

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



Efecto de la activación tipo-TH1 y tipo-TH2 de células iNKT en
la Recombinación por cambio de clase de anticuerpos

ÁLVARO SANTIBÁÑEZ VARGAS

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Director de Tesis: Prof. Dr. Leandro Carreño Márquez

2023

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

**INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

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

ÁLVARO SANTIBÁÑEZ VARGAS

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 de de 2023.

Prof. Leandro Carreño Márquez
Director de Tesis
Dpto. Inmunología
Facultad de Medicina, Universidad de Chile

COMISION INFORMANTE DE TESIS

PROF. DR. MARCELO KOGAN

PROF. DR. ALEJANDRO ESCOBAR

PROF. DRA. MARIA ISABEL JUSEFF

PROF. DRA. FABIOLA OSORIO

Presidente Comisión de Examen

*Esta tesis va dedicada a:
Mi familia, mi amor, mis amig@s,
Y toda la gente linda en este camino...*

“porque el camino recto del amor, ya se guíe por sí mismo, ya sea guiado por otro, es comenzar por las bellezas inferiores y elevarse hasta la belleza suprema, pasando, por decirlo así, por todos los grados de la escala de un solo cuerpo bello a dos, de dos a todos los demás, de los bellos cuerpos a las bellas ocupaciones, de las bellas ocupaciones a las bellas ciencias, hasta que de ciencia en ciencia se llega a la ciencia por excelencia, que no es otra que la ciencia de lo bello mismo, y se concluye por conocerla tal como es en sí.”

Platón, El banquete

Agradecimientos

Quiero depositar en esta página el profundo agradecimiento que siento por cada persona que se cruzó conmigo en esta linda etapa de mi vida y a toda esa gente que me acompaña en el corazón. A mis padres, quienes con esfuerzo, dedicación y amor incondicional crearon una hermosa familia y nos dieron a mis hermanos y a mi la oportunidad de ser quienes queremos ser. A Fernanda, por darme su compañía, comprensión, alegría e inmenso amor.

Le agradezco a mis amigos de toda la vida de Graneros: Nico, Christian, Gonzalo; con quienes hemos crecido y pasado por tantas transformaciones y decisiones sin perder esa esencia que nos une. A mis bellas amistades que conocí cuando estudié bioquímica en la gloriosa USACH: Claudio, Claudia, Cata, Nicole y Maca. Aún mantenemos un gran cariño, comunicación y preocupación latentes. A mis amig@s que conocí en la Chile, en mi generación, durante el estallido social y la pandemia: muchas gracias por su tremenda motivación de querer hacer cambios y aportar en una realidad más ideal para tod@s.

Le quiero dedicar palabras de agradecimiento y admiración al equipo con quienes formamos el laboratorio del Dr. Leandro Carreño, porque en este espacio encontré gente cálida, auténtica y su valiosa amistad. Le agradezco a Richard, Caro, Cris, Pancho, Daniel, Enzo, Sami, David, Fabian, Romi, Vale y en especial a Pablo, quien fue mi partner con el que trabajé codo a codo, con quien discutimos resultados, me salvó, y tantas veces nos quedamos hasta la noche sacando adelante nuestros experimentos. Le agradezco a Leandro, mi tutor, por creer en mí, trabajar en mis aptitudes para ser un mejor profesional y siempre compartir de forma desinteresada su visión de la vida en cada momento que busqué una guía.

Gracias a mi comisión evaluadora: la Dra. Fabiola, Dra. Isabel, Dr. Alejandro y Dr. Marcelo por contribuir siempre de forma constructiva y positiva incentivando mi desarrollo como investigador. Agradecer a Cecy, la secretaria de mi programa de doctorado por su intensa labor, estar siempre ahí guiándonos y facilitándonos los procesos, por su cálida palabra.

Finalmente, le doy gracias a todo el equipo del programa de Inmunología, especialmente a Ruth, Nancy, Amarilis, Perry, Karen y Lab. MCM por apoyarme todas las veces que los necesité con mis experimentos y consultas ñoñas.

Financiamiento

Proyecto FONDECYT N° 1211959 Etapa 2022 Año 2, Instituto Milenio de Inmunología e Inmunoterapia (IMI) P09 / 016-F y beca ANID Doctorado Nacional/2018-21180465.

Santiago, 01 de junio de 2020
Certificado N°: **20372-MED-UCH**

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el Protocolo **CBA 1112 FMUCH**, del Proyecto de Investigación titulado: **“La recombinación por cambio de clase de los anticuerpos puede ser modulada por la activación diferencial de células NKT”**, del Investigador Responsable **Dr. Álvaro Santibáñez Vargas**, estudiante de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Programa de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, y cuyo Académico Patrocinante es el **Dr. Leandro Carreño Márquez**, Profesor Asociado, Programa de Inmunología, ICBM, Facultad Medicina, Universidad de Chile, no se plantean acciones 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. Los 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 un total de **172 ratones**, especie **Mus musculus**: **134** de la cepa C57BL/6 *wild type* que serán obtenidos del Bioterio Central, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, **30** de la cepa C57BL/6 CD1d *knock-out* que serán obtenidos del Bioterio de la Pontificia Universidad Católica de Chile y **8** de la cepa C57BL/6-Tg (TcraTcrb)110Mjb/J ó OT-1 que serán obtenidos del Bioterio de la Fundación Ciencia y Vida, desde junio de 2020 a octubre de 2021, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por **Proyecto FONDECYT Nro. 1160336**, **Proyecto ICGEB CRP-chl17-06-ec (hasta 2021)**, **Instituto Milenio en Inmunología e Inmunoterapia (IMII) P09/016-F**; **Beca CONICYT de Doctorado Nacional N°21180465 (hasta diciembre 2021)**.

El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 53 miembros: 5 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 relacionada 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 exigidas por el Comité.



Ronaldo Vargas Casanova
Director
CICUA - VID
Universidad de Chile



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

1 Índice

1	Índice.....	8
2	Abreviaciones.....	12
3	Resumen.....	13
4	Abstract.....	14
5	Resumen gráfico.....	15
6	Introducción.....	16
6.1	Linfocitos B, los anticuerpos y sus funciones efectoras.....	16
6.2	Ayuda T-dependiente y T-independiente a los linfocitos B.....	18
6.3	La CSR y su dependencia por las citoquinas.....	19
6.4	Linfocitos T: activación y subtipos de linfocitos TH.....	22
6.5	Células Natural Killer T invariantes y subtipos.....	24
6.6	Células iNKT y fenotipos inducidos por ligandos glicolípidicos.....	27
6.7	Liposomas como vehículo para la activación de linfocitos B.....	28
6.8	Consideraciones para el uso de liposomas en la modulación de la respuesta humoral... 30	
6.9	Uso de liposomas para modular la respuesta humoral a través de células iNKT.....	33
7	Hipótesis.....	36
8	Objetivos.....	36
9	Metodología.....	37
9.1	Ratones.....	37
9.2	Medios de cultivo.....	37
9.2.1	Medio de cultivo para BMDCs y células de bazo.....	37
9.2.2	Medio de cultivo para células iNKT.....	37
9.3	Inmunizaciones.....	38
9.4	Preparaciones liposomales.....	38
9.5	Cuantificación de fosfolípidos que componen los liposomas.....	39
9.6	Conjugación de Ovalbumina (OVA) en la superficie de los liposomas.....	40
9.7	Detección y cuantificación de OVA en la superficie de las preparaciones liposomales ...	41
9.8	Caracterización fisicoquímica de las preparaciones liposomales.....	42
9.8.1	Determinación del tamaño mediante Nanotracking Analysis (NTA).	42

9.8.2	Determinación del potencial Z e Índice de Polidispersidad (Pdl) mediante Dispersión Dinámica de Luz (DLS).	42
9.8.3	Determinación de la morfología mediante Microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM).	43
9.9	Evaluación de la bioactividad dada por las preparaciones liposomales <i>in vitro</i>	43
9.9.1	Activación de linfocitos B <i>in vitro</i> mediante la co-incubación con hibridomas de células iNKT.	43
9.9.2	Activación de linfocitos T OVA-específicos a partir de ratones OT-1 con las preparaciones liposomales.	43
9.9.3	Activación de células iNKT mediante DCs pulsadas con mLPs.	44
9.10	Colección de sueros a partir de ratones inmunizados	46
9.11	Procesamiento del bazo para la detección de poblaciones celulares.....	46
9.12	Obtención de médula ósea para la generación de BMDCs y ensayos de ELISPOT	46
9.13	Evaluación de la bioactividad dada por las preparaciones liposomales <i>in vivo</i>	47
9.13.1	Expansión de células iNKT.	47
9.13.2	Detección de linfocitos B que hacen cambio de clase mediante citometría de flujo. 48	
9.13.3	Identificación de linfocitos B de Centro Germinal (GC B) y linfocitos T helper foliculares (TFH) mediante citometría de flujo.	49
9.14	Ensayos de memoria y seguimiento de los isotipos en circulación.	49
9.14.1	Estrategia experimental.	49
9.14.2	Determinación de los títulos de anticuerpo OVA-específicos mediante ELISA.....	50
9.14.3	Valores de Avidéz Relativa (RAV) de los anticuerpos anti-OVA mediante ELISA por desplazamiento con NH ₄ SCN.	50
9.14.4	Detección de linfocitos B de memoria (B _{mem}) y células plasmáticas de larga vida. ..	51
9.14.5	Detección de Células Secretoras de Anticuerpos (ASCs) antígeno específicas mediante ELISPOT.	51
9.15	Cuantificación de los transcritos germinales (GLTs, Germ-line transcripts) mediante qRT-PCR	52
9.15.1	Extracción de RNA:	52
9.15.2	Síntesis de cDNA:.....	52
9.15.3	qPCR:	53
10	Resultados	54
10.1	Las preparaciones liposomales contienen ligandos de célula iNKT y Ovalbumina (OVA) anclada en su superficie.....	54
10.2	Los LP/OVA pueden ser presentados por DCs y linfocitos B a través de CD1d <i>in vitro</i>	55

10.3	Los LP/OVA/ligando promueven distinta expansión de células iNKT dependiendo del ligando en los primeros días, pudiendo generar células secretoras de IFN γ e IL-4.	59
10.4	La administración de LP/OVA con AH10-7 y OCH promueven la producción preferencial de IgG2c e IgG2b, respectivamente, a tiempos tempranos.	61
10.5	La activación de células iNKT por AH10-7 y α GC generan niveles sostenidos de IgG2c, y la activación por OCH prolonga transitoriamente los niveles de IgG2b.	63
10.6	Un refuerzo con LP/OVA/AH10-7 incrementa más la maduración de afinidad de los anticuerpos que los otros ligandos	63
10.7	La activación de células iNKT por LP/OVA con AH10-7 induce tempranamente la transcripción de AID y una mayor expansión de linfocitos TFH.	65
10.8	La activación de células iNKT por AH10-7 y OCH promueven la mayor expansión de linfocitos B que cambia de clase hacia IgG2b o IgG2b, respectivamente.	67
10.9	La activación de células iNKT por LPs con α GC y AH10-7 promueven el mayor porcentaje de linfocitos B _{mem} OVA-específicos y Células Secretoras de Anticuerpos (ASCs).	68
10.10	La activación de células iNKT por LP/OVA con AH10-7 induce tempranamente transcritos de <i>switch</i> , AID y una mayor expansión de linfocitos TFH.	72
11	Discusión	76
12	Conclusiones.	86
13	Referencias.	91

Índice de tablas

Tabla 1. Receptores inhibitorios y activadores IgG murinos.	17
Tabla 2. Efecto de las citoquinas en el cambio de clase de los linfocitos B.	21
Tabla 3. <i>Distintos subtipos de linfocito TH son producidos por las señales de las APC.</i> ...	23
Tabla 4. Características principales de los subtipos de célula iNKT descritos..	26
Tabla 5. Composición de las preparaciones liposomales.....	40
Tabla 6. Grupos experimentales evaluados en este trabajo.....	48
Tabla 7. Secuencias de partidores utilizada para la amplificación de los distintos transcritos de línea germinal (GLT) que codifican para cada isotipo.....	53

Índice de figuras

Figura 1. Posiciones genómicas de las regiones constantes que codifican para IgG, IgA, IgE de humano, ratón C57BL/6 y BALB/c.	16
Figura 2. Interacción entre linfocitos TH y linfocitos B.....	20
Figura 3. Isotipos producidos por la activación de linfocitos B murinos.	21
Figura 4. Activación de linfocitos B mediante liposomas que contienen glicolípidos y proteínas ancladas.....	33
Figura 5. Modelo propuesto para la modulación de la CSR mediante células iNKT.....	35
Figura 6. Esquema experimental utilizado en este trabajo.....	49
Figura 7. Propiedades fisicoquímicas de los LP/OVA/ligando..	56
Figura 8. Evaluación de la bioactividad de los LPs in vitro.....	58
Figura 9. Detección de células iNKT y linfocitos Th productores de IFN γ e IL-4 obtenidos por los LP/OVA/ligando al día 3 post inmunización.	60
Figura 10. Niveles de anticuerpos anti-OVA circulantes producidos por la administración de los LP/OVA/ligandos al día 7.	62
Figura 11. Niveles de anticuerpos anti-OVA circulantes producidos por los LP/OVA/ligandos durante 60 días por ratones C57BL/6 nativos y Knock-out para CD1d. 64	
Figura 12. Maduración de afinidad de los anticuerpos anti-OVA IgG1 e IgG2c generados por la administración de los LP/OVA/ligandos, 14- and 28-días post inmunización.	66
Figura 13. Respuesta de Centro Germinal producida por los LP/OVA/ligandos al día 7. ..	69
Figura 14. Detección de linfocitos sw-B obtenidos por la administración de LP/OVA/ligandos 7 días post inmunización..	70
Figura 15. Identificación de linfocitos Bmem OVA-específicos que cambiaron de clase en bazo.....	73
Figura 16. Identificación de ASCs productoras de IgG1 e IgG2c en médula ósea..	74
Figura 17. Transcritos de línea germinal (GLT) detectados después de inmunizar con LP/OVA/ligandos al día 3 y al día 7.....	75

2 Abreviaciones

LP: liposomas

LP/OVA: liposomas con OVA anclada en superficie

LP/OVA/ligando: liposomas con OVA anclada en superficie y glicolípido embebido en la membrana

a-GalCer: alfa-Galactosil ceramida.

DC: Célula Dendrítica

Sw- B: linfocito B que cambió de clase (*switched-B*)

Bmem: linfocito B de memoria

Sw-Bmem: linfocito B de memoria que cambió de clase

FDC: Célula Dendrítica Folicular

TFH: Linfocito T *Helper* Folicular

GC: Centro Germinal

GC B: Linfocito B de Centro Germinal

iNKT: Natural Killer T cell invariante

IL-4: Interleuquina 4

IFN γ : Interferon gamma

BCR: Receptor de Linfocito B

AID: Desaminasa Inducida por Activación

TLR: Receptor tipo-Toll

RAV: Valor de Avidéz Relativa

Ig: Inmunoglobulina

ASC: Célula Secretora de Anticuerpos (Antibody-Secreting Cell)

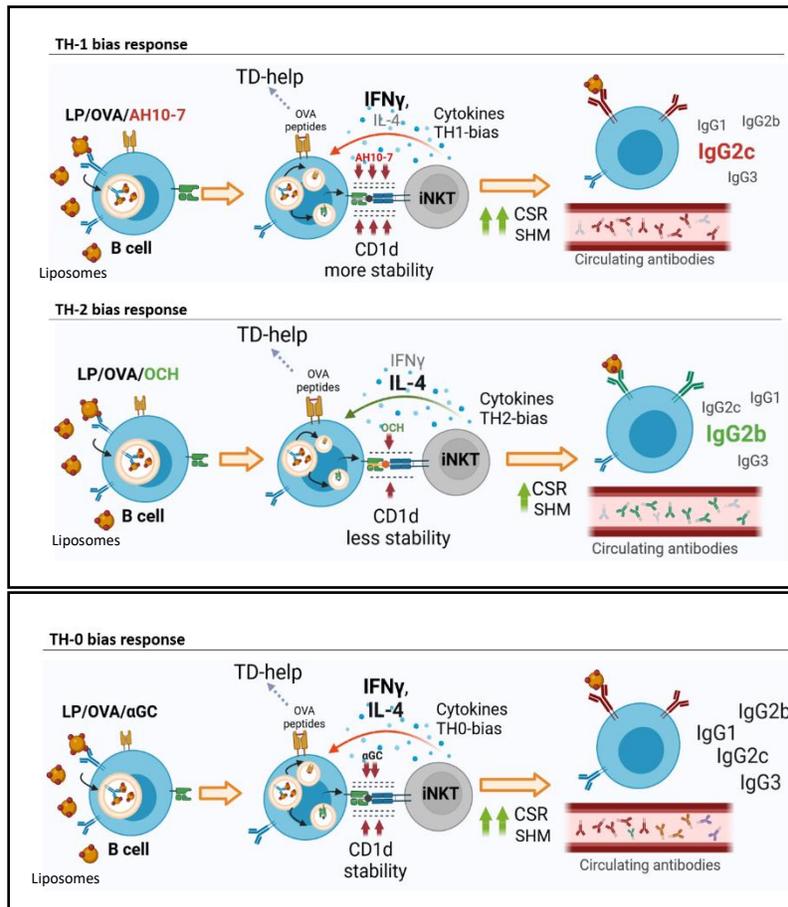
3 Resumen

La recombinación por cambio de clase de los anticuerpos (CSR) es un proceso molecular que requiere de la estricta interacción entre los linfocitos B participantes y linfocitos T helpers (T_H). La activación de los linfocitos T_H producirá la liberación de distintas citoquinas que definirán el isotipo generado por el linfocito B. Se ha descrito que las células Natural Killer T invariantes (iNKT) también puede participar en la activación de los linfocitos B mediante glicolípidos. Cuando las células iNKT reconocen α -Galactosilceramida (α GC), su ligando activador por excelencia, generan una potente producción de diversas citoquinas lo que significa una contribución ambigua en los isotipos que se generarán. Se desconoce cómo el uso de ligandos análogos de α GC capaces de inducir un perfil tipo- $TH1$ como tipo- $TH2$ de citoquinas, puede impactar en la CSR de los anticuerpos. En este trabajo se propone que la activación diferencial de células iNKT mediante liposomas que contienen glicolípidos con perfiles de activación tipo- $TH1$ o tipo- $TH2$ promueven la CSR a IgG2c o IgG1, respectivamente. Los liposomas que contienen el ligando tipo- $TH1$ AH10-7 y el antígeno modelo de linfocito B Ovalbumina (OVA) (LP/OVA/AH10-7), generó los mayores niveles de IgG2c e IgG3 séricos en relación con tratamiento sin glicolípido 7 días post inmunización. Los liposomas que contiene OVA y el glicolípido tipo- $TH2$ OCH (LP/OVA/OCH), indujeron los menores niveles de estos mismos isotipos, sin embargo, fue la preparación que generó los mayores niveles de IgG2b, otro isotipo involucrado en una activación tipo- $TH1$. LP/OVA/AH10-7 fue también el tratamiento que indujo el mayor porcentaje linfocitos T_H foliculares (T_{FH}) indicando que, junto al aumento en la población de linfocitos B $IgM^+ IgD^-$, habría un aumento en la formación de los centros germinales. Esto se correlaciona con un aumento en la avidéz relativa de los anticuerpos, con el número de linfocitos B de memoria (B_{mem}) en bazo y médula ósea, y número de células secretoras de anticuerpos (ASCs) IgG OVA-específicos. Estos datos en conjunto indican que esta ayuda de las células iNKT mediada por AH10-7 podría establecer con mayor eficiencia una población de linfocitos B de memoria y células plasmáticas de larga vida con anticuerpos de mayor afinidad. Estos antecedentes indican que las células iNKT tienen la capacidad de modular la cinética y magnitud del switch de clase hacia los distintos isotipos dependiendo del ligando activador. Importantemente, las citoquinas producidas por activación tipo $TH-1$ o tipo $TH-2$ de las células iNKT no tendría directa correlación con los isotipos que se generan de forma prevalente, como lo observado en una activación convencional por linfocitos $TH1$ o $TH2$. AH10-7 se presenta como un potente modulador de la CSR hacia los isotipos IgG2c, IgG3 y OCH hacia el isotipo IgG2b.

