, Profesor Asistente, Programa Disciplinario de Inmunología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, no se plantean objeciones en sus procedimientos que contravengan las normas de Bioética de manejo y cuidado de animales, así mismo la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.


Ambos investigadores se han comprometido a la ejecución de este proyecto dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo revisado y autorizado por el CICUA, a mantener los procedimientos experimentales planteados y a no realizar ninguna modificación sin previa aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación para el uso de 468 ratones *Mus musculus* (cepa C57BL/6), de los cuales 105, se obtendrán del Bioterio Central ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, 210 se obtendrán del Bioterio de la Pontificia Universidad Católica de Chile, 105 serán importados desde Albert Einstein College of Medicine, EEUU y 48 serán utilizados para obtener muestras provenientes del Laboratorio del Dr. Alexis Kalergis, Facultad de Ciencias Biológicas, PUC, desde octubre de 2018 hasta marzo de 2021, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por Fondecyt Nro. 1160336 (1 de abril 2016 a 1 de marzo 2020). - ICGB 2018 (2018-2020).

*El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 53 miembros: 3 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionado a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del "Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales" después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones erigidas por el Comité.*



Ronald Vargas Casanova  
Director  
CICUA – VID  
Universidad de Chile



Dr. Emilio Herrera Videla  
Presidente  
CICUA - VID  
Universidad de Chile

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)  
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile  
www.uchile/cicus.cl email: coordinador.cicus@uchile.cl

## Referencias

1. Mori, L., M. Lepore, and G. De Libero, *The Immunology of CD1- and MR1-Restricted T Cells*. Annu Rev Immunol, 2016. **34**: p. 479-510.
2. Lang, G.A., T.S. Devera, and M.L. Lang, *Requirement for CD1d expression by B cells to stimulate NKT cell-enhanced antibody production*. Blood, 2008. **111**(4): p. 2158-62.
3. Carreño, L.J., S.S. Kharkwal, and S.A. Porcelli, *Optimizing NKT cell ligands as vaccine adjuvants*. Immunotherapy, 2014. **6**(3): p. 309-20.
4. Dhodapkar, M.V. and V. Kumar, *Type II NKT Cells and Their Emerging Role in Health and Disease*. J Immunol, 2017. **198**(3): p. 1015-1021.
5. Exley, M., et al., *CD1d structure and regulation on human thymocytes, peripheral blood T cells, B cells and monocytes*. Immunology, 2000. **100**(1): p. 37-47.
6. Godfrey, D.I., et al., *The burgeoning family of unconventional T cells*. Nat Immunol, 2015. **16**(11): p. 1114-23.
7. Kumar, V. and T.L. Delovitch, *Different subsets of natural killer T cells may vary in their roles in health and disease*. Immunology, 2014. **142**(3): p. 321-36.
8. Benlagha, K., et al., *In vivo identification of glycolipid antigen-specific T cells using fluorescent CD1d tetramers*. J Exp Med, 2000. **191**(11): p. 1895-903.
9. Matsuda, J.L., et al., *Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers*. J Exp Med, 2000. **192**(5): p. 741-54.
10. Arrenberg, P., R. Halder, and V. Kumar, *Cross-regulation between distinct natural killer T cell subsets influences immune response to self and foreign antigens*. J Cell Physiol, 2009. **218**(2): p. 246-50.
11. Exley, M.A., et al., *A major fraction of human bone marrow lymphocytes are Th2-like CD1d-reactive T cells that can suppress mixed lymphocyte responses*. J Immunol, 2001. **167**(10): p. 5531-4.
12. Eberl, G., et al., *Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NK T cells*. J Immunol, 1999. **162**(11): p. 6410-9.
13. Wu, L. and L. Van Kaer, *Natural killer T cells and autoimmune disease*. Curr Mol Med, 2009. **9**(1): p. 4-14.
14. Bricard, G. and S.A. Porcelli, *Antigen presentation by CD1 molecules and the generation of lipid-specific T cell immunity*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(14): p. 1824-40.
15. Baron, J.L., et al., *Activation of a nonclassical NKT cell subset in a transgenic mouse model of hepatitis B virus infection*. Immunity, 2002. **16**(4): p. 583-94.
16. Terabe, M., et al., *A nonclassical non-Valpha14Jalpha18 CD1d-restricted (type II) NKT cell is sufficient for down-regulation of tumor immunosurveillance*. J Exp Med, 2005. **202**(12): p. 1627-33.
17. Jahng, A., et al., *Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide*. J Exp Med, 2004. **199**(7): p. 947-57.