4 Abstract

Class-Switch Recombination (CSR) is a molecular process that requires the interaction between B cells and T helper (T_H) cells. The activation of T_H cells will produce the cytokine delivery of distinct cytokines that will define the isotype generated by B cells. It has been described that invariant Natural Killer T cells (iNKT) also may participate in the activation of B cells through glycolipids. When iNKT cells recognize α -Galactosylceramide (α GC), its activator ligand par excellence, to generate a strong production of diverse cytokines, that mean, an ambiguous contribution in the isotypes that will be generated. It is unknown how the use of α GC-analogs able to induce a TH1-bias as well as TH2-bias cytokine profile, can impact on the CSR of antibodies. On this work is proposed that differential activation of iNKT through liposomes that contain glycolipid with th1-bias or th2-bias will promote the CSR to IgG2c or IgG1, respectively. The liposomes that contain the Th1-bias ligand AH10-7 and Ovalbumin (OVA), an antigen model of B cell (LP/OVA/AH10-7), generated the higher levels of circulating IgG2c and IgG3 in comparison with the treatment without ligands 7 days post immunization. The liposomes that contain OVA and the Th2-bias ligand OCH (LP/OVA/OCH) induced the lower levels of these same isotypes, however, it was the preparation that generated the higher IgG2b levels, another isotype involved in the Th1-bias activation. LP/OVA/AH10-7 was, also, the treatment that induced the higher percentage of T follicular helper (T_{FH}) cells indicating that, joint to the rise in the B cell IgM⁺ IgD⁺ population, would be an increase in the germinal centers formation. This is correlated with an increase of relative avidity of antibodies, with the number of splenic and bone marrow memory B cells (B_{mem}), and the number of OVA-specific Antibody Secreting Cells (ASCs). These data together to indicate that this help given by iNKT cells through AH10-7 would establish with a greater efficacy a B_{mem} population and long-lived plasma cells with antibodies with higher affinity. These antecedents to indicate that iNKT cells have the ability to modulate the kinetic and switch magnitude towards distinct isotypes depending on the activator ligand. Importantly, the cytokines involved in a Th1-bias or Th2-bias activation of iNKT cells are not directly correlated with the isotypes that are generated in a prevalent manner, how is observed in a conventional activation by TH1 or TH2 cells. AH10-7 is presented as a potent modulator of CSR toward IgG2c and IgG3 isotypes, and OCH slightly towards the IgG2b isotype.

5 Resumen gráfico



En Breve

La recombinación por cambio de clase (CSR) es un proceso molecular dependiente de las citoquinas presentes en la proximidad de los linfocitos B. Existen escasos antecedentes que describen el rol de las células iNKT en este proceso y cómo la liberación de citoquinas producida por su activación con distintos análogos de α GC presentados por CD1d puede influir en la magnitud con que cada isotipo de anticuerpo es producido.

En este trabajo demostramos que la administración del ligando AH10-7 favorece la producción de IgG2c, la formación de centros germinales y maduración de afinidad de los anticuerpos. El ligando OCH, por su lado, incrementa notablemente la producción de IgG2b a pesar de inducir una baja expansión de células iNKT.

Destacados

- La entrega de AH10-7 mediante liposomas favorece la CSR de los anticuerpos hacia el isotipo IgG2c
- La entrega de AH10-7 mediante liposomas induce una alta expansión de células iNKT junto a un aumento en la magnitud y maduración de afinidad de los anticuerpos.
- La administración de OCH en liposomas induce una activación moderada de células iNKT que favorece la CSR hacia el isotipo IgG2b.
- La activación de células iNKT por glicolípidos potencia la respuesta de centro germinal, favoreciendo la formación de linfocitos B de memoria que cambian de clase.

6 Introducción

6.1 Linfocitos B, los anticuerpos y sus funciones efectoras

Los linfocitos B son las células del sistema inmune adaptativo encargadas de producir y secretar distintos tipos de anticuerpos frente a una infección; esto con el fin de “marcar” a los agentes extraños y hacerlos visible al sistema del complemento o a otras células fagocíticas del sistema inmune. Los anticuerpos son moléculas conformadas por una fracción variable (Fv) y una fracción constante (Fc). La Fv es la encargada de unirse con especificidad a los antígenos estructurales exógenos, y la Fc será la región reconocida por los receptores Fc (FcR) presentes en las células inmunes reclutadas. La región Fc, -constituida únicamente por las cadenas pesadas (igH) de un anticuerpo-, definen el tipo de anticuerpo o isotipo, es decir, si será traducido a Inmunoglobulina M (IgM), IgG, IgA o IgE, sin afectar la especificidad antigénica. IgM es liberado en una respuesta primaria, uniéndose en la forma de pentámeros a su blanco y activando el complemento. Los subtipos de IgG se liberan en una respuesta secundaria y son los principales encargados de eliminar a los patógenos. El isotipo IgA participa en el reconocimiento y eliminación de patógenos relacionados a los tejidos linfoides asociados a mucosa; e IgE es el isotipo que participa en las respuestas de alergia y en el control de helmintos o parásitos. En el ratón hay ocho isotipos en la cadena pesada (C μ , C δ , C γ 3, C γ 1, C γ 2b, C γ 2a, C ϵ , y C α) (Stavnezer & Shrader., 2014) y nueve en humanos (C μ , C δ , C γ 3, C γ 1, C α 1, C γ 2, C γ 4, C ϵ y C α 2) (Xu & cols., 2012) (**Figura 1**).

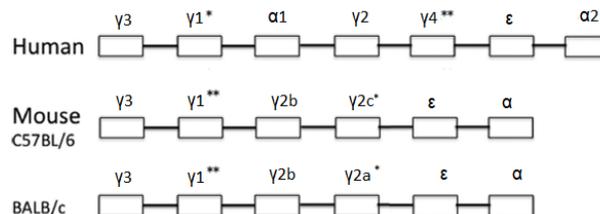


Figura 1. Posiciones genómicas de las regiones constantes que codifican para IgG, IgA, IgE de humano, ratón C57BL/6 y BALB/c. Se indican los cuatro subtipos de IgG humanos (γ 1, γ 2, γ 3 y γ 4) y murinos (γ 1, γ 2b, γ 2c/ γ 2a y γ 3). * Subclases que mejor se unen a los Fc γ R activadores. ** Subclases que se unen al FC γ R inhibitorio. Notablemente, IgG2c y igG2a son análogos en C57BL/6 y BALB/c respectivamente. Las regiones constantes que codifican para IgM e IgD no son mostrados, pero se encuentran 5' rio arriba de γ 3 (modificado de Collins., 2016).

La unión del anticuerpo a su blanco permitirá el reclutamiento de distintas células al sitio del reconocimiento dependiendo de su isotipo. En el caso de IgG, la región Fc de este anticuerpo será reconocido por receptores Fc específicos de IgG (FcγR) presentes en macrófagos para potenciar su actividad fagocítica (Lu & cols., 2018). Hay cuatro clases de FcγR activadores y un FcγR inhibitorio en células efectoras inmunes murinas y humanas (Bruhns., 2012; Nimmerjahn & Ravetch., 2006). También hay receptores para otros isotipos, como el receptor de IgE de alta afinidad (FcεRI) (Prussin & Metcalfe., 2006) que gatillan la respuesta contra alérgenos. Los receptores Fc median varias respuestas celulares, como fagocitosis por macrófagos y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) por Natural Killer (NK) y desgranulación de mastocitos (Baudino & cols, 2008).

En modelos murinos, hay cuatro subtipos de IgG (IgG1, IgG2c, IgG2b, IgG3), y son reconocidos con distinta afinidad por los distintos FcγR. IgG2c e IgG2b fijan el complemento y se unen a todos los receptores activadores FcγR (baja, intermedia y alta afinidad) (Collins & cols., 2015). IgG3 no fija el complemento y se postula que puede polimerizar a través de su región constante, aumentando la fagocitosis a través de receptores distintos a los FcγR (Harmer & Chahwan, 2016; Saylor & cols., 2010). IgG1, que no fija el complemento, presenta mejor afinidad por el receptor inhibitorio FcγRIIb que los receptores activadores (Nimmerjahn & cols., 2005) (**Tabla 1**). Por lo tanto, el tipo de anticuerpo producido y que predomine definirá cuáles células serán reclutadas en el sitio del reconocimiento para dar resolución.

Tabla 1. Receptores inhibitorios y activadores IgG murinos. * Las subclases son enlistadas en el orden en que estos se encuentran en el genoma, de 5' (IgG3) a 3'. A/I: es la relación calculada de la afinidad de unión más alta de cada subclase para un receptor activador (A), y de la afinidad de unión de las subclases para los receptores inhibitorios (I). Modificado de Collins., 2016.

	<i>Complement fixation</i>	<i>Activating FcγR binding</i>	<i>Inhibitory FcγRIIb binding</i>	<i>A/I ratio</i>	<i>Relative affinity</i>
IgG3*	++	-	-	-	+
IgG1	-	+	++	0.1	++
IgG2b	++	+++	++	7	+
IgG2a/c	++	+++	+	69	+

6.2 Ayuda T-dependiente y T-independiente a los linfocitos B

Para obtener una respuesta prolongada y con anticuerpos de alta afinidad, los linfocitos B deben pasar por un proceso de expansión y selección que requiere de la estricta interacción, por medio de MHC-II, con los linfocitos T *helpers* (T_H) y T *helpers* foliculares (T_{FH}) en una ayuda conocida como T-dependiente (TD) (**Figura 2**) (Vinuesa & Chang, 2013).

Por otro lado, los linfocitos B también pueden activarse en ausencia de linfocitos T en una a ayuda llamada T independiente (TI), que puede provenir por tres vías: la activación por receptores tipo Toll (TLRs) (TI-1); por entrecruzamiento de BCRs con antígenos multivalentes como polisacáridos (TI-2); o con ayuda dependiente de células mieloides, como neutrófilos, por medio de BAFF, APRIL y material genético microbiano (TI-3) (Vinuesa & Chang, 2013).

La ayuda TI-1 es dada por lipopolisacáridos (LPS), ADN CpG microbiano, lipopéptidos y RNA viral que inician la señalización en linfocitos B mediante TLRs. Estos antígenos proporcionan una señal, que por sí sola o al estar junto a la activación del BCR, promueven una respuesta de anticuerpos (Minguet & cols., 2008). Una característica de la respuesta TI-1 es que es más rápida que la TD, lo que permite eliminar rápidamente infecciones transmitidas por sangre.

La ayuda TI-2 es entregada por antígenos multivalentes, como polisacáridos bacterianos y cápsides virales, que hacen entrecruzamiento de BCRs y liberan una señalización prolongada al linfocito B mediante la tirosina kinasa de Bruton (Btk, *Bruton's tyrosine kinase*) (Mond & cols., 1995). Estos antígenos inician potentes respuestas de anticuerpos extrafoliculares sin formar memoria.

La ayuda TI-3 proviene de células mieloides y utilizan moléculas coestimuladoras distintas que en la ayuda TD. Se ha descrito que neutrófilos presentes en el bazo contienen material genético microbiano con el que interacciona con linfocitos B de zona marginal induciendo su diferenciación a células plasmáticas. Esta ayuda TI-3 requiere del Factor activador de linfocitos B (BAFF), el ligando inductor de

proliferación APRIL, IL-21 y CD40L, que en conjunto inducen el cambio de clase de los anticuerpos (Puga & cols., 2011)

La activación de los linfocitos B puede ocurrir principalmente en dos regiones de los órganos linfoides secundarios. La primera es en la zona extrafolicular, donde puede recibir ayuda TD o por la presencia de antígenos TI, lo que dará como producto células plasmáticas de vida corta (Nera & cols., 2015). La segunda zona es dentro de los folículos, y es el lugar donde la ayuda TD promoverá la generación de Centros Germinales (CGs), nicho donde se seleccionarán los linfocitos B con mejor afinidad por su antígeno y, finalmente, se diferenciarán a células plasmáticas de larga vida y linfocitos B de memoria (Stebegg & cols., 2018).

La ayuda TD dada por los linfocitos T CD4⁺, - ya activados por células dendríticas (DCs)- a los linfocitos B específicos de antígeno ocurre tempranamente en la zona extrafolicular como en el borde que limita la zona T y B de los folículos. Esta interacción inicial promoverá, antes de la formación de Centros Germinales, la Recombinación por Cambio de Clase (CSR) de los anticuerpos (Roco & cols., 2019; Liu & cols., 1996). La CSR es un proceso molecular que define las propiedades efectoras del anticuerpo sin alterar su especificidad antigénica (Stavnezer & cols., 2014) y que es cuantificable ya desde el tercer día después de la activación del linfocito B (Pape & cols., 2003; Chan & cols., 2009).

6.3 La CSR y su dependencia por las citoquinas

La CSR es un fenómeno altamente regulado que requiere de estímulos primarios y secundarios para que ocurra. Los estímulos primarios de una ayuda TI clásicamente están dados por patrones moleculares, como LPS y polisacáridos, presentes en la superficie de patógenos; y los primarios de una ayuda TD están dados por moléculas co-estimuladoras como CD40L (**Figura 2**). Los estímulos primarios inducen la transcripción de importantes enzimas en la CSR como la Desaminasa de citidinas inducida por activación (AID, por sus siglas en inglés) (Xu & cols., 2012). Los estímulos secundarios provienen principalmente de la ayuda TD, y están dados

por las citoquinas liberadas en el microambiente, que ayudarán a definir cual isotipo producirá finalmente el linfocito B (**Figura 2**) (Xu & cols., 2012; Adler & cols., 2017).

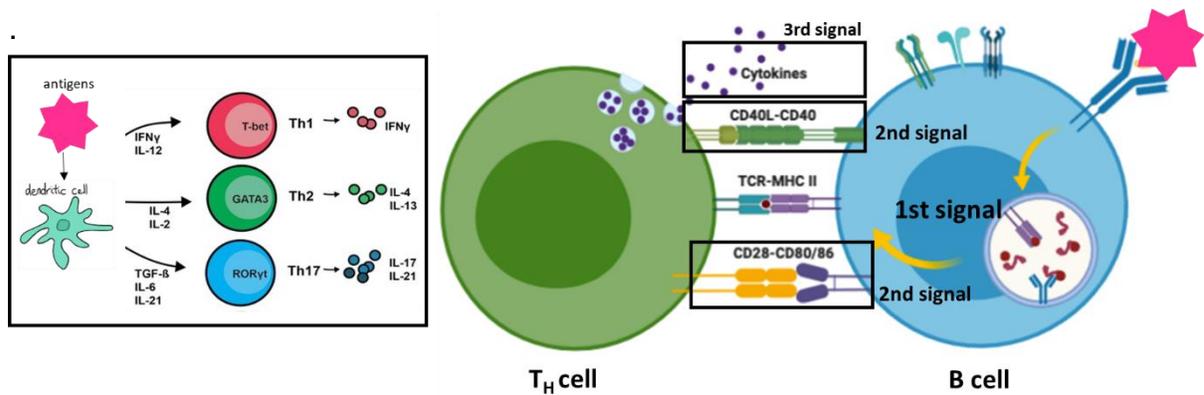


Figura 2. Interacción entre linfocitos TH y linfocitos B. Cuando las DCs captan un antígeno exógeno, este lo llevan a la zona T de los linfonodos más cercanos, donde pueden inducir la formación y migración de distintos subtipos de linfocitos T_H (T_{H1} , T_{H2} , T_{H17}) al borde de los folículos. En paralelo, antígenos estructurales son entregados a linfocitos B vírgenes, lo que promoverá también su migración al borde de los folículos. Este primer encuentro entre ambas células promoverá que el linfocito B le presente su antígeno mediante MHC-II al linfocito T_H (Primera señal), se asocien las moléculas coestimuladoras entre ambas células (Segunda señal) y las citoquinas liberadas por los linfocitos T_H sean captados por sus receptores en la superficie del linfocito B (Tercera señal). Estas señales darán paso a la Recombinación por Cambio de Clase (CSR) de los anticuerpos en los linfocitos B.

Esto se evidenció por primera vez cuando observaron que al incubar linfocitos B murinos *in vitro* con un agonista de TLR (estímulo primario), y además una citoquina (estímulo secundario), era posible obtener distintos isotipos en el sobrenadante dependiendo de la citoquina que se agregaba en el cultivo. Así, cuando el agonista de TLR es incubado en conjunto a IL-4, la CSR produce IgG1; cuando el agonista de TLR es acompañado de IFN γ se favorece la producción de IgG2a, y en la presencia de TGF β se induce IgA o IgG2b (Deenick & cols., 1999; Stavnezer & cols., 2014) (**Tabla 2**).

Tabla 2. Efecto de las citoquinas en el cambio de clase de los linfocitos B.

Citoquina	Isotipo inhibido	isotipo promovido	Ig producida
IL-4	C γ 2a	C γ 1, C ϵ	IgG1, IgE
IFN γ	C γ 1, C ϵ , C α	C γ 2c, C γ 3, C γ 2a*	IgG2c, IgG3, IgG2a
TGF- β	C ϵ	C γ 2b, C α	IgG2b, IgA

Esta relación entre los isotipos y las citoquinas se debe a que el locus IgH presente en el genoma de los linfocitos B contiene sitios de unión para factores de transcripción que son inducidos por la unión de diferentes citoquinas en su superficie. Estas señales en la superficie de la célula permiten que la cromatina del locus IgH este más accesible, favoreciendo la iniciación de la transcripción de pequeñas secuencias nucleotídicas conocidas como transcritos de *switch* o transcritos de línea germinal (GLT). En la nomenclatura de los GLTs: C μ , C γ 3, C γ 1, C γ 2c, C γ 2b, C ϵ y C α corresponden a IgM, IgG3, IgG1, IgG2c, IgG2b, IgE e IgA, respectivamente (**Tabla 2**). En ratones, las citoquinas (particularmente TGF β , IL-4 and IFN γ) pueden promover o inhibir la iniciación de la transcripción de los GLTs.

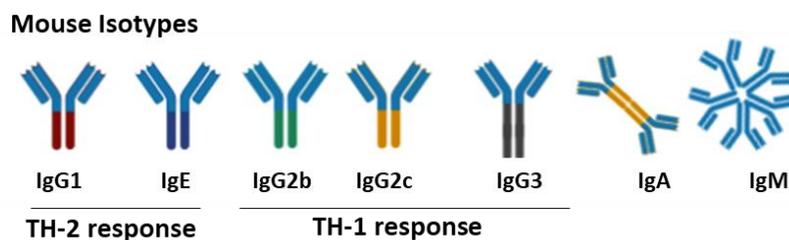


Figura 3. Isotipos producidos por la activación de linfocitos B murinos. Los linfocitos B, dependiendo de las citoquinas y del órgano linfoide donde se encuentran, pueden producir distintos tipos de anticuerpos. Al ser activados, producen inicialmente una rápida producción de IgM para opsonizar y activar el complemento. Los isotipos IgG1 e IgE son principalmente inducidos por linfocitos T_{H2} y citoquinas como IL-4 para responder contra helmintos o alérgenos, respectivamente. Por otro lado, los isotipos IgG2b, IgG2c e IgG3 son promovidos principalmente por linfocitos T_{H1} y la producción de IFN γ para favorecer la fagocitosis. El isotipo IgA se encuentra mayormente restringido a una respuesta humoral de mucosa respiratoria e intestinal en ayuda de TGF β para regular la microbiota y patógenos intestinales.

Cuando los linfocitos B son activados por una ayuda TD, los estímulos primarios y secundarios actúan en conjunto. Los factores de transcripción dependientes de citoquinas actúan como *enhancers* río arriba del promotor de AID, una enzima inducida basalmente por los estímulos primarios, que se encarga de introducir, en ayuda de los transcritos de *switch*, deleciones específicas en el locus IgH. Estas deleciones llevan al quiebre del genoma en dos regiones de la doble hebra, la eliminación del material intracromosomal involucrado y, finalmente, la reparación del locus para dar paso a la formación de los nuevos isotipos (Park., 2012; Wesley & cols., 2011). De esta forma, la ayuda dada por los linfocitos T entrega todas las señales necesarias para que el linfocito B produzca los distintos tipos de anticuerpos que participarán de la respuesta (**Figura 3**).

6.4 Linfocitos T: activación y subtipos de linfocitos TH

Cuando los linfocitos T maduros reconocen un antígeno presentado en el contexto MHC-II, estos se activan y diferencian a linfocitos T_H. Dentro de los linfocitos T_H, hay varios subtipos (T_{H1}, T_{H2}, T_{H17}, T_{reg}, T_{FH}, etc.) que se caracterizan por tener distintos programas transcripcionales y producir diferentes tipos de citoquinas dependiendo de las señales que reciba de la DC para su activación (**Tabla 3**). El subtipo que interacciona en mayor medida con los linfocitos B son los linfocitos T helper foliculares (T_{FH}), ya que estos promueven la formación de linfocitos B de memoria y células plasmáticas de larga vida.

Tabla 3. Distintos subtipos de linfocito TH son producidos por las señales de las APC.

Los distintos subtipos de T_H son inducidos por las moléculas co-estimuladoras de las APCs como de las citoquinas que estas liberan. Los linfocitos T_{H1} son inducidos por IL-12 e IL-18, su factor de transcripción maestro es T-bet y producen principalmente IFN γ , TNF- α e IL-2; Los linfocitos T_{H2} son inducidos por IL-4, su regulador maestro es GATA-3 y producen principalmente IL-4, IL5 e IL-13; los linfocitos T_{H17} son inducidos por TGF- β e IL-6, su factor de transcripción es ROR γ T y producen IL-17, IL-21 e IL-22; los linfocitos T_{reg} son inducidos por TGF- β , su factor regulador maestro es FoxP3 y producen IL-10 y TGF- β ; los linfocitos T_{FH} son inducidos por IL-21 e IL-4, su factor de transcripción maestro es Bcl-6 y producen IL-21 e IL-10 (Wan, 2010; Corripio-Miyar & cols., 2022; Gracie & cols., 1996; Hai & cols., 2016).

Subtipo	Inductor	Fact. Transc.	Citoquinas
T _{H1}	IL-12, IL-18	T-bet	IFN γ , TNF α , IL-2
T _{H2}	IL-4	GATA-3	IL-4, IL-5, IL-13
T _{H17}	TGF- β , IL-6	ROR γ T	IL-17, IL-21, IL-22
T _{FH}	IL-21 e IL-4	Bcl-6	IL-21, IFN γ , IL-4
T _{reg}	TGF- β	FoxP3	IL-10, TGF- β

Las citoquinas producidas por los linfocitos T_H influirán en el tipo de activación que tendrán otros linfocitos o células inmunes con los que interacciona demostrando su función de célula colaboradora (Luckheeram & cols., 2012). Los linfocitos T_H participan sustancialmente en la CSR a través de los estímulos secundarios que les entregan a los linfocitos B fuera y dentro de los folículos y poseen el potencial de convertirse en T_{FH}. Se ha correlacionado un mayor porcentaje de *switch* de clase hacia IgG1 con un mayor número de linfocitos T_H productores de IL-4 (Reinhardt & cols., 2009; Gaya & cols., 2018). De la misma forma, un mayor número de transcritos de IgG2c se ha vinculado con la aparición de linfocitos T IFN γ ⁺ (Reinhardt & cols., 2009; lee & cols., 2019), pero no necesariamente con la expresión de T-bet, el factor de transcripción Th1 (Gerth & cols., 2003). Así, los linfocitos T_H tienen la habilidad intrínseca de modular la CSR a través de las citoquinas, como potenciar la activación de los linfocitos B.

6.5 Células Natural Killer T invariantes y subtipos

Hay un tipo de linfocito T no convencional de la inmunidad innata que puede ayudar a los linfocitos B, conocido Natural Killer T invariantes (iNKT) (Vinueza & Chang., 2013). Estas células representan el 1-2% de los linfocitos T en el bazo de modelos murinos y el 0.1-0.2% de células T en la sangre periférica de humanos (Crosby & Kronenberg, 2018). Al ser activadas, estas células secretan rápidamente grandes cantidades de citoquinas por la transcripción constitutiva de su mRNA (Stetson & cols, 2003), además de poseer moléculas co-estimuladoras (CD40L, CD28, ICOS) que potencian la función de otras.

La activación de las iNKT promueve su expansión y función efectora dentro de las primeras 72 h y luego se contrae dentro de 7 días (Wilson & cols., 2003). En este período, las iNKT pueden promover la actividad citotóxica de células Natural Killer (NK), como la activación de linfocitos T por medio del licenciamiento DCs (Shissler & Webb., 2019; Hayakawa & cols., 2001). Importantemente, cuando estas células son activadas pueden adquirir un fenotipo helper folicular, denominado iNKT_{FH}, que interacciona con los linfocitos B mediante las moléculas co-estimuladoras CD28, necesaria para expresar el factor de transcripción Bcl6, CD40 requerido para la CSR, y la liberación de IL-4 e IL-21 para la inducción de centros germinales (Chang & cols., 2011). De esta forma, dependiendo de la señal de activación, los linfocitos B pueden recibir ayuda innata de las iNKT al presentarle glicolípidos o pueden recibir una ayuda más adaptativa, licenciando DCs y activando células Th. La capacidad de apoyar con estímulos primarios y secundarios implican a las células iNKT directa e indirectamente como una célula *helper* de la respuesta humoral.

La especificidad que tienen las células iNKT para activar DCs y linfocitos B, se debe a que estas poseen un TCR capaz de reconocer glicolípidos presentados en CD1d, una molécula tipo MHC-I (Carreño & cols., 2016). Esta molécula presentadora es ensamblada en el retículo endoplásmico y permite un eficiente intercambio y cargado de antígenos dentro de endosomas antes de llegar a la superficie. Por otro lado, CD1d también puede unir ligandos directamente en la superficie de la célula sin una maquinaria accesoria para cargar lípidos (Girardi & Zajonc, 2012).

A pesar de que aún no se tiene claridad sobre cuáles son los ligandos endógenos de CD1d (Kain & cols., 2015), el descubrimiento de α -Galactosilceramida (α GC) en esponjas marinas como el primer ligando sintético de célula iNKT, permitió el aislamiento y caracterización de estas células por medio del diseño de dímeros o tetrámeros de CD1d cargados con este ligando (Nyambayar & cols., 2007; Matsuda & cols., 2000). Dado que las células iNKT murinas se encuentran en bajo porcentaje (>1%), su obtención para ensayos funcionales dificulta significativamente su estudio. Las primeras caracterizaciones para determinar la eficiencia de presentación por CD1d a células iNKT se basaron en i) el co-cultivo de hibridomas de célula iNKT con extractos de órgano murino previamente tratadas con los glicolípidos, y ii) co-incubando directamente los hibridomas con complejos CD1d-ligando fijados a placas. Ambas estrategias gatillan la producción y secreción de IL-2, IL-4 e IFN γ al sobrenadante, siendo un parámetro ampliamente utilizado y aceptado para definir la eficiencia con que los glicolípidos son presentados por CD1d (Yu & cols., 2005; Matsuda & cols., 2000).

Las células iNKT, naturalmente presentes en los tejidos, tienen distintos estadios y subtipos durante su desarrollo en el timo en ausencia de activación, siendo las NKT1, NKT2 y NKT17 los principales. En presencia de activación, también se inducen los subtipos NKT_{FH} y NKT10 en los tejidos periféricos (**Tabla 4**), en analogía a los linfocitos Th1, Th2 y Th17, y a los T_{FH} y Treg, respectivamente (Engel & cols., 2016; Crosby & Kronenberg, 2018). Estas células posteriormente migran a distintos órganos donde ejercen su función de célula innata como residente del tejido. (Slauenwhite & Brent Johnston, 2015)

Tabla 4. Características principales de los subtipos de célula iNKT descritos. Características principales de los subtipos de célula iNKT descritos. Modificado de Crosby & Kronenberg, 2018.

iNKT cell subset	trans. factors	Cell surface markers	cytokines secreted
NKT1	PLZF ^{lo} , T-Bet ⁺	CD49a ⁺ , CD122 ⁺ , CXCR3 ⁺ , CD4 ^{+/-}	IFN γ , IL-4, TNF α
NKT2	PLZF ^{hi}	ICOS ⁺ , CD4 ⁺	IL-4, IL-5, IL-13
NKT17	PLZF ^{int} , ROR γ T ⁺	ICOS ⁺ , Syndecan 1 ⁺ , CD4 ⁻ , CCR6 ⁺ , CD103 ⁺ , NRP1 ⁺	IL-17, IL-22, GM-CSF, TNF α
NKTFH	Bcl6	CXCR5 ⁺ , PD1 ^{hi} , CD4 ⁺	IL-21
NKT10	PLZF ⁻ , E4BP4 ⁺	CD49d ⁺ , PD1 ⁺ , NRP1 ⁺	IL-10, IL-2

Interesantemente, las células iNKT presentes en los tejidos periféricos tienen un repertorio de TCRs distinto al que presentan en el timo. Esto sugiere que este repertorio es formado después de llegar a la periferia afectando el nivel basal de activación, proliferación y expansión clonal de estas células dependiendo el órgano donde se encuentren (Jimeno & cols., 2020). De la misma forma, la localización u órgano donde están las células iNKT impacta directamente en la respuesta de citoquinas que puede liberar (Lee & cols., 2015). En un estudio realizado con ratones C57BL/6 y BALB/c, se observa que las células iNKT presentes en la médula de timo son del subtipo NKT2 y liberan IL-4. En órganos linfoides, las iNKT tienen localizaciones únicas que determinan la respuesta de citoquinas en presencia de un antígeno (Kwon & Lee, 2017). En el caso de las iNKT de bazo, el subtipo NKT1 se concentra en la pulpa roja y liberan a la circulación IFN γ e IL-4. En el caso de las NKT2 de bazo, están en la zona T y la IL-4 que liberan condiciona a los otros linfocitos (Lee & cols., 2015).

6.6 Células iNKT y fenotipos inducidos por ligandos glicolipídicos

Los primeros estudios realizados en modelos murinos demostraron que la activación de células iNKT por α GalCer produce un perfil de citoquinas tipo-TH0 (IFN γ , TNFa, IL-2, IL-4, IL13), es decir, que no discrimina entre un perfil tipo-TH1 de un tipo-TH2 (Laurent & cols., 2014; Carreño & cols., 2016). La generación de nuevos análogos derivados de α -GalCer ha permitido identificar modificaciones químicas que polarizan o inclinan la producción de citoquinas hacia perfiles definidos. Por ejemplo, α -C-GalCer, 7DW8-5, AH10-7 inclinan el perfil de citoquinas hacia una respuesta tipo-Th1 y, por otro lado, OCH y C20:2 lo promueven hacia una respuesta tipo-TH2 (Chennamadhavuni & cols., 2018; Van Kaer & Wu., 2018; Sag & cols., 2014; Chang & cols., 2011).

El mecanismo que explica esta inclinación o polarización en la producción de citoquinas hacia distintos perfiles ha sido argumentado con distintas teorías. α GalCer es un glicoenfigolípido que se adapta óptimamente al bolsillo F', una hendidura de CD1d, donde ingresa la cadena alquilada más larga del glicolípido, lo que estabiliza la interacción de cargas entre la molécula presentadora y el ligando (Tyznik & cols., 2011). Esta mayor estabilidad promueve que más complejos CD1d-ligando se localicen preferencialmente en balsas lipídicas, lo que facilita una activación más fuerte y sostenida (Arora & cols., 2016). El diseño de análogos de α GC, con la adición de anillos aromáticos en la galactosa, han demostrado tener una mejor interacción con los bolsillos de CD1d, actuando como una "tercera ancla" además de las dos cadenas alquiladas clásicas que ingresan a los bolsillos de la molécula (Aspeshlagh & cols., 2011).

En el caso de los lípidos con perfil tipo-TH2, al tener cadenas polinsaturadas o ser moléculas más pequeñas no pueden estabilizarse en los bolsillos de CD1d donde se alojan las cadenas alquiladas de los ligandos, por lo que sufren una inmediata disociación o desplazamiento por otro ligando de forma dependiente de pH (Bai & cols., 2009; Arora & cols., 2016). Otros estudios de simulaciones moleculares han identificado que estados conformacionales específicos de las cabezas polares del

azúcar en CD1d les dan la propiedad a los glicolípidos tipo-TH2 de generar activaciones más moderadas (Laurent & cols., 2014) .

Cuando las células iNKT son activadas por glicolípidos, estas pueden cambiar su localización para favorecer la interacción con los linfocitos B. En el caso de las células iNKT de bazo, sus subtipos están ampliamente distribuidos en todo el órgano, y cuando son activadas por glicolípidos, estas son arrestradas dentro de las primeras horas en la zona marginal y al día 7 ya se localizan dentro de centros germinales (Vomhof-DeKrey & cols., 2014). Las células iNKT pueden inducir por si solas la formación de centros germinales y promover la maduración de afinidad, no obstante, esta respuesta es transitoria, decayendo al día 28 post inmunización (Chang & cols., 2011). Importantemente, las células iNKT activadas por α GalCer también promueven el licenciamiento de DCs capaces de activar linfocitos T CD8 y CD4 (Fujii & cols., 2003), siendo estos últimos los que activarán a los linfocitos B. De esta forma, las células iNKT participan en la activación de los linfocitos B como iniciadoras y complementarias a los linfocitos Th convencionales.

La administración de antígenos proteicos, utilizando α -GalCer como adyuvante, inducen una mejor respuesta humoral. Estos adyuvantes incrementan los títulos y afinidad de los anticuerpos, lo que evidenció una contribución de las células iNKT en el tipo de respuesta de los linfocitos B (Galli & cols., 2007; Barral & cols., 2008). Sin embargo, administrar los ligandos de forma libre o soluble presenta importantes desventajas como la anergia de las células iNKT después de una sola dosis (Parekh & cols., 2005; Lyoda & cols., 2010). La utilización de vehículos, como nanopartículas (NPs) para la entrega de glicolípidos, permitió evadir la anergia y profundizar más en el estudio sobre la modulación de la respuesta humoral por células iNKT.

6.7 Liposomas como vehículo para la activación de linfocitos B

Los mecanismos de activación que tienen los linfocitos B frente a nanopartículas (NPs), como liposomas, han sido dilucidados a partir de distintos modelos. La modificación de las NPs para contener epítomos repetitivos o multivalentes en su

superficie la han convertido en una herramienta útil para la activación de linfocitos B incrementando la avidéz de unión a las células blanco o tejidos (Hong & cols., 2018). Adicionalmente, estos epítomos presentes en la superficie de las NPs favorecen la activación del complemento mejorando la opsonización de estos, reduciendo el umbral necesario para activar el BCR de los linfocitos B (Carroll & Isenman, 2012).

En el caso de las partículas tipo-virus (VLPs, *virus-like particles*) que llegan a la circulación, se ha descrito que estas pueden ser captadas directamente por linfocitos B antígeno-específicos presentes en la zona marginal del bazo. Luego, estos linfocitos migran al área folicular para facilitar el transporte de las VLPs hasta las DCs foliculares (FDCs) *in situ* (Cinamon & cols., 2008). Finalmente, las FDCs activarán directamente a los linfocitos T CD4+ *naive* que posteriormente reconocerán de forma antígeno-específica los péptidos presentados por los linfocitos B, dando paso a la formación de centros germinales (Hong & cols., 2018). Esta característica permite inferir que liposomas de similar tamaño a una VLP y con proteínas repetidas en su superficie, pueden ser captados por el BCR antígeno-específico de los linfocitos B, para luego ser endocitados, procesados y presentados por MHC-II a células residentes del bazo, como los linfocitos Th.

Un tipo de activación llamativa que presentan los linfocitos B frente a antígenos unidos a membranas lipídicas es la trogocitosis. Este fenómeno, conocido como *cell gnawing* o “mordisqueo” celular, refiere a extraer e internalizar trozos completos de membrana plasmática junto a antígenos conjugados de las APCs mediante la unión del BCR (Hudrisier & cols., 2007). Más recientemente, también se ha descrito que los linfocitos B de zona marginal pueden extraer la membrana plasmática asociada a complejos MHC-II/péptido de DCs mediante receptores del complemento (Zhao & cols., 2022). Estos mecanismos permiten sugerir que los antígenos conjugados a la superficie de liposomas que se fusionen o sean reciclados a la superficie de sus células blanco (Kolašinac & cols., 2018) podrían ser captados directamente por el BCR o receptores de complemento de linfocitos B para una presentación más rápida por MHC-II a linfocitos Th.

La localización de la proteína o antígeno modelo en los liposomas influye directamente en la calidad de la respuesta humoral. Esto se ha demostrado utilizando un potente péptido activador de linfocitos Th denominado LACK, que al estar anclado en la superficie de liposomas genera anticuerpos de mayor afinidad que al encapsularlo. En este trabajo describen que las NPs podrían estabilizar la interacción con los linfocitos T-B (Elbahnasawy & cols., 2018), favoreciendo el reconocimiento inmediato del antígeno al estar el superficie.

Cuando las NPs miden menos de 500 nm, son preferiblemente captados por DCs CD11c⁺ para llegar al tejido linfático donde están presentes los linfocitos T (Chang & cols., 2017; Thapa & cols., 2009). La administración intravenosa de liposomas más pequeños (<200 nm) con antígenos anclados de linfocito B puede ser una de las maneras más eficientes de modular la activación de estas células. Esto es debido a que pueden ser captados por DCs y posteriormente activar células T presentes en el órgano linfoide; o llegar directamente a la zona marginal del bazo, donde serán captados por linfocitos B extrafoliculares para iniciar la respuesta humoral

6.8 Consideraciones para el uso de liposomas en la modulación de la respuesta humoral

El desarrollo y caracterización de los liposomas considera una serie de técnicas que permiten conocer parámetros como el tamaño, concentración, forma, potencial eléctrico además de determinar la cantidad de antígeno conjugado o contenido en las nanopartículas. Un *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) obtenido con NanoSight permite un rápido análisis de la distribución de tamaños y concentración de todas las nanopartículas entre 0.01 – 1 µm de diámetro presentes en la muestra. Las vacunas particuladas pueden ser capaces de difundir sistémicamente y tener distintos tiempos de circulación dependiendo el tamaño (Awatshi & cols., 2003). Se ha observado que las nanopartículas que miden entre 150-200 nm son los que están mayor tiempo en circulación y, de hecho, las moléculas que miden entre 20-200 nm

entran de forma eficiente en el sistema linfático, pudiendo llegar directamente a los linfocitos B foliculares (Oussoren & cols., 1997).

En contraste, las nanopartículas que más de 500 nm no entran libres en los capilares linfáticos por lo que requieren de células especializadas como las DCs (Manolova & cols., 2008; Jiang & cols., 2015). Respecto a la forma de las nanopartículas, una de las formas más confiables de determinarla es mediante microscopía electrónica de barrido y transmisión (STEM). Este instrumento fusiona la capacidad de un microscopio de barrido (SEM) de ver la forma y tamaño aproximado de las partículas a través de su superficie, y la capacidad del microscopio de transmisión (TEM) de una mayor resolución y conocer la complejidad interior de la partícula.