18. Fuss, I.J., et al., *IL-13R $\alpha$ 2-bearing, type II NKT cells reactive to sulfatide self-antigen populate the mucosa of ulcerative colitis*. Gut, 2014. **63**(11): p. 1728-36.
19. Yang, S.H., et al., *Sulfatide-reactive natural killer T cells abrogate ischemia-reperfusion injury*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(7): p. 1305-14.
20. Maricic, I., et al., *Recognition of lysophosphatidylcholine by type II NKT cells and protection from an inflammatory liver disease*. J Immunol, 2014. **193**(9): p. 4580-9.
21. Yuan, W., et al., *Natural lipid ligands associated with human CD1d targeted to different subcellular compartments*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2009. **182**(8): p. 4784-4791.
22. Cox, D., et al., *Determination of cellular lipids bound to human CD1d molecules*. PloS one, 2009. **4**(5): p. e5325-e5325.
23. Stetson, D.B., et al., *Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function*. J Exp Med, 2003. **198**(7): p. 1069-76.
24. Nair, S., et al., *Type II NKT-TFH cells against Gaucher lipids regulate B-cell immunity and inflammation*. Blood, 2015. **125**(8): p. 1256-71.
25. Marrero, I., R. Ware, and V. Kumar, *Type II NKT Cells in Inflammation, Autoimmunity, Microbial Immunity, and Cancer*. Frontiers in Immunology, 2015. **6**.
26. Kawano, T., et al., *CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides*. Science, 1997. **278**(5343): p. 1626-9.



27. Kobayashi, E., et al., *KRN7000, a novel immunomodulator, and its antitumor activities*. *Oncol Res*, 1995. **7**(10-11): p. 529-34.
28. Liao, C.M., et al., *dysregulation of CD1d-restricted type ii natural killer T cells leads to spontaneous development of colitis in mice*. *Gastroenterology*, 2012. **142**(2): p. 326-34.e1-2.
29. Smyth, M.J., et al., *Sequential activation of NKT cells and NK cells provides effective innate immunotherapy of cancer*. *The Journal of experimental medicine*, 2005. **201**(12): p. 1973-1985.
30. 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*. *The Journal of experimental medicine*, 1999. **189**(7): p. 1121-1128.
31. Vincent, M.S., et al., *CD1-dependent dendritic cell instruction*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(12): p. 1163-8.
32. Brigl, M., et al., *Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection*. *Nature Immunology*, 2003. **4**(12): p. 1230-1237.
33. Sehee, A., et al., *GM-CSF and IL-4 produced by NKT cells inversely regulate IL-1 $\beta$  production by macrophages*. *Immunology Letters*, 2017. **182**: p. 50-56.
34. Dasgupta, S. and V. Kumar, *Type II NKT cells: a distinct CD1d-restricted immune regulatory NKT cell subset*. *Immunogenetics*, 2016. **68**(8): p. 665-76.
35. Bandyopadhyay, K., I. Marrero, and V. Kumar, *NKT cell subsets as key participants in liver physiology and pathology*. *Cell Mol Immunol*, 2016. **13**(3): p. 337-46.
36. Kumar, V., *NKT-cell subsets: promoters and protectors in inflammatory liver disease*. *J Hepatol*, 2013. **59**(3): p. 618-20.
37. Ambrosino, E., et al., *Cross-regulation between type I and type II NKT cells in regulating tumor immunity: a new immunoregulatory axis*. *J Immunol*, 2007. **179**(8): p. 5126-36.
38. Yu, K.O. and S.A. Porcelli, *The diverse functions of CD1d-restricted NKT cells and their potential for immunotherapy*. *Immunol Lett*, 2005. **100**(1): p. 42-55.
39. Crowe, N.Y., et al., *Glycolipid antigen drives rapid expansion and sustained cytokine production by NK T cells*. *J Immunol*, 2003. **171**(8): p. 4020-7.
40. Burn, O.K., et al., *Harnessing NKT cells for vaccination*. *Oxford Open Immunology*, 2021. **2**(1).
41. Parker, D.C., *T cell-dependent B cell activation*. *Annu Rev Immunol*, 1993. **11**: p. 331-60.
42. Devera, T.S., et al., *CD1d-dependent B-cell help by NK-like T cells leads to enhanced and sustained production of Bacillus anthracis lethal toxin-neutralizing antibodies*. *Infect Immun*, 2010. **78**(4): p. 1610-7.
43. Galli, G., et al., *Invariant NKT cells sustain specific B cell responses and memory*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(10): p. 3984-9.
44. Lang, G.A., M.A. Exley, and M.L. Lang, *The CD1d-binding glycolipid alpha-galactosylceramide enhances humoral immunity to T-dependent and T-independent antigen in a CD1d-dependent manner*. *Immunology*, 2006. **119**(1): p. 116-25.
45. Lang, G.A., et al., *Reduction of CD1d expression in vivo minimally affects NKT-enhanced antibody production but boosts B-cell memory*. *Int Immunol*, 2011. **23**(4): p. 251-60.
46. Shah, H.B., et al., *Type II NKT cells facilitate Alum-sensing and humoral immunity*. *J Leukoc Biol*, 2012. **92**(4): p. 883-93.
47. Jayawardena-Wolf, J., et al., *CD1d endosomal trafficking is independently regulated by an intrinsic CD1d-encoded tyrosine motif and by the invariant chain*. *Immunity*, 2001. **15**(6): p. 897-908.
48. Roberts, T.J., et al., *Recycling CD1d1 molecules present endogenous antigens processed in an endocytic compartment to NKT cells*. *J Immunol*, 2002. **168**(11): p. 5409-14.
49. Cernadas, M., et al., *Lysosomal localization of murine CD1d mediated by AP-3 is necessary for NK T cell development*. *J Immunol*, 2003. **171**(8): p. 4149-55.
50. Lawton, A.P., et al., *The mouse CD1d cytoplasmic tail mediates CD1d trafficking and antigen presentation by adaptor protein 3-dependent and -independent mechanisms*. *J Immunol*, 2005. **174**(6): p. 3179-86.
51. Lang, G.A., et al., *BCR targeting of biotin- $\alpha$ -galactosylceramide leads to enhanced presentation on CD1d and requires transport of BCR to CD1d-containing endocytic compartments*. *International Immunology*, 2005. **17**(7): p. 899-908.
52. 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*, 2008. **105**(24): p.

- 8345-50.
53. Leadbetter, E.A., et al., *NK T cells provide lipid antigen-specific cognate help for B cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(24): p. 8339-8344.
  54. Embgenbroich, M. and S. Burgdorf, *Current Concepts of Antigen Cross-Presentation*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1643.
  55. Cella, M., et al., *Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells*. Nature, 1997. **388**(6644): p. 782-787.
  56. Hertz, C.J., et al., *Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2*. J Immunol, 2001. **166**(4): p. 2444-50.
  57. Shedlock, D.J. and H. Shen, *Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory*. Science, 2003. **300**(5617): p. 337-9.
  58. Schoenberger, S.P., et al., *T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions*. Nature, 1998. **393**(6684): p. 480-3.
  59. Ma, C.S., et al., *The origins, function, and regulation of T follicular helper cells*. The Journal of experimental medicine, 2012. **209**(7): p. 1241-1253.
  60. Victora, G.D. and M.C. Nussenzweig, *Germinal Centers*. Annual Review of Immunology, 2012. **30**(1): p. 429-457.
  61. Tonti, E., et al., *NKT-cell help to B lymphocytes can occur independently of cognate interaction*. Blood, 2009. **113**(2): p. 370-6.
  62. 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, 2011. **13**(1): p. 44-50.
  63. Chang, P.-P., et al., *Identification of Bcl-6-dependent follicular helper NKT cells that provide cognate help for B cell responses*. Nature Immunology, 2012. **13**(1): p. 35-43.
  64. Mora, N. and C. Rosales, *[Fc receptor functions in host and immune regulation]*. Rev Invest Clin, 2009. **61**(4): p. 313-26.
  65. Snapper, C.M., K.B. Marcu, and P. Zelazowski, *The immunoglobulin class switch: beyond "accessibility"*. Immunity, 1997. **6**(3): p. 217-23.
  66. Coffman, R.L., et al., *The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation*. Immunol Rev, 1988. **102**: p. 5-28.
  67. Hodgkin, P.D., et al., *Separation of events mediating B cell proliferation and Ig production by using T cell membranes and lymphokines*. J Immunol, 1990. **145**(7): p. 2025-34.
  68. Deenick, E.K., J. Hasbold, and P.D. Hodgkin, *Decision criteria for resolving isotype switching conflicts by B cells*. Eur J Immunol, 2005. **35**(10): p. 2949-55.
  69. Brynjolfsson, S.F., et al., *Long-lived plasma cells in human bone marrow can be either CD19(+) or CD19(-)*. Blood advances, 2017. **1**(13): p. 835-838.
  70. Benner, R., et al., *Antibody formation in mouse bone marrow. III. Effects of route of priming and antigen dose*. Immunology, 1974. **27**(5): p. 747-760.