Otra propiedad importante obtenida por dispersión de luz dinámica (DLS, *Dynamic light scattering*), es el índice de polidispersidad (PDI, *polidispersity index*). El PDI se utiliza para describir el grado de heterogeneidad o distribución de los tamaños más representados en la suspensión. Este parámetro es adimensional y escalado de manera que para preparaciones liposomales, valores hasta 0.3 son aceptables como monodispersas (Chen & cols., 2011). Por otro lado, valores de PDI mayores a 0.7 indican muestras que tienen un amplio rango de tamaños y no son adecuados para ser analizados por dispersión de luz dinámica (DLS, *Dynamic light scattering*) (Danaei & cols., 2018). Otro parámetro que entrega el DLS es el potencial eléctrico o potencial Z (ZP) presente la superficie de la nanopartículas. Liposomas con una carga neta positiva, o catiónicos, son ampliamente descritos por su capacidad de atracción por la membrana celular de carga negativa (Ma & cols., 2011; Bernfield & cols., 1999). No obstante, liposomas con carga negativa o aniónicos, también han demostrado ser inmunogénicos pudiendo unirse a las células mediante sitios catiónicos en forma de *clusters* (Patil & cols., 2007), induciendo linfocitos T CD8⁺, T CD4⁺ y aumentando la expresión de moléculas relacionadas a la activación y maduración de APCs, facilitando el ingreso de los antígenos (Yanasarn & cols., 2011).

Para evitar el agregado de las nanopartículas o el reconocimiento por las células fagocíticas presentes en el sistema reticuloendotelial, se puede utilizar polietilenglicol (PEG) en la formulación ya que los liposomas PEGilados se vuelven más hidrofílicos y aumenta su barrera estérica contra proteínas plasmáticas como opsoninas y macrófagos (Litzinger & cols., 1994). Además, la incorporación de colesterol en los liposomas es utilizada con frecuencia para condensar y estabilizar las bicapas lipídicas favoreciendo el tiempo en circulación y la respuesta humoral (van Houte & cols., 1981).

La vía de administración de los liposomas también es un factor crítico. Por ejemplo, la inmunización oral promueve la producción de IgA en el intestino delgado y colon ascendente (Tana & cols., 2011). Por otro lado, la inmunización nasal promueve la secreción de IgA en el tracto respiratorio y tracto genital femenino sin una respuesta en el intestino (Boyaka, 2017). Otros estudios comparando la vía intradérmica (id) con la vía intraperitoneal (ip), han mostrado que ratones inmunizados vía ip promueven mayores títulos de IgG2a e IgG1 en suero, como mayor proliferación de linfocitos en T (Thatte & cols., 1995). Sin embargo, los inmunógenos inyectados vía ip son absorbidos con baja eficiencia ya que, al igual que la administración oral, deben pasar primero por los vasos mesentéricos que son drenados al hígado sufriendo metabolismo hepático antes de alcanzar la circulación (Turner & cols., 2011). La inmunización intravenosa (iv) es la vía más directa y eficiente, ya que el antígeno sufre mínimas modificaciones y no requiere de absorción, pudiendo estimular directamente a las células de bazo y promover la producción de los subtipos IgG por los linfocitos B de la zona marginal (Chorny & cols., 2016) y B foliculares (Dôlen & cols., 2020; Turner & cols., 2011). Como los subtipos de IgG son los más abundantes en circulación en condiciones basales y después de una inmunización (Klein-Schneegans & cols., 1989; Lopez-Saucedo & cols., 2015; Honjo & cols., 2012; Castigli & cols., 2004), pueden seguirse a través del tiempo sin la necesidad de sacrificar al animal. Otra ventaja es que la proporción entre los distintos subtipos son fácilmente medibles en suero y en los linfocitos B de bazo, por lo que la inmunización iv representa la vía más efectiva para estudiar el cambio de clase entre los distintos isotipos.

6.9 Uso de liposomas para modular la respuesta humoral a través de células iNKT

Se ha demostrado que la propiedad de autoensamblaje que presentan los lípidos en solventes polares ha permitido la eficiente incorporación de ligandos de célula iNKT en la membrana de liposomas permitiendo una notable activación de estas células sin inducirles anergia (Deng & cols., 2014; Thapa & cols., 2009). Adicionalmente, la unión covalente de proteínas en la superficie de estas nanopartículas potencia significativamente la co-activación de células iNKT y de linfocitos B (Chang & cols., 2011; Guan & cols., 1998; Chen & cols., 2018).

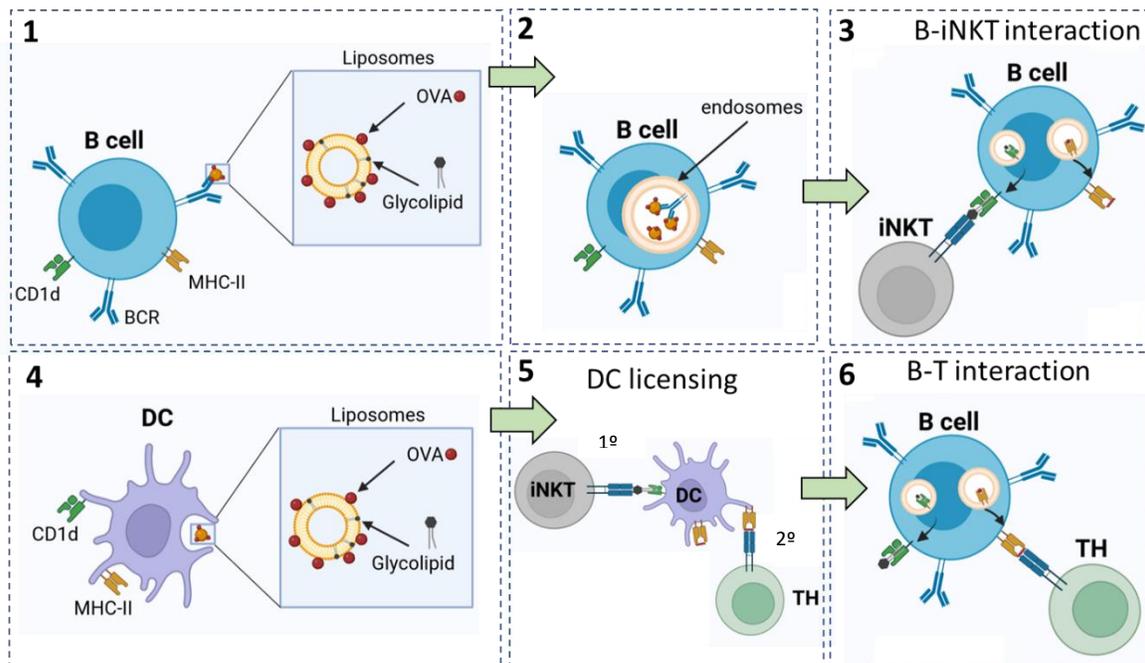


Figura 4. Activación de linfocitos B mediante liposomas que contienen glicolípidos y proteínas ancladas. La administración intravenosa de liposomas asegura su llegada a las distintas células del bazo. **1.)** los liposomas son reconocidos por el BCR de los linfocitos B. **2.)** Estos pueden ser endocitados mediante el BCR antígeno-específico. **3.)** Una vez dentro, los distintos componentes del liposoma, como glicolípidos y péptidos, son cargados endosomalmente en moléculas CD1d y MHC-II, respectivamente. En paralelo, **4.)** los liposomas también son reconocidos por las DCs, que migrarán a los linfonodos **5.)** donde participarán como DCs licenciadas que activarán células iNKT como linfocitos T_H mediante glicolípidos y péptidos. Finalmente, **6.)** los linfocitos T_H previamente activados se encontrarán con linfocitos B para reconocer los antígenos capturados en los liposomas.

El desarrollo de liposomas con glicolípidos embebidos en su membrana y proteínas en su superficie proporciona una herramienta eficaz para evaluar la contribución de las células iNKT en la respuesta humoral (**Figura 4**). En un estudio realizado en el laboratorio de la Dra. Vinuesa y colaboradores utilizando liposomas, pudieron identificar que algunos glicolípidos como α -C-GalCer, inducen un mayor número de NKT_{FH} que α GalCer, y que el glicolípidos OCH induce un menor número de estas células (Chang & cols., 2011). Otras investigaciones demostraron que este tipo de preparaciones liposomales pueden inducir todos los subtipos de IgG circulantes incluso en modelos murinos knock-out para MHC-II, (Chen & cols., 2018), sin embargo, los títulos son mucho menores que en C57BL/6 nativos (Tonti & cols., 2012; Rampuria & cols., 2017).

Estos antecedentes en conjunto indican que es posible, a través de este tipo de liposomas, evaluar la contribución de las células iNKT en la respuesta humoral o si la activación por distintos ligandos podría modificar los isotipos producidos por el linfocito B. Sería interesante poder evaluar si la administración exógena de glicolípidos que inducen un perfil tipo-TH1 o tipo-TH2 en las células iNKT, es suficiente para modular el tipo de activación del linfocito B y la CSR hacia isotipos como IgG2c o IgG1 (**Figura 5**), respectivamente, en analogía a lo visto en los estudios *in vitro* al administrar IFN γ o IL-4 a cultivos de linfocitos B.

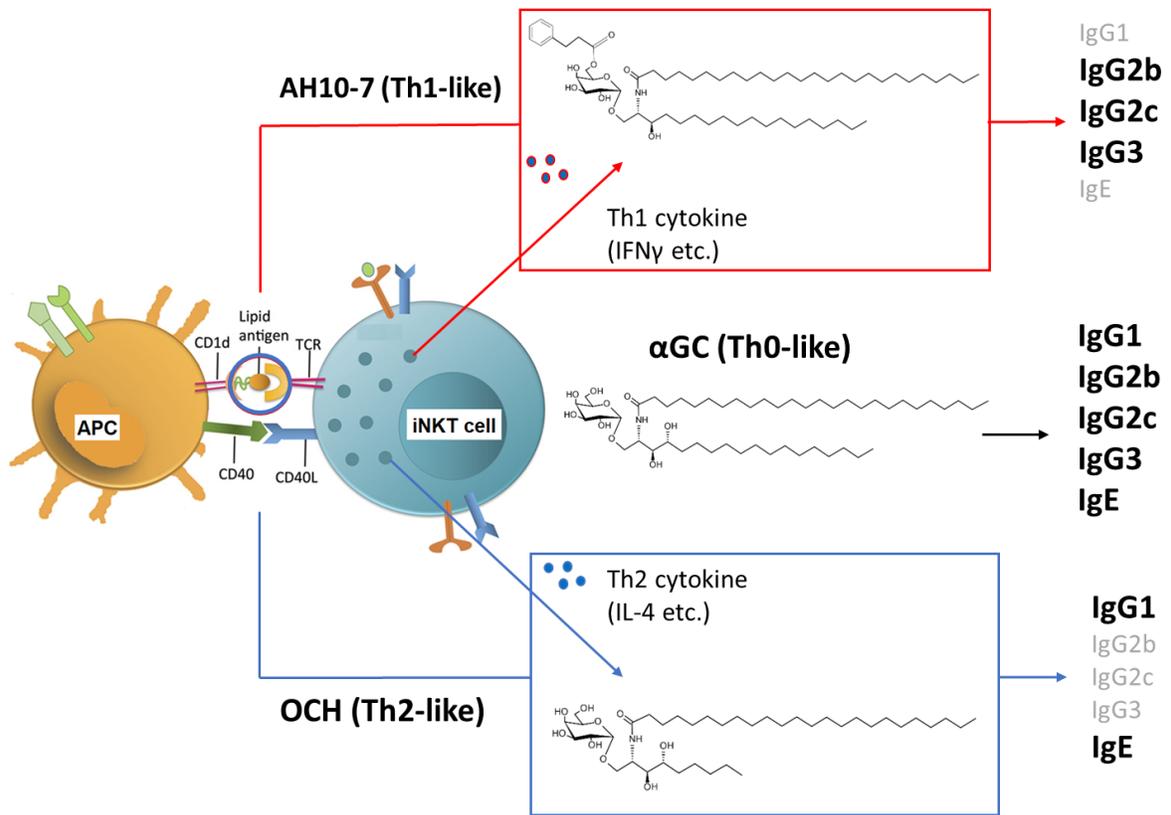


Figura 5. Modelo propuesto para la modulación de la CSR mediante células iNKT. Cuando las APCs (DCs, linfocitos B, etc) capturan y presentan glicolípidos se producirán distintos perfiles de citoquinas. Cuando se utiliza α GC, se producirá un perfil mixto de citoquinas que promoverá la producción de todos los isotipos por los linfocitos B. El uso de AH10-7 promoverá mayores niveles de IFN γ , lo que aumentará los niveles de IgG2c, IgG2b e IgG3 producidos por los linfocitos B. La administración de OCH inducirá mayores niveles de IL-4, lo que incrementará la expansión de linfocitos B productores de IgG1 e IgE

7 Hipótesis

La activación diferencial de células iNKT hacia un perfil tipo-TH1 o tipo-TH2 a través de glicolípidos, promueve la recombinación por cambio de clase hacia los isotipos IgG2c/IgG2b/IgG3 o IgG1/IgE, respectivamente.

8 Objetivos

1. Evaluar las propiedades fisicoquímicas y bioactivas de los LPs-OVA cargados con diferentes ligandos de células iNKT.
2. Definir los isotipos, magnitud y avidéz relativa de diferentes anticuerpos anti-OVA en respuesta a una activación tipo-TH1 o tipo-TH2 por células iNKT.
3. Correlacionar la inducción de células iNKT/Th con la expansión de linfocitos B productores de diferentes isotipos en respuesta a una activación tipo-TH1 o tipo-TH2 por células iNKT.
4. Caracterizar a nivel transcripcional el locus de la cadena pesadas obtenido por la Recombinación por cambio de Clase en linfocitos B en una activación tipo-TH1 o tipo-TH2 por células iNKT.

9 Metodología

9.1 Ratones

Ratones silvestres C57BL/6 fueron requeridos en el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP). Los ratones C57BL/6-Tg (Tcr α Tcr β)1100Mjb/J (OT-1) fueron obtenidos del Bioterio Central de la Universidad de Chile. Ratones entre 2-3 meses de edad con un peso promedio de 25 g fueron utilizados para los experimentos. Todos los procedimientos realizados con animales se hicieron de acuerdo con las normas institucionales de bioética y bioseguridad establecidas por el ICBM y ANID. El uso de los animales considerados en esta tesis se enmarca en el protocolo aprobado del Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile código CICUA (CBA 1185 FMUCH).

9.2 Medios de cultivo.

9.2.1 Medio de cultivo para BMDCs y células de bazo.

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 β -mercaptoetanol (Gibco, USA)

9.2.2 Medio de cultivo para células iNKT.

DMEM fue 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), 0,5% de solución de aminoácidos.

9.3 Inmunizaciones

Cada ratón fue inmunizado vía intravenosa (i.v) por la vena lateral de la cola con 200 μ L de suspensión liposomal que contienen 5-10 μ g de OVA y 4 nmoles de glicolípido (**Tabla 5**). Se utilizaron 5 ratones por condición experimental (**Tabla 6**). En los ensayos que se requirió refuerzo se administraron las mismas preparaciones 21 días después de la primera inmunización. Como control positivo, se administraron i.v. 20 μ g del adyuvante Monofosforil lipido A (MPLA) mezclado con 5-10 μ g de OVA.

9.4 Preparaciones liposomales

Los lípidos fosfatidil colina de huevo (EPC), Colesterol (Chol), DSPE-PEG 2000, N-cap biotinyl-phosphatidylethanolamine (PE-biotina), α -GalCer (KRN7000) y OCH fueron obtenidos desde Avanti Polar Lipids, USA. El glicolípido AH10-7 fue obtenido gracias a la colaboración con el laboratorio del Dr. Steven A. Porcelli del Albert Einstein College of Medicine.

El stock liofilizado de EPC, Chol y DSPE-PEG 2000 y PE-biotina fueron resuspendidos en una solución de metanol/cloroformo 1:1 frío. En el caso de los glicolípidos, estos se resuspendieron en una mezcla metanol/cloroformo 2:1. Todos los lípidos fueron traspasados a tubos de vidrio de borosilicato (Fischerbrand, USA) y almacenados a -20°C hasta su uso. Los distintos componentes de los liposomas (LPs) fueron mezclados en relaciones molares predefinidas (**Tabla 5**) y homogenizados mediante *vortex* durante 1 min. Posteriormente, el solvente se evaporó en bomba de vacío (Vacuubrand, MZ 2C) durante 4 h a temperatura ambiente (TA) o sin vacío durante toda la noche a TA. Una vez evaporado el solvente, el *film* lipídico obtenido se hidrató con 200 μ L de PBS estéril (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄ and 2mM KH₂PO₄, PBS pH 7.4), se homogenizó mediante *vortex* durante 1 min y luego se sonicó (LC30H Ultrasonic, CIENTEC)

durante 5 min a TA. Finalmente, las preparaciones se dejaron a temperatura ambiente durante 30 min antes de extraer.

La sistema de extrusión utilizado está compuesto de un mini extruder (Avanti Polar Lipids, USA), una membrana de policarbonato con poros de 800 nm de diámetro (Nucleopore, USA), dos membranas de soporte (Avanti Polar Lipids, USA) y 2 jeringas herméticas de precisión (Hamilton Company, USA). El sistema fue montado sobre un soporte termorregulado a 55°C. Los LPs fueron colectados en una de las jeringas y a continuación se ingresaron al extruder realizando 11 pasajes a través de la membrana con cada preparación liposomal (**Tabla 5**) a modo de generar partículas unilaminares de un tamaño homogéneo. En el último pasaje la suspensión de partículas se colectó en una de las jeringas y se transfirió un microtubo de 1.7 mL estéril para almacenarlo a 4°C hasta su uso.

9.5 Cuantificación de fosfolípidos que componen los liposomas

A partir del kit de cuantificación de fosfolípidos MAK122 (Sigma Aldrich) se procedió según recomendación del fabricante. Se calculó la concentración de fosfatidilcolina en las muestras según la ecuación:

$$\mu\text{M} = ((\text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{blanco}}) / \text{pendiente}) \times \text{N}$$

Siendo “Abs” la absorbancia de la muestra y del blanco, y “N” el factor de dilución ocupado. El valor obtenido fue utilizado de referencia para estimar los moles de glicolípido contenido en los liposomas.

Tabla 5. Composición de las preparaciones liposomales. Cada preparación contiene 4 nmoles de glicolípido. Se utilizaron 3,43 ug de aGalCer (mostrado en la tabla), 3,9 ug para AH10-7 (PM: 974.48 g/mol) y 2,82 ug para OCH (PM: 704 g/mol) que corresponden a 4 nmoles cada uno. Los liposomas sin glicolípido mantienen la misma composición de los otros lípidos.

Componente	EPC	Chol	DSPE-PEG2000	PE-biotina	α -GC	Total
Porcentaje molar (%)	54,14	22,56	4,512	1,975	17,798	100
nmoles	12,16	5,07	1,01	0,22	4	22,47
PM (g/mol)	851	387	2791	1105	858,32	-
Masa (μ g)	10,35	1,96	2,83	0,24	3,43	18,82

9.6 Conjugación de Ovalbumina (OVA) en la superficie de los liposomas

OVA libre de endotoxinas (Endofit, InvivoGen) fue utilizada como antígeno modelo para garantizar una administración segura en los animales. La OVA fue biotinilada con el reactivo sulfo-NHS-LC-LC-biotina (Thermo Fisher Scientific) según recomendaciones del fabricante. Brevemente, un stock de OVA endofit (10 mg) fue resuspendido en 1 mL de PBS, y a continuación 5.5 mg fueron mezclados e incubados con 10 mM del reactivo de biotinilación durante 2 h a TA en agitación y finalmente dejado a 4 °C O.N.

La proteína biotinilada fue separada de los componentes no-conjugados utilizando una columna de exclusión molecular (Sephadex G-250) según recomendaciones del fabricante. Brevemente, la columna previamente hidratada fue utilizada para colectar la proteína eluida en fracciones de 0.5 mL. La cantidad de proteína presente en cada fracción fue determinada mediante el método de cuantificación con ácido bicinconínico (BCA) (Pierce, ThermoScientific) y el grado de biotinilación de OVA obtenido se determinó con el kit de cuantificación de biotina (Pierce, ThermoScientific) según recomendación del fabricante.

La OVA biotinilada (10 µg equivalente a 0.22 nmoles) fue mezclada con la suspensión de LPs preparado previamente (0.22 nmol de CAP-PE biotina), luego, estos dos componentes fueron mezclados poco a poco con estreptavidina (Sigma) (6.66 µg equivalente a 0.11 nmoles) en una relación 2:1:2 (0.22 nmol OVA/0.11 nmol Strep/0.22 nmol LP), durante 2 h a temperatura ambiente. Los liposomas con OVA anclada (LP/OVA/ligandos) fueron colectados mediante ultracentrifugación (Sorvall Wx100, Thermo) a 80.000 x g durante 30 min a 4°C. Finalmente, el sobrenadante fue descartado y el *pellet* liposomal fue resuspendido en 100 uL de PBS y almacenando a 4°C hasta su uso.

9.7 Detección y cuantificación de OVA en la superficie de las preparaciones liposomales

La cantidad de OVA anclada fue cuantificada mediante ELISA directo anti-OVA. Brevemente, diluciones 1:100 y 1:200 de los liposomas fueron sembradas por triplicado en placas ELISA (Maxisorp®) junto a una curva estándar de OVA (rango 12.5-125 ng/mL) e incubadas toda la noche a 4 °C. A continuación, la placa se lavó y bloqueó con PBS BSA al 1% durante 1 h a 37 °C y, luego, se incubó con anticuerpos anti-OVA de conejo diluido (Abcam, ab181688) durante 1 h a temperatura ambiente. Se repitió el lavado y se agregó el anticuerpo secundario de asno anti-conejo conjugado a HRP durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, las placas se revelaron con TMB (Tetramethylbenzidine, ThermoFisher) y para detener la reacción colorimétrica se utilizó H₂SO₄ 2N. La absorbancia fue cuantificada mediante un espectrofotómetro a 450/540 nm (Synergy HT, Bio-Tek, USA). Los valores de absorbancia fueron interpolados en la curva para determinar la cantidad de OVA presente en cada preparación.

Para corroborar si toda la población de liposomas contiene OVA en su superficie, entre 10-15 µL de cada preparación liposomal se incubó con anticuerpos anti-OVA acoplado a FITC (Rockland) para determinar la presencia de la proteína mediante citometría de flujo empleando anticuerpos anti-OVA (FITC) (Rockland) durante 1 h

a 4 °C. Posteriormente, la mezcla se llevó a 250 uL con buffer FACS y se ultracentrifugó una vez a 80.000 x g durante 30 min a 4 °C para descartar el sobrenadante y resuspender el *pellet* en 300 µL de PBS. Adicionalmente se analizó la autofluorescencia de todas las preparaciones. Los datos obtenidos de las citometrías (BD LSRFortessa X-20) fueron analizados utilizando el programa FlowJo X 10.0.7 (FlowJo LLC).

9.8 Caracterización fisicoquímica de las preparaciones liposomales

9.8.1 Determinación del tamaño mediante Nanotracking Analysis (NTA).

Los tamaños se obtuvieron utilizando el equipo Malvern Nanosight NS300 (Malvern, USA). Brevemente, las preparaciones fueron diluidas 1:200 en PBS y luego fueron incorporadas al sistema con una jeringa de 1 mL. Los parámetros para el análisis se fijaron de la siguiente forma: Captura: [Camera level = 10; Screen = 3]. [Process: Screen = 9; Threshold = 5]. Cada preparación se midió en triplicado haciendo registros de 30 s y los datos colectados fueron graficados mediante Graphpad Prism 8.

9.8.2 Determinación del potencial Z e Índice de Polidispersidad (Pdl) mediante Dispersión Dinámica de Luz (DLS).

Las mediciones fueron realizadas con un Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, UK). Para esto, 5 µL de LPs se diluyeron en 1 mL de agua ultrapura (Corning®) y se incorporaron en cubetas para la medición. Los valores son entregados en milivoltios (mV). Adicionalmente, se obtuvo el Índice de Polidispersidad (Pdl) de las preparaciones. Se consideró que valores de Pdl entre 0-0.1 indican muestras monodispersas; entre 0.1-0.4 son polidispersas y >0.4 son altamente polidispersas. Los datos colectados fueron graficados mediante Graphpad Prism 8.

9.8.3 Determinación de la morfología mediante Microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM).

Se utilizó el equipo de STEM (FEI Inspect 50-USA). Para esto, 10 μL de liposoma se diluyeron en 500 μL de PBS, y 10 μL de la dilución fueron depositados en grillas de cobre (200 mesh cubiertas con Formvar) por 2 min, luego la gota es removida con papel filtro evitando que el papel toque la grilla, luego la grilla se lava dos veces con gotas de agua miliQ por 1 min. Finalmente, la muestra es teñida con una solución del ácido fosfotungstico al 1% agregando de esta solución a la grilla por 2 min y a continuación removiendo la gota con papel filtro. Finalmente, la grilla es secada durante 24 h antes del análisis y las imágenes fueron capturadas con una amplificación de 2 y 5 micrómetros.

9.9 Evaluación de la bioactividad dada por las preparaciones liposomales *in vitro*

9.9.1 Activación de linfocitos B *in vitro* mediante la co-incubación con hibridomas de células iNKT.

Ratones C57BL/6 fueron inmunizados con preparaciones liposomales y posterior a 7 días, sus linfocitos B fueron purificados como se describe previamente. Estos linfocitos fueron incubados con células iNKT provenientes de hibridomas durante 48 h a 37 °C. Posteriormente, estas células fueron centrifugadas y el sobrenadante fue utilizado para i) detectar los isotipos secretados como parámetro de activación de linfocitos B mediante el protocolo de ELISA anti-OVA y ii) detectar IL-2 como parámetro de activación de células iNKT mediante el protocolo de ELISA sándwich.

9.9.2 Activación de linfocitos T OVA-específicos a partir de ratones OT-1 con las preparaciones liposomales.

El bazo de ratones C57BL/6-Tg (TcraTcrb)1100Mjb/Crl (OT1) fue colectado y procesado para la eliminación de eritrocitos y ajustar su concentración a 1×10^6 células/mL hasta su uso. En paralelo, se generaron DCs como se indica en la

sección 4.18.4.1. para ser incubadas con preparaciones liposomales ajustadas a 5 µg de OVA durante 24 h a 37°C. Luego, las DCs son ajustadas a la misma concentración que las células OT-1 para ser incubadas en misma proporción 1:1 durante 24 h a 37°C. Se utiliza como control positivo 20 nM del péptido SIINFEKL (Genscript), que es reconocido de manera restringida por el TCR de linfocitos OT-1, además de 50 µg/mL de Ovalbumina purificada. Finalmente, las células son centrifugadas y el sobrenadante colectado es almacenado a 4°C o a -80°C hasta su uso. La cuantificación de IL-2 en el sobrenadante se hace según la sección 4.18.4.4.

9.9.3 Activación de células iNKT mediante DCs pulsadas con mLPs.

9.9.3.1 Obtención de DCs a partir de ratones C57BL/6.

Se obtuvo la médula ósea según la sección 4.18. A partir de estas células, se incubaron 3×10^6 células/pocillo en placas de 6 pocillos con 10 ng/mL de GM-CSF murino (Preprotech) en incubador de cultivo celular (MCO-15A, Sanyo, Japón) a 37°C, con atmósfera 5% CO₂ y 100% humedad. Al día 2 y 4 se agregó nuevamente GM-CSF fresco a la misma concentración; y al quinto día, las células fueron cosechadas con un *cell scraper* para ser utilizadas como células presentadoras de glicolípidos ante células iNKT.

9.9.3.2 Expansión de hibridomas de célula iNKT.

Hibridomas de células iNKT (denominadas K2C10) generadas en el laboratorio fueron utilizadas para ensayos de activación mediante DCs. Brevemente, células iNKT fueron cultivadas en medio DMEM suplementado y se incubaron en incubador de cultivo celular (MCO-15A, Sanyo, Japón) a 37°C, con atmósfera 5% CO₂ y 100% humedad manteniendo una confluencia al 70%.

9.9.3.3 Ensayos de co-cultivo DCs-iNKT.

Preparaciones liposomales con AH10-7 (LP/AH10-7) ó AH10-7 y OVA (LP/OVA/AH10-7) fueron diluidas hasta concentraciones de 1, 10 y 100 nM de

AH10-7 para estimular 1×10^5 DCs/pocillo. Se agregó el estímulo con el glicolípido libre en las mismas concentraciones y liposomas sin glicolípido. Estas condiciones fueron incubadas a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, las DCs activadas fueron centrifugadas a 1600 g durante 5 min a 4°C y resuspendidas en DMEM suplementado fresco ajustando su densidad a 1×10^6 cell/mL. En paralelo, las células iNKT fueron centrifugadas de la misma forma ajustando a la misma densidad celular. Un co-cultivo de células 1:1 fue sembrada en placas de 96 pocillos de fondo U (Corning) durante 24 h a 37 °C. Finalmente, la placa fue centrifugada para colectar y almacenar el sobrenadante a 4°C o a -80°C hasta su uso.

9.9.3.4 Cuantificación de IL-2 mediante ELISA sándwich.

Se cuantificó IL-2 como parámetro de activación de células iNKT. Para esto, se sensibilizaron placas de 96 pocillos para inmunoensayo (Nunc, USA) con 100 µL/pocillo de anticuerpo monoclonal anti IL-2 de ratón purificado (clon JES6-1A12; BD Pharmingen), durante 12 h a 4°C. Posteriormente, los pocillos fueron bloqueados con una solución PBS BSA 1% por 1 h a 37 °C. Después, las placas fueron lavadas con PBS-Tween 20 al 0,05% en un lavador de placas de ELISA (HydroFlex, Tecan, Austria). Enseguida, se agregó 10 µL del sobrenadante de los co-cultivos y se completó hasta 100 µL/pocillo con PBS-BSA 1%. Adicionalmente se incorporó una curva estándar en duplicado de la proteína IL-2 recombinante (Peprotech, USA), incubándose durante 24 h, a 4°C.

Luego, las placas fueron lavadas e incubadas con 100 µL/pocillo de anticuerpo monoclonal anti IL-2 de ratón conjugado a biotina (clon JES6-1A12; BD Pharmingen) por 1 h a 37°C. A continuación, los pocillos fueron lavados e incubados con 100 µL/pocillo de estreptavidina-HRP (BD Pharmingen), por una hora a 37°C. Finalmente, la placa es lavada e incubada con 50 µL/pocillo de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina; LifeTechnologies). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, por 5 min, y se detuvo con 50 µL/pocillo de H₂SO₄ 2N. El resultado colorimétrico fue leído en un lector para placas de ELISA (Synergy HT, Bio-Tek, USA) a absorbancias tanto de 450 nm como 540 nm.

9.10 Colección de sueros a partir de ratones inmunizados

Para colectar la sangre, los distintos grupos experimentales fueron introducidos consecutivamente en una cámara calefaccionada a 30 °C para aumentar la irrigación sanguínea durante 3 min. Luego, los ratones se sujetaron manualmente para hacer un corte superficial en la vena de la cola y colectar la sangre dentro de microtubos de 1.7 mL. El sangrado de la cola fue detenido mediante la presión manual con algodón estéril. Luego, la sangre se dejó coagular durante 1 h a temperatura ambiente y se centrifugó a 1600 g durante 10 min. El suero recolectado se almacenó a -80°C hasta su uso.

9.11 Procesamiento del bazo para la detección de poblaciones celulares

Los bazos fueron disgregados y homogenizados con los extremos esmerilados de dos portaobjetos dentro de 2 mL de RPMI suplementado que fueron filtrados con *cell strainer* de 70 µm (Falcon, USA), luego se agregó 2 mL adicionales del medio para lavar el filtrado. Los esplenocitos filtrados fueron tratados con una buffer ACK (Gibco) para la lisis de eritrocitos mediante lisis hipotónica durante 5 min en hielo. Luego, la lisis es detenida diluyendo 10 veces con PBS frío y las células son centrifugadas y resuspendidas en 5 mL de RPMI suplementado para su cuantificación con un contador de células automatizado TC20 (Bio-Rad). Finalmente, las células fueron ajustadas a la concentración de trabajo y mantenidas en hielo hasta su uso.

9.12 Obtención de médula ósea para la generación de BMDCs y ensayos de ELISPOT

Se colectaron asépticamente fémures y tibias, y se mantuvieron en medio RPMI (HyClone) frío. Los huesos fueron sumergidos durante 5 s en etanol 70% y luego

transferidos a RPMI suplementado donde se extrajo la médula ósea mediante jeringas de 1 mL con aguja 25G (Nipro, USA). La médula fue tratada con una solución hipotónica (ACK) para la lisis de eritrocitos de la misma forma que con las células de bazo. La densidad células de ajustó a 1×10^6 células vivas/mL y se dejan en hielo hasta su posterior dilución y uso.

9.13 Evaluación de la bioactividad dada por las preparaciones liposomales in vivo

9.13.1 Expansión de células iNKT.

Después de inmunizar con cada tratamiento (Tabla 2), estos fueron sacrificados al tercer día para evaluar la expansión de células iNKT en bazo y producción de citoquinas. Para esto, los distintos bazos fueron colectados en medio RPMI-1640 y los esplenocitos totales fueron depletados de eritrocitos mediante lisis hipotónica. Posteriormente, se cuantificaron y se ajustaron a una concentración de 3×10^6 células/mL y se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo "v" (Thermo Scientific™). La viabilidad fue determinada mediante el marcador Live/Dead (Invitrogen®) y se utilizaron los anticuerpos de ratón anti-B220 (PE-Cy5), anti-CD4 (APC-Cy7), anti-TCR β (FITC) y tetrámero de CD1d cargado con α GalCer (PE) para la identificación de células iNKT mediante citometría de flujo. Después de la tinción de superficie, las células fueron permeabilizadas y fijadas con buffer Foxp3 (Invitrogen™) y finalmente incubadas con los anticuerpos anti-IFN γ (Alexa Fluor 700) y anti-IL-4 (PE-Cy7). Las células fueron lavadas nuevamente y resuspendidas en buffer FACS. Los datos fueron analizados en FlowJo y graficados con GraphPad Prism 8.

Tabla 6. Grupos experimentales evaluados en este trabajo. Ratones C57BL/6 de 2-4 meses de edad, se dispusieron grupos de cinco ejemplares por condición experimental. Se administraron 4 nmoles de glicolípido y 5-10 µg de OVA por ratón. PBS fue utilizado como control vehículo. *20 µg de Monofosforil lipido A (MPLA) fue utilizado como adyuvante i.v.

Grupo Experimental	Tratamiento	nº de ratones	Glicolípido (nmoles)	OVA (µg)
1	LP/OVA/aGC	5	4	5 a 10
2	LP/OVA/AH10-7	5	4	5 a 10
3	LP/OVA/OCH	5	4	5 a 10
4	LP/OVA	5	4	5 a 10
5	MPLA* + OVA	5	4	5 a 10
6	PBS	5	4	5 a 10

9.13.2 Detección de linfocitos B que hacen cambio de clase mediante citometría de flujo.

Después de 7 días de la inmunización, se detectaron los linfocitos B de bazo que hicieron cambio de clase por la administración de los tratamientos. Para esto, las células del bazo recibieron lisis hipotónica y posteriormente se marcaron con sonda de viabilidad Live/Dead (V500) y se bloquearon con FC-Block (BD Biosciences). Se utilizaron los anticuerpos de ratón anti-B220 (Alexa Fluor 700, Clon: RA3-6B2), anti-IgM (PE, Clon: RMM-1), anti-IgD (PE-Cy7, Clon: 11-26c.2a), anti-IgG1 (BV421, Clon: RMG1-1), anti-IgG2b (APC, Clon: RMG2b-1), anti-IgG3 (BV786, Clon: RMG3-1), anti-IgG2c (biotina, Clon: RMG2a-62) y Streptavidina (APC-Cy7). Después de la tinción, las células fueron lavadas y fijadas con PFA al 2%. Finalmente, las células fueron lavadas nuevamente y resuspendidas en buffer FACS. Los datos fueron analizados en FlowJo y graficados con GraphPad Prism 8.

9.13.3 Identificación de linfocitos B de Centro Germinal (GC B) y linfocitos T helper foliculares (TFH) mediante citometría de flujo.

Después de 7 días de la inmunización, se detectaron los linfocitos GC B y linfocitos TFH que participan de la respuesta de centro germinal. Para esto, las células del bazo recibieron el tratamiento de lisis hipotónica y posteriormente se marcaron con sonda de viabilidad Live/Dead (V500) y se bloquearon con FC-Block (BD Biosciences). Para el panel de linfocitos GC B se utilizaron los anticuerpos de ratón anti-B220 (AF 700, Clon: RA3-6B2), anti-FAS (PerCP-Cy5.5, Clon: SA367H8) y anti-GL7 (APC, Clon: GL7). Panel TFH se utilizaron los anticuerpos anti-B220 (PE-Cy5, Clon: RA3-6B2), anti-CD4 (APC-Cy7, Clon: RM4-5), anti-CXCR5 (BV605, Clon: L138D7), anti-PD-1 (BV421, Clon: 29F.1A12). Después de la tinción, las células fueron lavadas y fijadas con PFA al 2%. Finalmente, las células fueron lavadas nuevamente y resuspendidas en buffer FACS. Los datos fueron analizados en FlowJo y graficados con GraphPad Prism 8.

9.14 Ensayos de memoria y seguimiento de los isotipos en circulación.

9.14.1 Estrategia experimental.

Para los experimentos más prolongados donde se evaluó la cinética de isotipos y la población de linfocitos B de memoria, se administró un refuerzo al día 21 post primera inmunización (**Figura 6**).

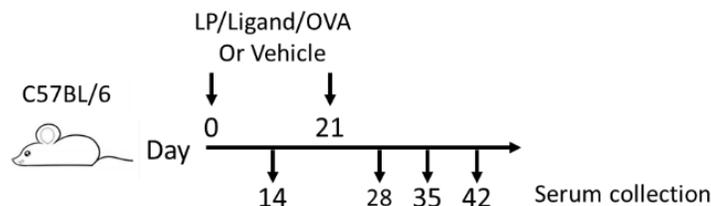


Figura 6. Esquema experimental utilizado en este trabajo. Se utilizaron ratones C57BL/6. Se administraron los tratamientos al día 0 y un refuerzo al día 21. Después de 14, 28, 35, 42 y 60 días post primera inmunización se les extrajo sangre a los ratones para la detección de los distintos isotipos circulantes y al día 60 se sacrificaron para el análisis de las poblaciones de linfocitos B de memoria en bazo o en médula ósea.

9.14.2 Determinación de los títulos de anticuerpo OVA-específicos mediante ELISA. Placas de 96 pocillos (MaxiSorp®) fueron cubiertas con OVA en PBS (1 µg/pocillo) e incubadas toda la noche a 4 °C. Luego, fueron bloqueadas por 2 h a temperatura ambiente con PBS BSA al 1%. El suero fue inicialmente diluido 1:1000 y posteriormente se realizó una dilución seriada 1:2 en PBS BSA 1% desde la columna 1 hasta la columna 11 para ser incubadas durante 1 h a 37°C. La columna 12 se dejó con PBS BSA 1% como blanco. Después de lavar, las placas fueron incubadas con anticuerpos anti-IgG1, -IgG2c, -IgG2b, -IgG3 conjugados a HRP. Las placas fueron leídas a 450/540 nm con lector de placas (Synergy HT, Bio-Tek, USA).