  71. Slifka, M.K., et al., *Humoral immunity due to long-lived plasma cells*. Immunity, 1998. **8**(3): p. 363-72.
  72. Benner, R., W. Hijmans, and J.J. Haaijman, *The bone marrow: the major source of serum immunoglobulins, but still a neglected site of antibody formation*. Clin Exp Immunol, 1981. **46**(1): p. 1-8.
  73. Mamani-Matsuda, M., et al., *The human spleen is a major reservoir for long-lived vaccinia virus-specific memory B cells*. Blood, 2008. **111**(9): p. 4653-9.
  74. Lisbonne, M., et al., *Cutting edge: invariant V alpha 14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model*. J Immunol, 2003. **171**(4): p. 1637-41.
  75. Akbari, O., et al., *Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity*. Nat Med, 2003. **9**(5): p. 582-8.
  76. Devera, T.S., et al., *Glycolipid-activated NKT cells support the induction of persistent plasma cell responses and antibody titers*. Eur J Immunol, 2008. **38**(4): p. 1001-11.
  77. Cavallari, M., et al., *A semisynthetic carbohydrate-lipid vaccine that protects against S. pneumoniae in mice*. Nature Chemical Biology, 2014. **10**(11): p. 950-956.
  78. Mistry, P.K., et al., *Gaucher disease and malignancy: a model for cancer pathogenesis in an inborn error of metabolism*. Crit Rev Oncog, 2013. **18**(3): p. 235-46.
  79. Osman, Y., et al., *Activation of hepatic NKT cells and subsequent liver injury following administration*

- of *alpha-galactosylceramide*. Eur J Immunol, 2000. **30**(7): p. 1919-28.
80. Haynes, B.F., et al., *The human thymus during aging*. Immunol Res, 2000. **22**(2-3): p. 253-61.
  81. Britanova, O.V., et al., *Age-Related Decrease in TCR Repertoire Diversity Measured with Deep and Normalized Sequence Profiling*. The Journal of Immunology, 2014. **192**(6): p. 2689-2698.
  82. Yager, E.J., et al., *Age-associated decline in T cell repertoire diversity leads to holes in the repertoire and impaired immunity to influenza virus*. J Exp Med, 2008. **205**(3): p. 711-23.
  83. Lee, J.B., et al., *Decline of influenza-specific CD8+ T cell repertoire in healthy geriatric donors*. Immunity & Ageing, 2011. **8**(1): p. 6.
  84. Smyth, M.J. and D.I. Godfrey, *NKT cells and tumor immunity—a double-edged sword*. Nature Immunology, 2000. **1**(6): p. 459-460.
  85. Berzofsky, J.A. and M. Terabe, *NKT cells in tumor immunity: opposing subsets define a new immunoregulatory axis*. J Immunol, 2008. **180**(6): p. 3627-35.
  86. Terabe, M., et al., *NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway*. Nat Immunol, 2000. **1**(6): p. 515-20.
  87. 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*. J Exp Med, 1999. **189**(7): p. 1121-8.
  88. Terabe, M. and J.A. Berzofsky, *The immunoregulatory role of type I and type II NKT cells in cancer and other diseases*. Cancer Immunol Immunother, 2014. **63**(3): p. 199-213.
  89. Burks, J., P.B. Olkhanud, and J.A. Berzofsky, *The role of NKT cells in gastrointestinal cancers*. Oncoimmunology, 2022. **11**(1): p. 2009666.
  90. Halder, R.C., et al., *Mini review: immune response to myelin-derived sulfatide and CNS-demyelination*. Neurochem Res, 2007. **32**(2): p. 257-62.
  91. Arrenberg, P., I. Maricic, and V. Kumar, *Sulfatide-mediated activation of type II natural killer T cells prevents hepatic ischemic reperfusion injury in mice*. Gastroenterology, 2011. **140**(2): p. 646-55.
  92. Subramanian, L., et al., *NKT cells stimulated by long fatty acyl chain sulfatides significantly reduce the incidence of type 1 diabetes in nonobese diabetic mice [corrected]*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e37771.
  93. Ko, H.J., et al., *Immunosuppressive myeloid-derived suppressor cells can be converted into immunogenic APCs with the help of activated NKT cells: an alternative cell-based antitumor vaccine*. J Immunol, 2009. **182**(4): p. 1818-28.
  94. Crowe, N.Y., M.J. Smyth, and D.I. Godfrey, *A critical role for natural killer T cells in immunosurveillance of methylcholanthrene-induced sarcomas*. J Exp Med, 2002. **196**(1): p. 119-27.