9.14.3 Valores de Aidez Relativa (RAV) de los anticuerpos anti-OVA mediante ELISA por desplazamiento con NH₄SCN.

Para evaluar la afinidad o aidez relativa de los anticuerpos se utilizaron gradientes de NH₄SCN (Chang & cols., 2018). Brevemente, placas previamente activadas con OVA (1 µg/well) durante toda la noche a 4 °C fueron incubadas con suero (1:1000) durante 2 h a 37°C. Después de lavar las placas, los anticuerpos unidos fueron tratados con una solución fresca de NH₄SCN a las concentraciones indicadas (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1, 2, 3, 4 y 5 M) durante 15 min a temperatura ambiente. Después de un lavado extensivo las placas fueron procesadas siguiendo el protocolo de ELISA estándar. La densidad óptica (OD) en los pocillos tratados con NH₄SCN fueron normalizados por la OD del pocillo no tratado. Luego, los RAVs fueron calculados (Chang & cols., 2018). Brevemente, a diferencia entre la OD del pocillo no tratado y el pocillo tratado con 0.1 M de NH₄SCN fue multiplicado por 0.1, la diferencia entre el pocillo tratado con 0.1 M de NH₄SCN y el pocillo tratado con 0.2 M de NH₄SCN fue multiplicado por 0.2, y así, hasta la fracción tratada con 5 M donde fue multiplicado por 6. La suma de todas las diferencias es RAV.

9.14.4 Detección de linfocitos B de memoria (B_{mem}) y células plasmáticas de larga vida.

Al día 60, el bazo de los distintos ratones fue procesado para la identificación de linfocitos B_{mem} . Para esto se utilizó el siguiente panel de anticuerpos de ratón Anti-B220 (Pacific Blue, Clon: RA3-6B2), anti-GL7 (FITC, Clon: GL7), anti-IgM (PE, Clon: RMM-1), anti-IgD (PE-Cy7, Clon: 11-26c.2a), anti-CD138 (PE/Dazzle, Clon: 281-2), anti-CD38 (Alexa Fluor 700, Clon: 90), anti-CD73 (BV605, Clon: TY/11.8), anti-CD80 (BV650, Clon: 16-10A1) (Barnett & cols., 2016; McHeyzer-Williams & cols., 2015; Taylor & cols., 2012). y tetrámeros de OVA (APC-Cy7). La utilización del tetrámero de OVA permite la identificación de linfocitos B OVA-específicos con mayor sensibilidad (Brooks & cols., 2018). Para prepararlo se utilizaron 10 μ g de streptavidina (0.0285 nmoles). Como una molécula de streptavidina contiene 4 sitios de unión, se utilizó una cuatro veces la cantidad de OVA biotinilada (0.114 nmoles) equivalente a 5.142 μ g de la proteína. Los volúmenes de ambos componentes fueron mezclados e incubados durante 2 h a RT en agitación. Posteriormente, fueron almacenados a 4°C hasta su uso.

9.14.5 Detección de Células Secretoras de Anticuerpos (ASCs) antígeno específicas mediante ELISPOT.

La placa de ELISPOT (MAIPS4510, Merck Multiscreen™) es activada con 35 μ L/pocillo de etanol al 75% durante 1 min. Luego, el etanol es removido, la placa lavada 5 veces con PBS y bloqueada con RPMI suplementado durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se siembran 2×10^4 , 2×10^5 y 2×10^6 células/pocillo de cada médula ósea colectadas al día 60. por pocillo. Luego las células son lavadas manualmente con PBS Tween 20 al 0.1% durante 10 min. A continuación, las placas se incuban con los anticuerpos anti-IgG1 HRP o anti-IgG2c biotina en PBS BSA al 1% durante 2 h a RT. Se lava nuevamente 3 veces y se agrega el anticuerpo streptavidina-HRP en PBS BSA al 1% a las células previamente incubadas con anti-IgG2c biotina. Se lava la membrana 4 veces con PBS Tween 20 AL 0.1% y posteriormente se remueve la tapa plástica del fondo para lavar por ambas caras

con agua destilada. Se coloca la base nuevamente, se elimina el excedente de agua contra un papel absorbente y se agregan 100 µl de TMB para ELISPOT (Mabtech). Se incubó el TMB hasta que se observe la aparición de *spots* y detenga la reacción lavando suavemente con PBS Tween 20 al 0.1%. (Shah & cols., 2015). Finalmente, remueva la base plástica para lavar 20 veces con agua corriente. Finalmente, seque las placas dejándolas boca abajo sobre un papel a 4°C para favorecer la definición de los *spots*, hasta su cuantificación manual o automática.

9.15 Cuantificación de los transcritos germinales (GLTs, Germ-line transcripts) mediante qRT-PCR

9.15.1 Extracción de RNA:

A partir de los mismos esplenocitos obtenidos el día 7 post inmunización, se extrajo RNA mediante extracción orgánica con TRIzol® (Invitrogen™) según recomendaciones del fabricante. Brevemente, 50 millones de esplenocitos fueron centrifugados en microtubos de 2 mL a 1600 g x 10 min a 4°C y resuspendidos en PBS frío para lavar las células. Luego, en un 1 mL de TRIzol se disgregaron las células con homogeneizador de rotor y estator (marca X), se agregaron 200 uL de cloroformo en cada muestra y se centrifugaron a 12.500 rpm x 15 min a 4 °C. La fase acuosa fue separada cuidadosamente y transferida a un tubo con isopropanol frío donde se mezcló y se dejó a temperatura ambiente durante 30 min. Las muestras fueron centrifugadas a 10.000 rpm x 10 min a 4 °C y el sobrenadante fue descartado dejando un volumen residual. Los pellets fueron lavados con etanol 70% y centrifugados a 7600 rpm x 5 min a 4°C. Finalmente, los pellets se dejaron secar durante 15 min a temperatura ambiente, se resuspendieron con 50 µL de agua libre de nucleasas y fueron almacenados a -80°C hasta su uso.

9.15.2 Síntesis de cDNA:

Los RNAs fueron tratados con DNasa I (Promega®) según recomendación del fabricante. Brevemente, 100 ng de RNA fue tratado con 200 u/uL de DNasa I durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, la reacción fue detenida con 1 uL de solución stop incubando a 65 °C durante 10 min. El RNA libre de nucleasas fue utilizado de

templado para la síntesis de cDNA con random primers (Invitrogen®) según recomendaciones del fabricante. Brevemente, el RNA tratado fue incubado con 100 ng de random primers (Invitrogen®), 200 U/μL M-MLV y DTT durante 50 min a 37 °C. Para detener la reacción el cDNA fue incubado durante 15 min a 70 °C y almacenado a -20°C hasta su uso.

9.15.3 qPCR:

se utilizó el kit SYBR Green Master Mix 2X (Bioline XX) según recomendación del fabricante. Brevemente, 12.5 μL de SYBR green master mix, 1 μL de partidor *forward* (200 nmoles), 1 μL de partidor *reverse* (200 nmoles) y agua libre de nucleasas hasta completar 25 μL de volumen de reacción. La secuencia nucleotídica de los partidores se seleccionó considerando el transcrito de línea germinal (GLT) de cada isotipo (**Tabla 7**). Los valores de Cq (cycle quantitative) obtenidos fueron normalizados con los Cq de la condición control y relativos a Ubiquitina C (Ubc) mediante la ecuación de Pfaff (Pfaff, 2000). Los análisis estadísticos fueron realizados mediante GraphPad Prism.

Tabla 7. Secuencias de partidores utilizada para la amplificación de los distintos transcritos de línea germinal (GLT) que codifican para cada isotipo.

Name	nucleotide sequence 5' > 3'
GLT-IgG1 Fw GLT-IgG1 Rv	CGA GAA GCC TGA GGA ATG TGT GGA GTT AGT TTG GGC AGC AGA T
GLT-IgG2c Fw GLT-IgG2c Rv	GGA CCA CTA AAG CTG CTG ACA CAT AAC CCT TGA CCA GGC ATC CT
GLT-IgG3 Fw GLT-IgG3 Rv	GAC CAA ATT CGC TGA GTC ATC A ACC GAG GAT CCA GAT GTG TCA
GLT-mu Fw GLT-mu Rv	TCT GGA CCT CTC CGA AAC CA ATG GCC ACC AGA TTC TTA TCA GA
GLT IgG2b Fw GLT IgG2b Rv	CGC ACA CCT ACA GAC AAC CAG GTC ACA GAG GAA CCA GTT GTA TC
Act B Fw Act B Rv	CGT GAA AAG ATG ACC CAG ATC A TGG TAC GAC CAG AGG CAT ACA G
Ubc Fw Ubc Rv	GCC CAG TGT TAC CAC CAA GA CCC ATC ACA CCC AAG AAC A

10 Resultados

10.1 Las preparaciones liposomales contienen ligandos de célula iNKT y Ovalbumina (OVA) anclada en su superficie.

El uso de liposomas (LPs), para una eficiente entrega de α GC, ha permitido evaluar de forma precisa la contribución de las células iNKT en la respuesta humoral (Chang & cols., 2011; Chen & cols., 2018). Para evaluar cómo la activación diferencial de estas células por distintos ligandos impacta en la respuesta de linfocitos B, desarrollamos LPs que presentan Ovalbumina (OVA) en su superficie (LP/OVA) y un ligando de iNKT embebido en su membrana (LP/OVA/ligando). Las preparaciones liposomales analizadas mediante Nanotracking Analysis (NTA) determinaron que todas las preparaciones evaluadas de LP/OVA/ligando miden alrededor de 130-250 nm (**Fig.7A-B**). La concentración promedio de cada preparación está entorno a las 1×10^8 - 1×10^9 partículas/mL. Si se considera que cada dosis contiene 4 nmoles de glicolípido y se resuspende una cantidad equimolar para 10 dosis (40 nmoles) en 0.1 mL, hay 4 nmoles ligando por cada 1×10^6 - 1×10^7 partículas liposomales (dato no mostrado).

El análisis mediante STEM confirmó que las preparaciones presentan una forma esférica (**Fig. 7C**). Las imágenes obtenidas por esta técnica, los análisis por NTA (**Fig. 7B**) y los índices de polidispersidad (Pdl) (**Fig. 7D**) confirman que las preparaciones son heterogéneas. Los análisis de potencial Z muestran que los liposomas *per se* contienen una carga negativa que disminuye cuando se conjuga OVA en su superficie (**Fig. 7E**). Este comportamiento en las cargas de la membrana sugiere que la reacción de anclaje mediante biotina-estreptavidina de OVA podría estar favoreciendo la unión entre liposomas.

La cantidad de OVA presente en cada LP/OVA fue determinada mediante ELISA sembrando distintas diluciones de las suspensiones liposomales comparando con una curva de OVA de concentración conocida y LPs sin OVA (**Fig. 7F**). En adición, fue posible detectar la presencia de OVA en la superficie de las preparaciones liposomales mediante citometría de flujo, utilizando anticuerpos anti-OVA

conjugados a Fluoresceína (FITC) e histogramas para identificar si hubo un anclaje parcial o total de OVA en los LPs. Siempre que se utilizaron preparaciones frescas de OVA biotinilada en relaciones 2:1:2 con estreptavidina y LPs biotinilados, respectivamente, se logra el desplazamiento completo de fluorescencia. A modo de ejemplo, se muestran los histogramas para las preparaciones con aGC y AH10-7 (**Fig. 7G**). para este último ensayo se utilizaron como control, preparaciones de LP/OVA sin anti-OVA FITC y LPs sin OVA.

10.2 Los LP/OVA pueden ser presentados por DCs y linfocitos B a través de CD1d *in vitro*.

Para evaluar si las APCs son capaces de capturar estos LPs y presentar los glicolípidos a células iNKT *in vitro*, generamos DCs a partir de médula ósea. Estas células fueron co-incubadas durante 24 h, en misma proporción, con hibridomas de célula iNKT y se cuantificó IL-2 en el cultivo como parámetro de activación. Las DCs estimuladas con LP/OVA/ligando activaron células iNKT *in vitro* (**Fig. 8A**), demostrando que las preparaciones pueden ser incorporadas y el glicolípido presentado por CD1d. Los LPs con AH10-7 también activaron a los hibridomas de célula iNKT, sin embargo, su activación fue ligeramente menor (**Fig. 8A**). Hubiera sido interesante evaluar en este mismo ensayo el efecto de administrar LPs con OVA sin ligandos para confirmar que la activación de las células iNKT es independiente de OVA.

Adicionalmente, evaluamos si la OVA conjugada en los LPs puede ser capturado, procesado y presentado a linfocitos T. Para esto, esplenocitos derivados de ratones OT-1 fueron pre-incubados con las preparaciones durante 24 h (**Fig. 8B**).

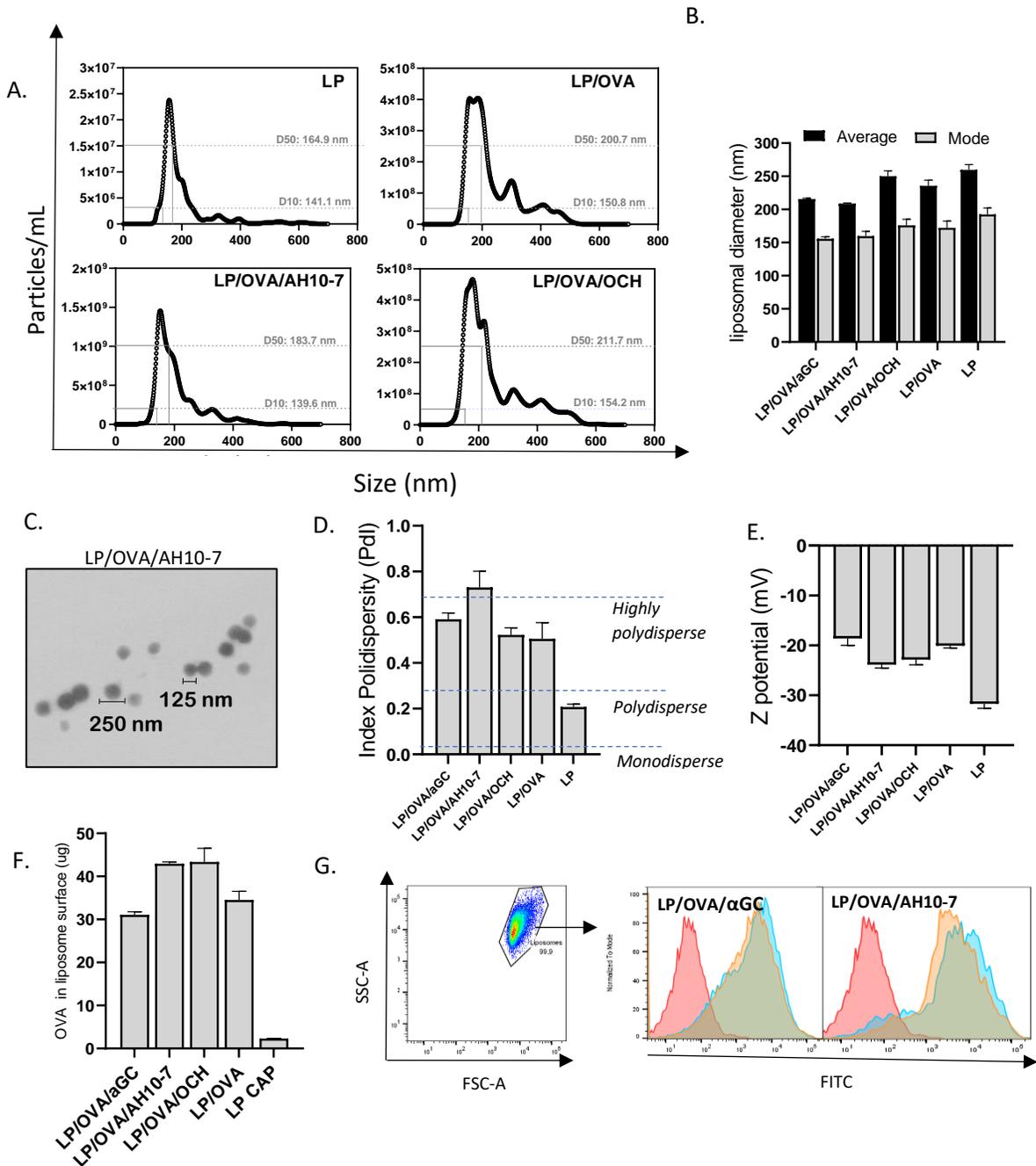


Figura 7. Propiedades fisicoquímicas de los LP/OVA/ligando. A.) Distribución de tamaños de los LPs por Nanotracking Analysis (NTA) y B.) Tamaño promedio y moda de los LPs. El decil 10 y el decil 50 son mostrados en A. C.) Morfología representativa de los LPs por STEM. D.) índice de polidispersidad (PdI) de los liposomas, indicando los rangos de muestra monodispersa (>0.1), polidispersa (>0.3) y altamente polidispersas (>0.7) y E.) Potencial Z de las preparaciones. F.) Cantidad de OVA anclado en los LPs determinado por ELISA utilizando una curva estándar de OVA de concentración conocida. G.) Detección de OVA en la superficie de los LPs con αGC y AH10-7 a modo de ejemplo por citometría de flujo. Se utilizaron anticuerpos anti-OVA acoplados a FITC para su detección. Se muestran por duplicado las muestras positivas para OVA (celeste y anaranjado) en cada preparación analizada y una de las preparaciones sin el anticuerpo anti-OVA (rojo).

Observamos que los linfocitos T de ratones OT1 incubados con LP/OVA/AH10-7 secretan IL-2 al cultivo, indicando que las APCs contenidas en el bazo captan la de las preparaciones y los presentan a los linfocitos T residentes. En este ensayo, la incorporación de un control utilizando LPs sólo con OVA nos hubiera permitido definir si la presencia del glicolípido *per se* puede favorecer la magnitud con la que se activan los linfocitos T o el nivel de incorporación por parte de las APCs.

Para demostrar que los linfocitos B son capaces de presentar los glicolípidos provenientes de los LP/OVA/ligando a células iNKT, administramos los LPs *in vivo* y 7 días después los linfocitos B fueron purificadas mediante selección negativa y co-incubados con hibridomas de célula iNKT. Después de 48 h, fue posible detectar anticuerpos anti-OVA del isotipo IgG2c en el cultivo (**Fig. 8C**), además de anticuerpos del isotipo IgG1 e IgM en similares niveles (dato no mostrado). Interesantemente, los valores de absorbancia se redujeron casi a la mitad cuando la misma cantidad de linfocitos B es incubado en ausencia de células iNKT (**Fig. 8C**), indicando que, en parte, la secreción observada es dependiente de contacto con estas células. Los linfocitos B derivados de ratones tratados con el adyuvante MPLA y OVA, liberaron una cantidad similar de anticuerpo tanto en presencia como en ausencia de células iNKT, sugiriendo un mecanismo de activación T-independiente por TLRs que reconocen MPLA.

Adicionalmente, la IL-2 liberada al cultivo fue cuantificada para evaluar si este incremento en la secreción de anticuerpos podría ser dependiente de células iNKT (**Fig. 8D**). La co-incubación de células B-iNKT mostró un mayor incremento en los niveles de IL-2 cuando los LP/OVA administrados contienen α GC, en relación con los LP/OVA sin glicolípido o en el tratamiento con MPLA/OVA. Cuando está presente un proporción mucho mayor de células iNKT en el co-cultivo, se libera IL-2 incluso en el co-cultivo con linfocitos B proveniente de ratones inmunizados con PBS, sugiriendo un mecanismo inespecífico de auto-activación cuando están en mayor densidad. El tratamiento con MPLA y OVA no produjo un incremento de IL-2, reforzando la idea que la secreción de anticuerpos observada con este adyuvante es dada por un mecanismo independiente de CD1d.