  95. Fujii, S., et al., *Activation of natural killer T cells by alpha-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*. J Exp Med, 2003. **198**(2): p. 267-79.
  96. Terabe, M., et al., *Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence*. J Exp Med, 2003. **198**(11): p. 1741-52.
  97. Halder, R.C., et al., *Type II NKT cell-mediated anergy induction in type I NKT cells prevents inflammatory liver disease*. J Clin Invest, 2007. **117**(8): p. 2302-12.
  98. Ahmadi, A., et al., *The role of NK and NKT cells in the pathogenesis and improvement of multiple sclerosis following disease-modifying therapies*. Health Sci Rep, 2022. **5**(1): p. e489.
  99. Maricic, I., et al., *Dendritic cells and anergic type I NKT cells play a crucial role in sulfatide-mediated immune regulation in experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2014. **193**(3): p. 1035-46.
  100. Van Kaer, L., L. Wu, and V.V. Parekh, *Natural killer T cells in multiple sclerosis and its animal model, experimental autoimmune encephalomyelitis*. Immunology, 2015. **146**(1): p. 1-10.
  101. Duarte, N., et al., *Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice mediated by CD1d-restricted nonclassical NKT cells*. J Immunol, 2004. **173**(5): p. 3112-8.
  102. Tefit, J.N., et al., *Efficacy of ABX196, a new NKT agonist, in prophylactic human vaccination*. Vaccine, 2014. **32**(46): p. 6138-45.
  103. Uldrich, A.P., et al., *NKT cell stimulation with glycolipid antigen in vivo: costimulation-dependent expansion, Bim-dependent contraction, and hyporesponsiveness to further antigenic challenge*. J Immunol, 2005. **175**(5): p. 3092-3101.

104. Sullivan, B.A. and M. Kronenberg, *Activation or anergy: NKT cells are stunned by alpha-galactosylceramide*. The Journal of clinical investigation, 2005. **115**(9): p. 2328-2329.
105. Parekh, V.V., et al., *Glycolipid antigen induces long-term natural killer T cell anergy in mice*. The Journal of clinical investigation, 2005. **115**(9): p. 2572-2583.
106. Sinha, V.R. and A. Trehan, *Biodegradable microspheres for protein delivery*. J Control Release, 2003. **90**(3): p. 261-80.
107. Craparo, E.F. and M.L. Bondi, *Application of polymeric nanoparticles in immunotherapy*. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology, 2012. **12**(6).
108. Makadia, H.K. and S.J. Siegel, *Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier*. Polymers, 2011. **3**(3): p. 1377-1397.
109. Nakamura, T., et al., *The nanoparticulation by octaarginine-modified liposome improves  $\alpha$ -galactosylceramide-mediated antitumor therapy via systemic administration*. J Control Release, 2013. **171**(2): p. 216-24.
110. Shute, T., et al., *Glycolipid-Containing Nanoparticle Vaccine Engages Invariant NKT Cells to Enhance Humoral Protection against Systemic Bacterial Infection but Abrogates T-Independent Vaccine Responses*. J Immunol, 2021. **206**(8): p. 1806-1816.
111. Arora, P. and S.A. Porcelli, *An Efficient and High Yield Method for Isolation of Mouse Dendritic Cell Subsets*. J Vis Exp, 2016(110): p. e53824.
112. Wang, Y., et al., *Dendritic cells activated by an anti-inflammatory agent induce CD4(+) T helper type 2 responses without impairing CD8(+) memory and effector cytotoxic T-lymphocyte responses*. Immunology, 2010. **129**(3): p. 406-17.
113. Chen, Z., et al., *Memory Follicular Helper Invariant NKT Cells Recognize Lipid Antigens on Memory B Cells and Elicit Antibody Recall Responses*. J Immunol, 2018. **200**(9): p. 3117-3127.
114. Lefevre, E.A., et al., *A quantitative assessment of primary and secondary immune responses in cattle using a B cell ELISPOT assay*. Vet Res, 2009. **40**(1): p. 3.
115. Hobbs, J.A., et al., *Selective loss of natural killer T cells by apoptosis following infection with lymphocytic choriomeningitis virus*. J Virol, 2001. **75**(22): p. 10746-54.
116. Emoto, M., Y. Emoto, and S.H.E. Kaufmann, *Interleukin-4-producing CD4+ NK1.1+ TCR $\alpha$ / $\beta$ intermediate liver lymphocytes are down-regulated by Listeria monocytogenes*. European Journal of Immunology, 1995. **25**(12): p. 3321-3325.
117. Eberl, G. and H.R. MacDonald, *Rapid Death and Regeneration of NKT Cells in Anti-CD3 $\epsilon$ - or IL-12-Treated Mice: A Major Role for Bone Marrow in NKT Cell Homeostasis*. Immunity, 1998. **9**(3): p. 345-353.
118. Leite-de-Moraes, M.C., et al., *Fas/Fas Ligand Interactions Promote Activation-Induced Cell Death of NK T Lymphocytes*. The Journal of Immunology, 2000. **165**(8): p. 4367-4371.
119. Wilson, M.T., et al., *The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(19): p. 10913-10918.
120. Morita, M., et al., *Structure-activity relationship of alpha-galactosylceramides against B16-bearing mice*. J Med Chem, 1995. **38**(12): p. 2176-87.
121. Brossay, L., et al., *CD1d-mediated recognition of an alpha-galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution*. J Exp Med, 1998. **188**(8): p. 1521-8.
122. Khan, M.A. and A. Khan, *Role of NKT Cells during Viral Infection and the Development of NKT Cell-Based Nanovaccines*. Vaccines (Basel), 2021. **9**(9).
123. Favreau, M., et al., *Does an NKT-cell-based immunotherapeutic approach have a future in multiple myeloma?* Oncotarget, 2016. **7**(17): p. 23128-40.
124. Syn, W.K., et al., *NKT-associated hedgehog and osteopontin drive fibrogenesis in non-alcoholic fatty liver disease*. Gut, 2012. **61**(9): p. 1323-9.
125. Heller, F., et al., *Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells*. Immunity, 2002. **17**(5): p. 629-38.
126. Yoshizaki, K., et al., *Isolation and characterization of B cell differentiation factor (BCDF) secreted from a human B lymphoblastoid cell line*. J Immunol, 1984. **132**(6): p. 2948-54.
127. Kishimoto, T., *Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 1-21.
128. Wen, X., et al., *Human CD1d knock-in mouse model demonstrates potent antitumor potential of human CD1d-restricted invariant natural killer T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(8): p.

- 2963-8.
129. Aspeslagh, S., et al., *Galactose-modified iNKT cell agonists stabilized by an induced fit of CD1d prevent tumour metastasis*. The EMBO journal, 2011. **30**(11): p. 2294-2305.
  130. Zeng, D., et al., *Activation of natural killer T cells in NZB/W mice induces Th1-type immune responses exacerbating lupus*. J Clin Invest, 2003. **112**(8): p. 1211-22.
  131. Jeon, S.B., et al., *Sulfatide, a major lipid component of myelin sheath, activates inflammatory responses as an endogenous stimulator in brain-resident immune cells*. J Immunol, 2008. **181**(11): p. 8077-87.
  132. Popovic, Z.V., et al., *Sulfated glycosphingolipid as mediator of phagocytosis: SM4s enhances apoptotic cell clearance and modulates macrophage activity*. J Immunol, 2007. **179**(10): p. 6770-82.
  133. Fuss, I.J., et al., *Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis*. J Clin Invest, 2004. **113**(10): p. 1490-7.
  134. Gregoriadis, G., *Immunological adjuvants: a role for liposomes*. Immunol Today, 1990. **11**(3): p. 89-97.
  135. Fortin, A., et al., *Differential activation of cell-mediated immune functions by encapsulated and surface-linked liposomal antigens*. Cell Immunol, 1996. **169**(2): p. 208-17.
  136. Galli, G., et al., *CD1d-restricted help to B cells by human invariant natural killer T lymphocytes*. J Exp Med, 2003. **197**(8): p. 1051-7.
  137. Kitamura, H., et al., *alpha-galactosylceramide induces early B-cell activation through IL-4 production by NKT cells*. Cell Immunol, 2000. **199**(1): p. 37-42.
  138. Campos, R.A., et al., *Cutaneous immunization rapidly activates liver invariant Valpha14 NKT cells stimulating B-1 B cells to initiate T cell recruitment for elicitation of contact sensitivity*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1785-96.
  139. Rhost, S., et al., *Identification of novel glycolipid ligands activating a sulfatide-reactive, CD1d-restricted, type II natural killer T lymphocyte*. Eur J Immunol, 2012. **42**(11): p. 2851-60.
  140. Gumperz, J.E., et al., *Murine CD1d-restricted T cell recognition of cellular lipids*. Immunity, 2000. **12**(2): p. 211-21.
  141. Brigl, M. and M.B. Brenner, *CD1: antigen presentation and T cell function*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 817-90.
  142. 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*. J Exp Med, 2007. **204**(5): p. 1131-44.