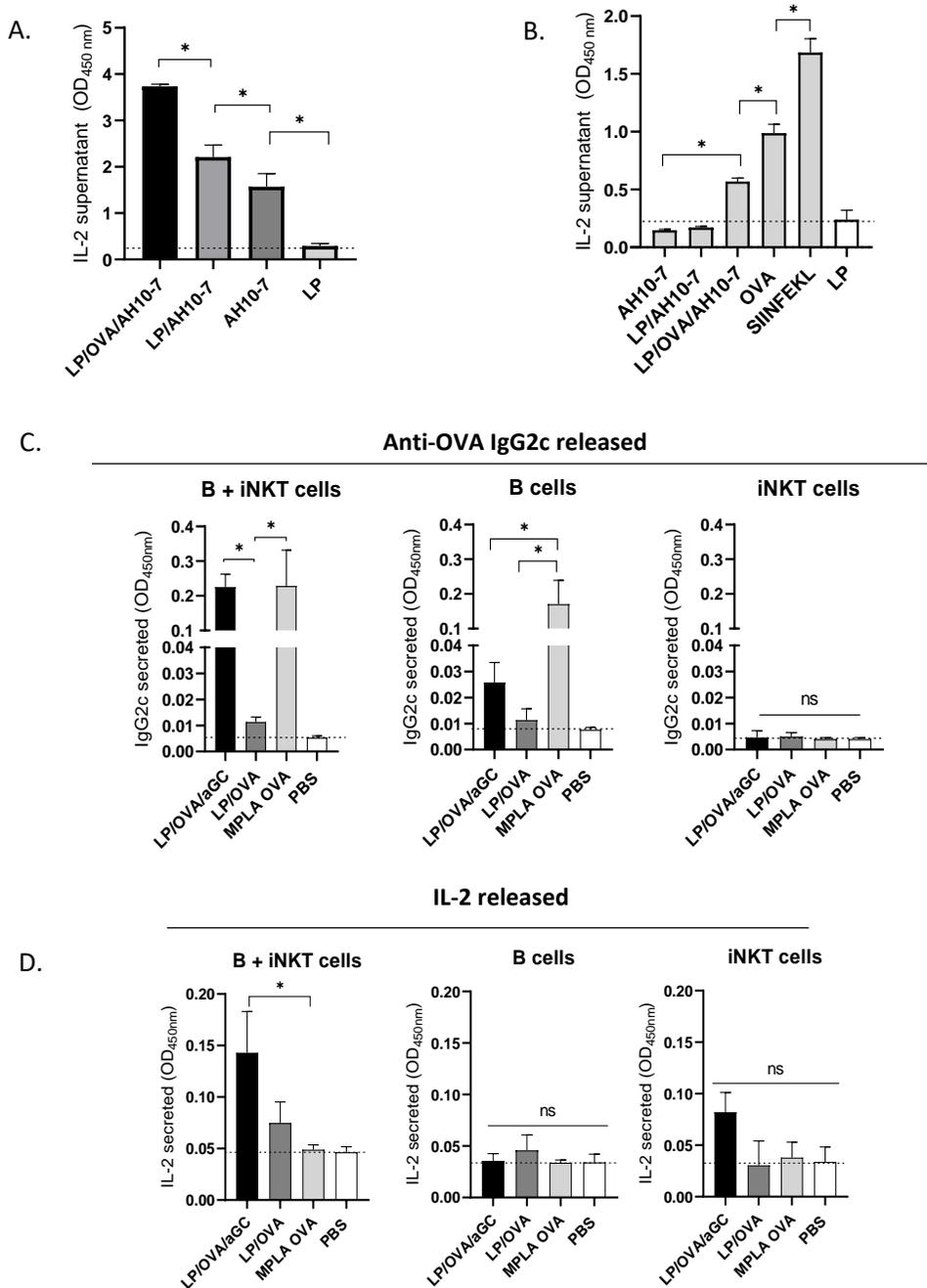


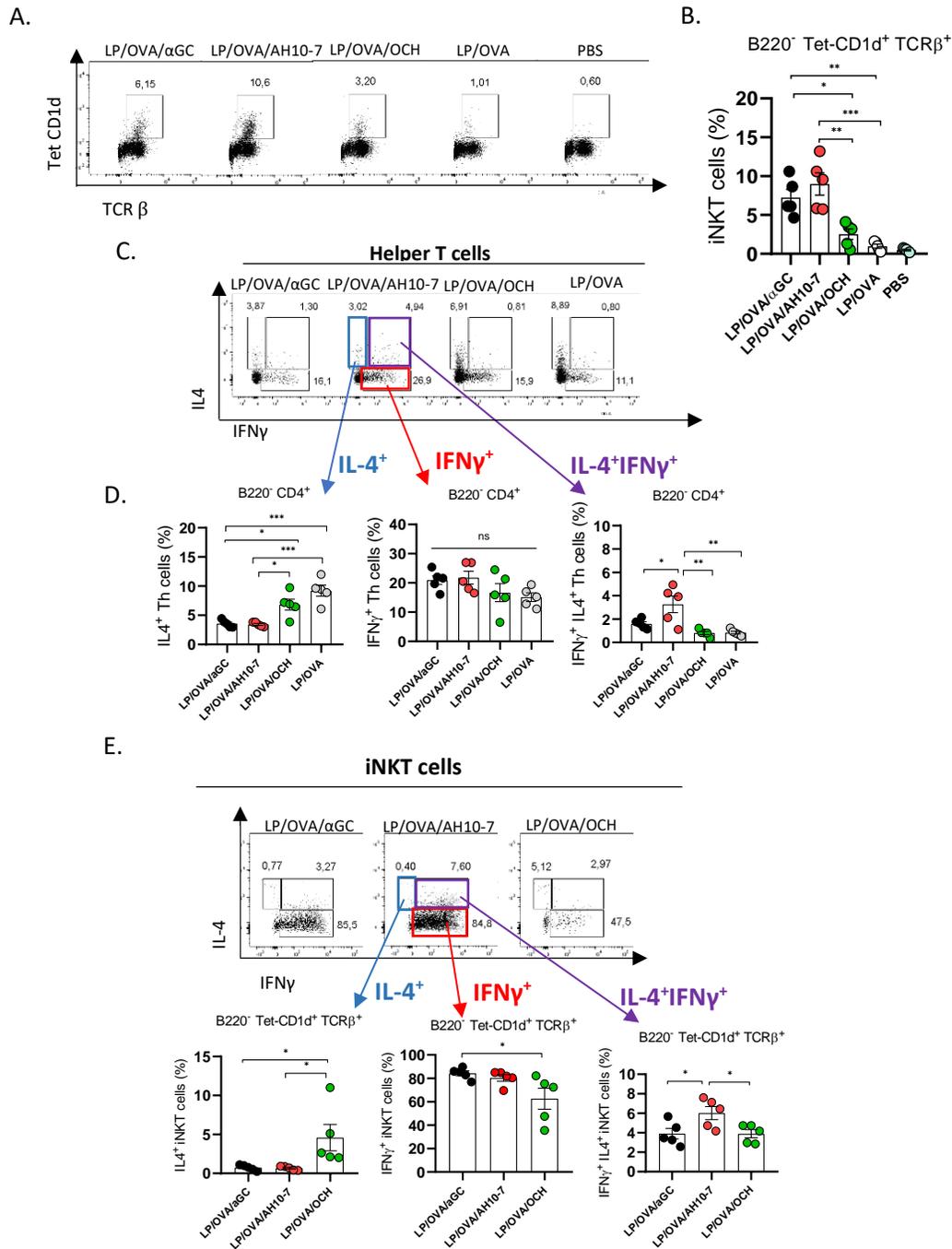
Figura 8. Evaluación de la bioactividad de los LPs in vitro. A.) Activación de células iNKT por DCs cargadas con glicolípidos. 10 nM de AH10-7 fue utilizado. B.) Activación de linfocitos Th derivados de ratones OT-1 por LP/OVA. 50 ug/mL de OVA y 20 nM del péptido SIINFEKL fueron utilizados. C.) Secreción de anticuerpos anti-OVA IgG2c por la co-incubación entre células iNKT-B. D.) Liberación de IL-2 por la co-incubación entre células iNKT-B. Los ensayos para medir IL-2 (Figuras A, B y D) fueron determinados utilizando anticuerpos de captura anti-IL2 por ELISA sándwich. Los ensayos para medir IgG2c (Figura C) fueron determinados usando anticuerpos anti-OVA y luego anti-IgG2c por ELISA indirecto. La significancia estadística fue determinada utilizando T-student no paramétrico Mann-Withnney two-ways comparando entre pares. * $p > 0.05$ ($n=3$).

Estos datos en conjunto demuestran que fue posible generar LPs esféricos que miden entre 150-250 nm cuando OVA está anclada y presenta glicolípidos capaces de activar células iNKT a través de DCs. Interesantemente, cuando linfocito B derivados de ratones previamente inmunizados son co-incubados con hibridomas de célula iNKT, se detecta una mayor secreción de anticuerpos a cultivo, pudiendo ser debido a una ayuda mediada por CD1d.

10.3 Los LP/OVA/ligando promueven distinta expansión de células iNKT dependiendo del ligando en los primeros días, pudiendo generar células secretoras de IFN γ e IL-4.

Para determinar la capacidad de los LP/OVA/ligando de activar células iNKT *in vivo*, se prepararon distintas versiones con α GC, AH10-7, OCH o sin glicolípidos, y después de la inmunización intravenosa se evaluó la expansión de células iNKT de bazo al tercer día (**Fig. 9**). Se determinó que cada ligando induce en distinta proporción la expansión de estas células siendo de mayor a menor AH10-7 > α GC > OCH (**Fig. 9A**).

Las células iNKT pueden ayudar en la activación de linfocitos B de manera directa a través de interacciones célula-célula, y de manera indirecta induciendo la aparición de linfocitos Th (Th) a través del licenciamiento de DCs. Para evaluar esto, medimos primero la producción intracelular de IFN- γ e IL-4 por células Th (**Fig. 9C**). Los LP/OVA con OCH (y LP/OVA sin glicolípido), como se esperaba, indujeron la mayor expansión de linfocitos Th productores de IL-4, en comparación a los tratamientos con α GC y AH10-7 (**Fig. 9D**, izq). Interesantemente, los LP/OVA con AH10-7 promovieron la mayor expansión de linfocitos Th doble positivos, es decir, que producen IFN γ e IL-4 (**Fig. 9D**, der). Cuando se evaluó la producción de citoquinas por iNKT (**Fig. 9E**) se observó que los LP/OVA con OCH también inducen la mayor expansión de células IL-4⁺ (**Fig. 9F** izq.). Más de un 80% de las células iNKT produjo IFN γ cuando fueron activadas con α GC, AH10-7, y en menor extensión, OCH (**Fig. 9E**, cen.), sugiriendo que el IFN γ liberado en el bazo es producido principalmente por estas células al tercer día. Una población doble positiva (IFN γ ⁺ IL-4⁺) fue nuevamente detectada y significativamente inducida por



los LP/OVA con AH10-7 en comparación con los otros ligandos (**Fig. 9E** der.).

Estos datos juntos indican que las células iNKT, al igual que las Th, incrementan la producción de IL-4 cuando OCH es administrado y, por otro lado, presentan una fuerte producción de IFN γ , principalmente por α GC y AH10-7, siendo este último también capaz de expandir una población doble positiva.

10.4 La administración de LP/OVA con AH10-7 y OCH promueven la producción preferencial de IgG2c e IgG2b, respectivamente, a tiempos tempranos.

Ya que los LP/OVA/ligando inducen una producción temprana y diferencial de citoquinas por iNKT, evaluamos si estas diferencias en el perfil de citoquinas pueden influir en la magnitud y en los tipos de anticuerpos circulantes al día 7, tiempo en el que se alcanza el *peak* de anticuerpos (Pape & cols., 2003). Para esto, determinamos mediante titulación inversa la cantidad de anticuerpos OVA-específicos del isotipo IgM, IgA, IgE y de los subtipos de IgG: IgG1, IgG2c, IgG2b e IgG3 por ELISA (**Fig. 10**). Encontramos que el isotipo IgM alcanzó un título similar por los distintos glicolípidos, sólo destacándose de los LP/OVA sin ligando (**Fig. 10E**). No fue posible detectar anticuerpos anti-OVA del isotipo IgE ni IgA en suero (**Fig. 10F**), por lo que no se hicieron mediciones posteriores de estos.

Cuando se midieron las subclases de IgG, se encontró que IgG3, el isotipo que participa como potente activador del complemento, fue producido mayoritariamente por α GC y AH10-7 (**Fig.10B**). IgG2c, que potencia la actividad fagocítica de las células, fue generado principalmente por AH10-7 seguido de α GC (**Fig.10A**). IgG1, el isotipo que activa receptores FC γ inhibidores, es inducido por todos los tratamientos sin diferencias significativas (**Fig. 10C**). Interesantemente, IgG2b, el isotipo con afinidad intermedia por los receptores FC activadores, fue el único subtipo de IgG inducido por OCH que alcanzó niveles comparables de títulos con los otros glicolípidos (**Fig. 10D**), a pesar de inducir una expansión mucho menor de células iNKT (**Fig. 9B**). Un resumen de todos los isotipos producidos por cada tratamiento es mostrado (**Fig. 10G**)

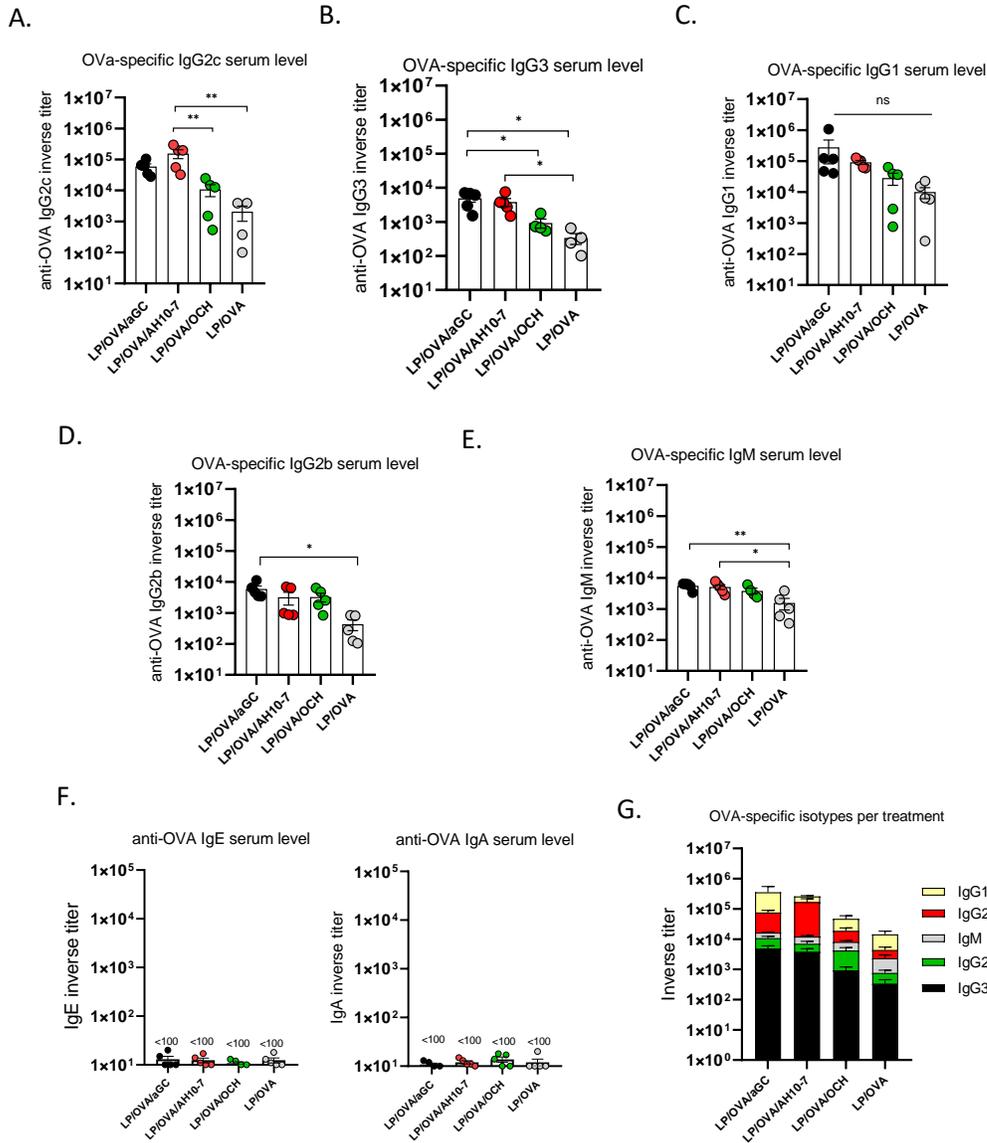


Figura 10. Niveles de anticuerpos anti-OVA circulantes producidos por la administración de los LP/OVA/ligandos al día 7. Título inverso de los anticuerpos anti-OVA del isotipo **A.)** IgG2c **B.)** IgG3 **C.)** IgG1 **D.)** IgG2b **E.)** IgM e **F.)** IgE y IgA. **G.)** Un resumen de todos los isotipos detectados es mostrado apilado por tratamiento. Los niveles de isotipos fueron determinados utilizando ELISA indirecto OVA-específico. Las significancias estadísticas fueron determinadas utilizando ANOVA One-way con test post-hoc Tukey* $p > 0.05$. (5 ratones por condición, $n=2$).

10.5 La activación de células iNKT por AH10-7 y α GC generan niveles sostenidos de IgG2c, y la activación por OCH prolonga transitoriamente los niveles de IgG2b.

Ya que la activación de células iNKT por diferentes ligandos puede incrementar los títulos de anticuerpos en distinta magnitud (**Fig. 10**), quisimos evaluar si estas diferencias se sostienen o pierden en el tiempo. Para hacer esto, administramos un refuerzo al día 21 y luego medimos los niveles de anticuerpos circulantes por un período de 60 días (**Fig. 11**). Las principales diferencias entre los LP/OVA/ligandos fueron observadas al día 28 después de inmunizar. Los LP/OVA con α GC y AH10-7 promovieron una producción sostenida de IgG2c (**Fig. 11A**) y transitoria de IgG3 (**Fig. 11B**) en comparación a los otros tratamientos. Los LP/OVA con OCH levantaron niveles significativos de IgG2b en comparación a los LP/OVA sin ligando al día 28 (**Fig. 11C**). Cuando comparamos los niveles de IgG1 a través del tiempo, encontramos que los distintos glicolípidos inducen en similar magnitud este isotipo, sin embargo, en ausencia de ligandos, los títulos son menores sin el refuerzo (**Fig. 11D**). Por lo tanto, las diferencias observadas tempranamente en general son sostenidas por al menos 60 días.

Adicionalmente, realizamos la misma cinética con ratones knock-out para CD1d con el fin de evaluar si las diferencias observadas entre los títulos de anticuerpos eran dependiente de células iNKT (**Fig. 11E-H**). En el ensayo comparamos los títulos producidos por el tratamiento con AH10-7 en relación con el tratamiento sin glicolípidos, y no encontramos diferencias significativas.