  143. Pellicci, D.G., et al., *Differential recognition of CD1d-alpha-galactosyl ceramide by the V beta 8.2 and V beta 7 semi-invariant NKT T cell receptors*. Immunity, 2009. **31**(1): p. 47-59.
  144. Borg, N.A., et al., *CD1d-lipid-antigen recognition by the semi-invariant NKT T-cell receptor*. Nature, 2007. **448**(7149): p. 44-9.
  145. Rossjohn, J., et al., *Recognition of CD1d-restricted antigens by natural killer T cells*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(12): p. 845-57.
  146. López-Sagaseta, J., et al., *Lysophospholipid presentation by CD1d and recognition by a human Natural Killer T-cell receptor*. The EMBO journal, 2012. **31**(8): p. 2047-2059.
  147. Pellicci, D.G., et al., *Recognition of beta-linked self glycolipids mediated by natural killer T cell antigen receptors*. Nature immunology, 2011. **12**(9): p. 827-833.
  148. Mallevaey, T., et al., *A molecular basis for NKT cell recognition of CD1d-self-antigen*. Immunity, 2011. **34**(3): p. 315-26.
  149. Girardi, E., et al., *Type II natural killer T cells use features of both innate-like and conventional T cells to recognize sulfatide self antigens*. Nat Immunol, 2012. **13**(9): p. 851-6.
  150. Girardi, E. and D.M. Zajonc, *Molecular basis of lipid antigen presentation by CD1d and recognition by natural killer T cells*. Immunol Rev, 2012. **250**(1): p. 167-79.
  151. Zimmer, M.I., et al., *Polymorphisms in CD1d affect antigen presentation and the activation of CD1d-restricted T cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(6): p. 1909-1914.
  152. Almeida, C.F., et al., *Distinct CD1d docking strategies exhibited by diverse Type II NKT cell receptors*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 5242.
  153. Blomqvist, M., et al., *Multiple tissue-specific isoforms of sulfatide activate CD1d-restricted type II NKT cells*. Eur J Immunol, 2009. **39**(7): p. 1726-35.
  154. Kanamori, M., et al., *Sulfatide inhibits alpha-galactosylceramide presentation by dendritic cells*. Int Immunol, 2012. **24**(2): p. 129-36.

155. Brandl, C., et al., *B7-H1-deficiency enhances the potential of tolerogenic dendritic cells by activating CD1d-restricted type II NKT cells*. PLoS One, 2010. **5**(5): p. e10800.
156. Rhost, S., et al., *Immunomodulatory type II natural killer T lymphocytes in health and disease*. Scand J Immunol, 2012. **76**(3): p. 246-55.
157. Moon, H.B., et al., *Regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4 in mouse B cells*. Scand J Immunol, 1989. **30**(3): p. 355-61.
158. Buschard, K., et al., *Treatment with sulfatide or its precursor, galactosylceramide, prevents diabetes in NOD mice*. Autoimmunity, 2001. **34**(1): p. 9-17.
159. Defrance, T., et al., *Interleukin 13 is a B cell stimulating factor*. J Exp Med, 1994. **179**(1): p. 135-43.
160. Turqueti-Neves, A., et al., *The Extracellular Domains of IgG1 and T Cell-Derived IL-4/IL-13 Are Critical for the Polyclonal Memory IgE Response In Vivo*. PLoS Biol, 2015. **13**(11): p. e1002290.
161. Liao, C.M., M.I. Zimmer, and C.R. Wang, *The functions of type I and type II natural killer T cells in inflammatory bowel diseases*. Inflamm Bowel Dis, 2013. **19**(6): p. 1330-8.
162. Miossec, P., T. Korn, and V.K. Kuchroo, *Interleukin-17 and type 17 helper T cells*. N Engl J Med, 2009. **361**(9): p. 888-98.
163. Harrington, L.E., et al., *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
164. 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*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(32): p. 11287-92.
165. Langrish, C.L., et al., *IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation*. J Exp Med, 2005. **201**(2): p. 233-40.
166. Lubberts, E., et al., *Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(2): p. 650-9.
167. Schnyder-Candrian, S., et al., *Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma*. J Exp Med, 2006. **203**(12): p. 2715-25.
168. Otani, K., et al., *Anti-inflammatory effects of IL-17A on Helicobacter pylori-induced gastritis*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **382**(2): p. 252-8.
169. Ogawa, A., et al., *Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice*. Clin Immunol, 2004. **110**(1): p. 55-62.
170. O'Connor, W., Jr., et al., *A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation*. Nat Immunol, 2009. **10**(6): p. 603-9.
171. Lee, K.A., et al., *A distinct subset of natural killer T cells produces IL-17, contributing to airway infiltration of neutrophils but not to airway hyperreactivity*. Cell Immunol, 2008. **251**(1): p. 50-5.
172. Suematsu, S., et al., *IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(19): p. 7547-51.
173. Diehl, S. and M. Rincón, *The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation*. Mol Immunol, 2002. **39**(9): p. 531-6.
174. Dienz, O., et al., *The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4+ T cells*. J Exp Med, 2009. **206**(1): p. 69-78.
175. Korn, T., et al., *IL-17 and Th17 Cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 485-517.
176. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
177. Okada, M., et al., *IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells*. J Immunol, 1988. **141**(5): p. 1543-9.
178. Albutti, A., et al., *Type II NKT Cell Agonist, Sulfatide, Is an Effective Adjuvant for Oral Heat-Killed Cholera Vaccines*. Vaccines, 2021. **9**(6): p. 619.
179. Liu, Y., et al., *The Adjuvant of  $\alpha$ -Galactosylceramide Presented by Gold Nanoparticles Enhances Antitumor Immune Responses of MUC1 Antigen-Based Tumor Vaccines*. Int J Nanomedicine, 2021. **16**: p. 403-420.
180. Huang, Y., et al., *Enhancement of HIV DNA vaccine immunogenicity by the NKT cell ligand,  $\alpha$ -galactosylceramide*. Vaccine, 2008. **26**(15): p. 1807-16.
181. Artiaga, B.L., et al.,  *$\alpha$ -Galactosylceramide protects swine against influenza infection when administered as a vaccine adjuvant*. Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 23593.
182. Suzuki, S., et al., *Sublingual administration of liposomes enclosing  $\alpha$ -galactosylceramide as an effective adjuvant of allergen immunotherapy in a murine model of allergic rhinitis*. Allergol Int, 2019.

- 68**(3): p. 352-362.
183. Klaus, G.G., et al., *Activation of mouse complement by different classes of mouse antibody*. Immunology, 1979. **38**(4): p. 687-95.
  184. Kato, S., J.A. Berzofsky, and M. Terabe, *Possible Therapeutic Application of Targeting Type II Natural Killer T Cell-Mediated Suppression of Tumor Immunity*. Frontiers in Immunology, 2018. **9**.
  185. McCoy, K.D., et al., *Polyclonal and specific antibodies mediate protective immunity against enteric helminth infection*. Cell Host Microbe, 2008. **4**(4): p. 362-73.
  186. Wojciechowski, W., et al., *Cytokine-producing effector B cells regulate type 2 immunity to *H. polygyrus**. Immunity, 2009. **30**(3): p. 421-33.
  187. Neuberger, M.S. and K. Rajewsky, *Activation of mouse complement by monoclonal mouse antibodies*. Eur J Immunol, 1981. **11**(12): p. 1012-6.
  188. Nimmerjahn, F. and J.V. Ravetch, *Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding*. Science, 2005. **310**(5753): p. 1510-2.
  189. Hasbold, J., et al., *Integrating signals from IFN-gamma and IL-4 by B cells: positive and negative effects on CD40 ligand-induced proliferation, survival, and division-linked isotype switching to IgG1, IgE, and IgG2a*. J Immunol, 1999. **163**(8): p. 4175-81.
  190. Deenick, E.K., J. Hasbold, and P.D. Hodgkin, *Switching to IgG3, IgG2b, and IgA is division linked and independent, revealing a stochastic framework for describing differentiation*. J Immunol, 1999. **163**(9): p. 4707-14.
  191. Gavin, A.L., et al., *Identification of the mouse IgG3 receptor: implications for antibody effector function at the interface between innate and adaptive immunity*. J Immunol, 1998. **160**(1): p. 20-3.
  192. Tan, P.S., et al., *Unique monoclonal antibodies define expression of Fc gamma RI on macrophages and mast cell lines and demonstrate heterogeneity among subcutaneous and other dendritic cells*. J Immunol, 2003. **170**(5): p. 2549-56.
  193. Chow, D.A., *Natural Immune Activation: Stimulators/Receptors*, in *NeuroImmune Biology*, L. Bertók and D.A. Chow, Editors. 2005, Elsevier. p. 123-150.
  194. Deng, S., et al., *A peptide-free, liposome-based oligosaccharide vaccine, adjuvanted with a natural killer T cell antigen, generates robust antibody responses in vivo*. Chem Sci, 2014. **5**(4): p. 1437-1441.
  195. Wu, Z. and K. Liu, *Overview of vaccine adjuvants*. Medicine in Drug Discovery, 2021. **11**: p. 100103.