10.6 Un refuerzo con LP/OVA/AH10-7 incrementa más la maduración de afinidad de los anticuerpos que los otros ligandos

Ya que la activación de células iNKT por diferentes ligandos incrementa la transcripción de AID e induce la formación de centros germinales, quisimos evaluar cómo la incorporación de distintos glicolípidos y la administración de un refuerzo influyen en la maduración de afinidad de los anticuerpos (**Fig. 12**). Como en el suero hay anticuerpos policlonales que reconocen OVA, un concepto más correcto que afinidad, es hablar de avidéz, porque considera la sumatoria de todos los

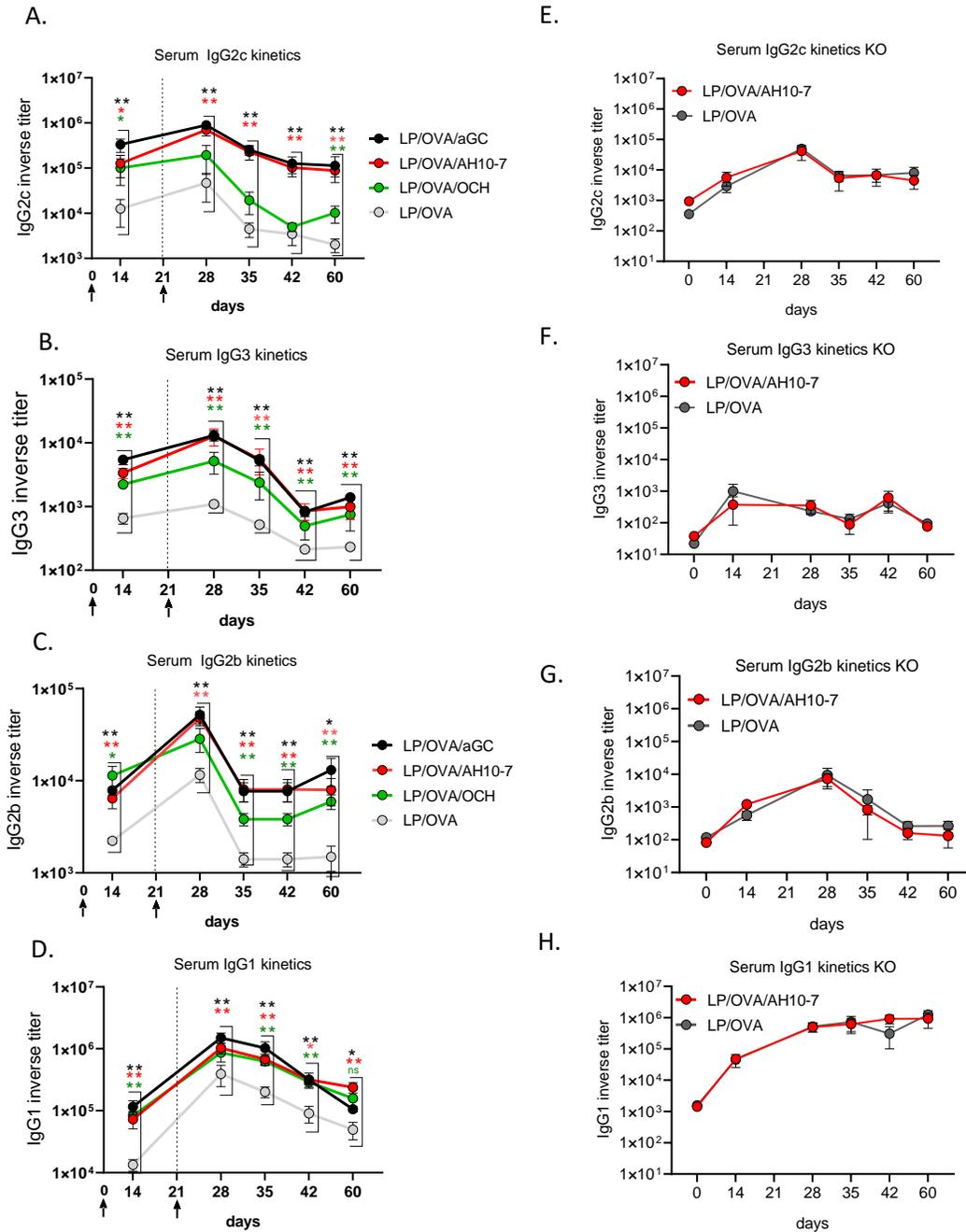


Figura 11. Niveles de anticuerpos anti-OVA circulantes producidos por los LP/OVA/ligandos durante 60 días por ratones C57BL/6 nativos y Knock-out para CD1d. Los títulos inversos de los anticuerpos fueron medidos 14-, 28-, 35-, 42- and 60-días post inmunización. Los ratones recibieron un refuerzo al día 21. Niveles de A.) IgG2c, B.) IgG3, C.) IgG2b e D.) IgG1 circulantes de ratones C57BL6 nativos. Niveles de E.) IgG2c, F.) IgG3, G.) IgG2b e H.) IgG1 circulantes de ratones KO-CD1d. Las diferencias significativas fueron determinadas usando Two-way ANOVA con comparación múltiple de Tukey, con varianzas individuales computadas por cada comparación. * $p > 0.05$. (5 ratones por condición, $n=3$).

anticuerpos OVA-específicos en lugar de estudiar la unión entre un solo anticuerpo-epítipo. Obtuvimos los Valores de Aidez Relativa (RAVs) que tienen los anticuerpos anti-OVA IgG2c e IgG1 por OVA después de la primera inmunización (día 14) y los comparamos con el RAVs de los anticuerpos después de un refuerzo (día 28) (**Fig. 12A**). Observamos que los LP/OVA con AH10-7 aumentaron significativamente la aidez relativa de los isotipos IgG2c e IgG1 desde el día 14 en comparación a los LP/OVA sin ligando (**Fig. 12C**). Después del refuerzo, los RAVs de IgG2c incrementaron significativamente en los ratones que recibieron α GC y AH10-7.

Notablemente, los anticuerpos IgG1 provenientes de los ratones inmunizados con LP/OVA/AH10-7 mostraron un mayor aumento en el RAV por OVA, diferenciándose incluso de los LP/OVA con α GC (**Fig. 12D**). Estos datos indican que las células iNKT contribuyen en la maduración de afinidad incluso después de un refuerzo.

10.7 La activación de células iNKT por LP/OVA con AH10-7 induce tempranamente la transcripción de AID y una mayor expansión de linfocitos TFH.

La recombinación por cambio de clase requiere la transcripción temprana de AID para participar junto a los transcritos de *switch*. Al medir los niveles de AID al día 3 encontramos que todos los LP/OVA con glicolípidos inducen mayores niveles de AID que en ausencia de ligandos (**Fig. 13A**). Cuando medimos la transcripción de AID al día 7, detectamos un aumento exponencial incluso en el tratamiento sin glicolípidos (**Fig. 13A**), sugiriendo que AID podría estar siendo reclutada en los procesos de hipermutación somática dentro de nuevos centros germinales. Para evaluar esto, medimos el porcentaje de linfocitos B de Centro Germinal (GC B) y linfocitos T helper foliculares (TFH) 7 días después de la administración de LP/OVA/ligandos.

Los LP/OVA/ligandos son capaces de inducir la formación de centros germinales (**Fig. 13**). Los tratamientos con α GC, y mayormente AH10-7, promovieron la mayor

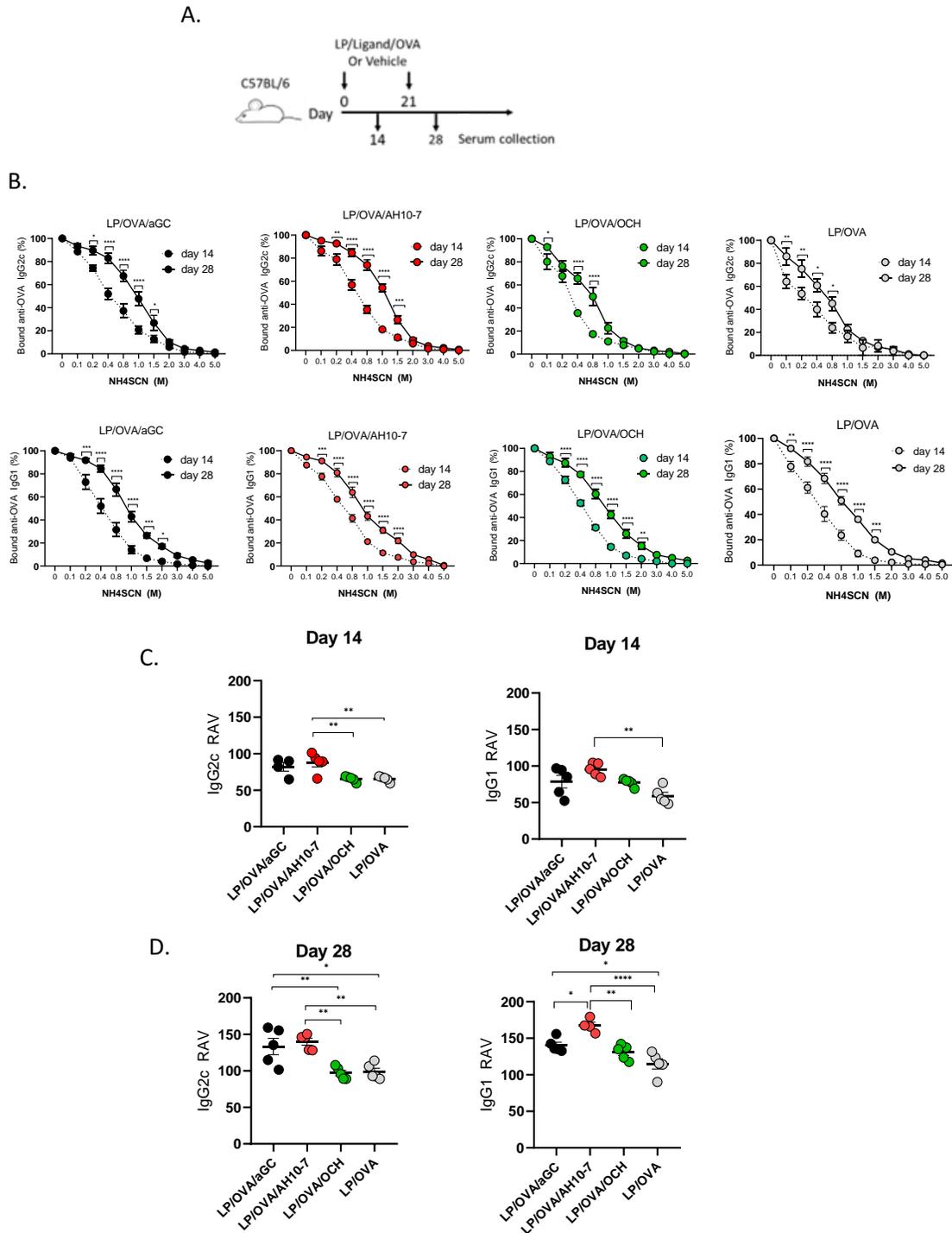


Figura 12. Maduración de afinidad de los anticuerpos anti-OVA IgG1 e IgG2c generados por la administración de los LP/OVA/ligandos, 14- and 28-días post inmunización. A.) Esquema de inmunización. Las absorbancias obtenidas a cada concentración de NH4SCN fueron convertidas a porcentaje para determinar la cantidad de anticuerpo unido a la placa. **B.)** Niveles de anticuerpos OVA-específicos de IgG2c e IgG1 unidos a la placa. **C.)** Valores de avidéz relativa (RAVs) obtenidos al día 14 y **D.)** Día 28 post inmunización. Las significancias estadísticas fueron determinadas utilizando ANOVA one-way con post-hoc Tukey * $p > 0.05$. (5 ratones por condición, $n=3$).

expansión de linfocitos TFH (**Fig. 13B**). Por otro lado, los linfocitos GC B fueron inducidos en similar magnitud por los distintos LP/OVA con glicolípidos, solo diferenciándose de los LP/OVA sin ligandos (**Fig. 13C**). Estos datos indican que los linfocitos TFH son más “sensibles” o respondedores que los linfocitos GC B a las señales entregadas por las células iNKT cuando son activadas por distintos ligandos.

10.8 La activación de células iNKT por AH10-7 y OCH promueven la mayor expansión de linfocitos B que cambia de clase hacia IgG2b o IgG2b, respectivamente.

A continuación, evaluamos cómo la administración de distintos LP/OVA/ligando influyen en la expansión de los linfocitos B que cambia de clase (sw-B) en el bazo (**Fig. 14**). El porcentaje de linfocitos sw-B incrementa cuando se incorporan glicolípidos en los LP/OVA (**Fig.14A-B**). Es posible identificar todos los subtipos de IgG en la superficie de estas células (**Fig. 14D-H**), sugiriendo que estos plasmoblastos serían los productores de los anticuerpos circulantes detectados (**Fig. 10**). En el caso de los linfocitos sw-B IgG2c⁺, AH10-7 fue el ligando que indujo la mayor expansión de estas células (**Fig. 14E**), correlacionándose con los niveles de IgG2c circulantes (**Fig. 14A**). Los linfocitos sw-B que expresan IgG3 o IgG1 son principalmente expandidos por α GC y AH10-7, y en menor magnitud por OCH en relación con los LP/OVA sin ligando (**Fig. 14F, 14G**). OCH, nuevamente, indujo una y similar y significativa expansión de linfocitos sw-B IgG2b⁺ en comparación con los otros glicolípidos (**Fig. 14H**). Como los ensayos de suero mostraron (**Fig. 14**), los LP/OVA con OCH inducen similares niveles de IgG2b circulantes que los demás LP/OVA con ligandos.

Si se clasifica el 100% de los linfocitos sw-B por cada subtipo de IgG (**Fig. 14I**), se observa que todos los tratamientos muestran, como se esperaba, una reducción de la población IgM⁺ y una importante expansión de linfocitos B IgG1⁺ (amarillo). Los LP/OVA sin glicolípido mantienen una importante población IgM⁺ (gris), exhibiendo menor capacidad de inducir cambio de clase. Estos datos en conjunto demuestran que es posible aumentar la expansión de linfocitos sw-B y cambiar la proporción de

los distintos subtipos de IgG producidos dependiendo del glicolípido utilizado para activar a las células iNKT.

10.9 La activación de células iNKT por LPs con α GC y AH10-7 promueven el mayor porcentaje de linfocitos B_{mem} OVA-específicos y Células Secretoras de Anticuerpos (ASCs).

Para evaluar si la modulación de isotipos por células iNKT es conservada en linfocitos B_{mem} y células plasmáticas, se evaluó la población IgM⁻IgD⁻ OVA-específica 60 días después inmunizar (sw-B_{mem}) (**Fig. 15**). Anteriormente, en el laboratorio habíamos intentado identificar esta población de linfocitos B OVA-específica utilizando OVA AlexaFluor488, sin embargo, esta no nos permitió diferenciar la población B_{mem} tratados de los no tratados. Para abordar esto, evaluamos dos estrategias: la primera, fue utilizar la OVA fluorescente con mayor *staining index* disponible, la OVA AlexaFluor647. La segunda estrategia fue diseñar y utilizar tetrámeros de OVA biotinilada unidos a estreptavidina acoplada a fluoróforo (**Figura 15A**).

Lo primero que identificamos es que la estrategia con tetrámeros de OVA (tetra-OVA) nos permite identificar un mayor porcentaje de células que con la OVA fluorescente (**Fig. 15D**), sin embargo, resulta más inespecífico ya que aumentan el porcentaje de células en el tratamiento con PBS (**Fig. 15D**, abajo). Los ratones que recibieron los LP/OVA con α GC y AH10-7 presentaron el mayor porcentaje de linfocitos B_{mem} que cambiaron de clase (**Fig. 15C**), sin embargo, no se observaron diferencias en la población B_{mem} IgM⁺ entre los tratamientos ni a nivel de células plasmáticas (**Fig. 15B**).

Cuando los linfocitos B son activados por antígenos, estos pueden diferenciarse a Células secretoras de anticuerpos (ASCs) de vida corta a través de una respuesta extrafolicular. Algunas de estas ASCs, generalmente producidas dentro de centros germinales, pueden migrar a la médula ósea y llegar a ser células de larga vida

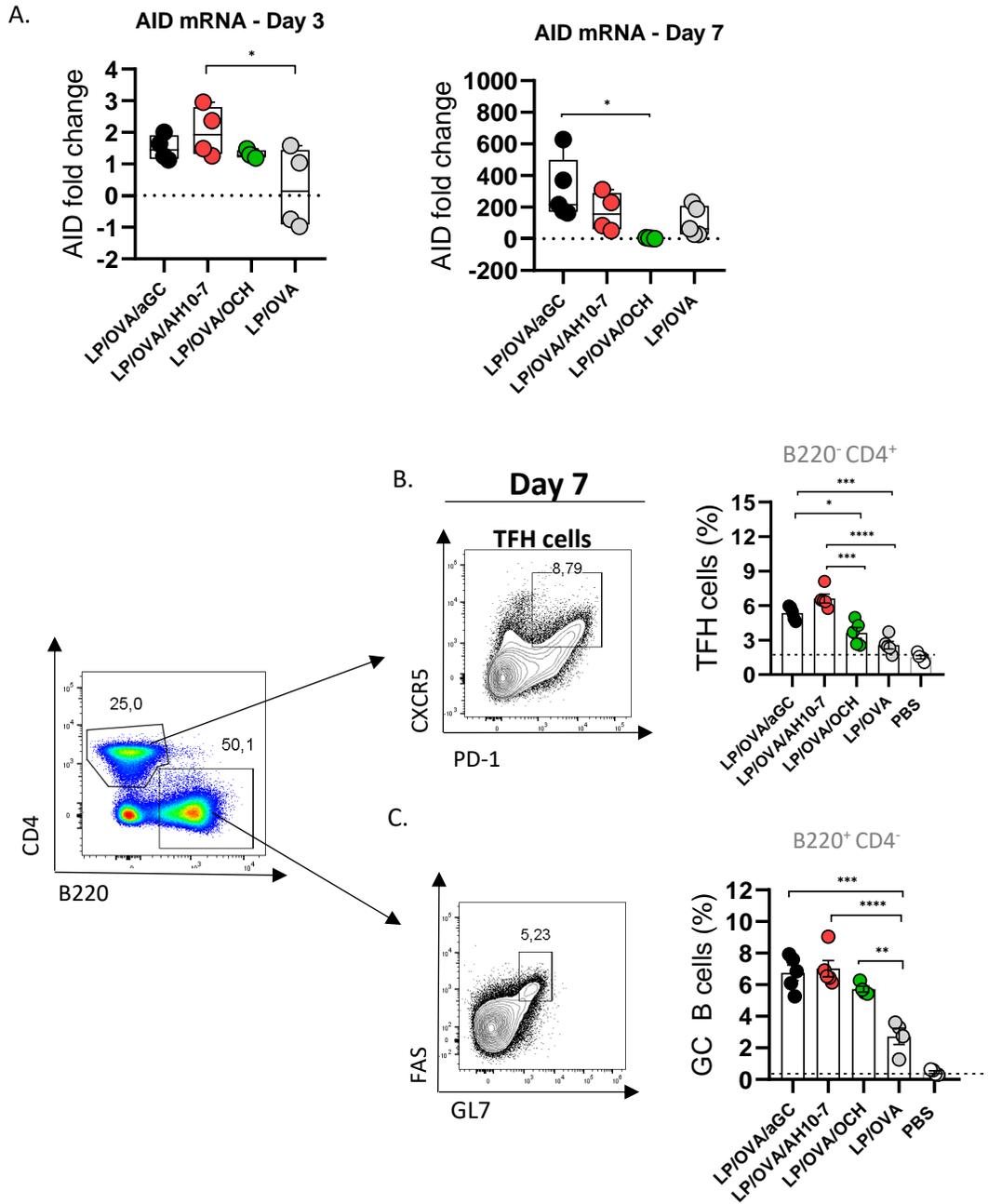


Figura 13. Respuesta de Centro Germinal producida por los LP/OVA/ligandos al día 7. A.) Veces de cambio en la expresión de AID al día 3 y al día 7 post inmunización determinado por qPCR. B.) Dotplot (izq.) y porcentaje (der) de linfocitos TFH CXCR5⁺ PD1⁺ identificadas en el gate B220⁻CD4⁺ C.) Dotplot (izq.) y porcentaje (der) de linfocitos GC B FAS⁺GL7⁺ identificadas en el gate B220⁺CD4⁻. Las significancias estadísticas fueron determinadas utilizando ANOVA one-way con post-hoc Tukey * p>0.05. (5 ratones por condición, n=2).

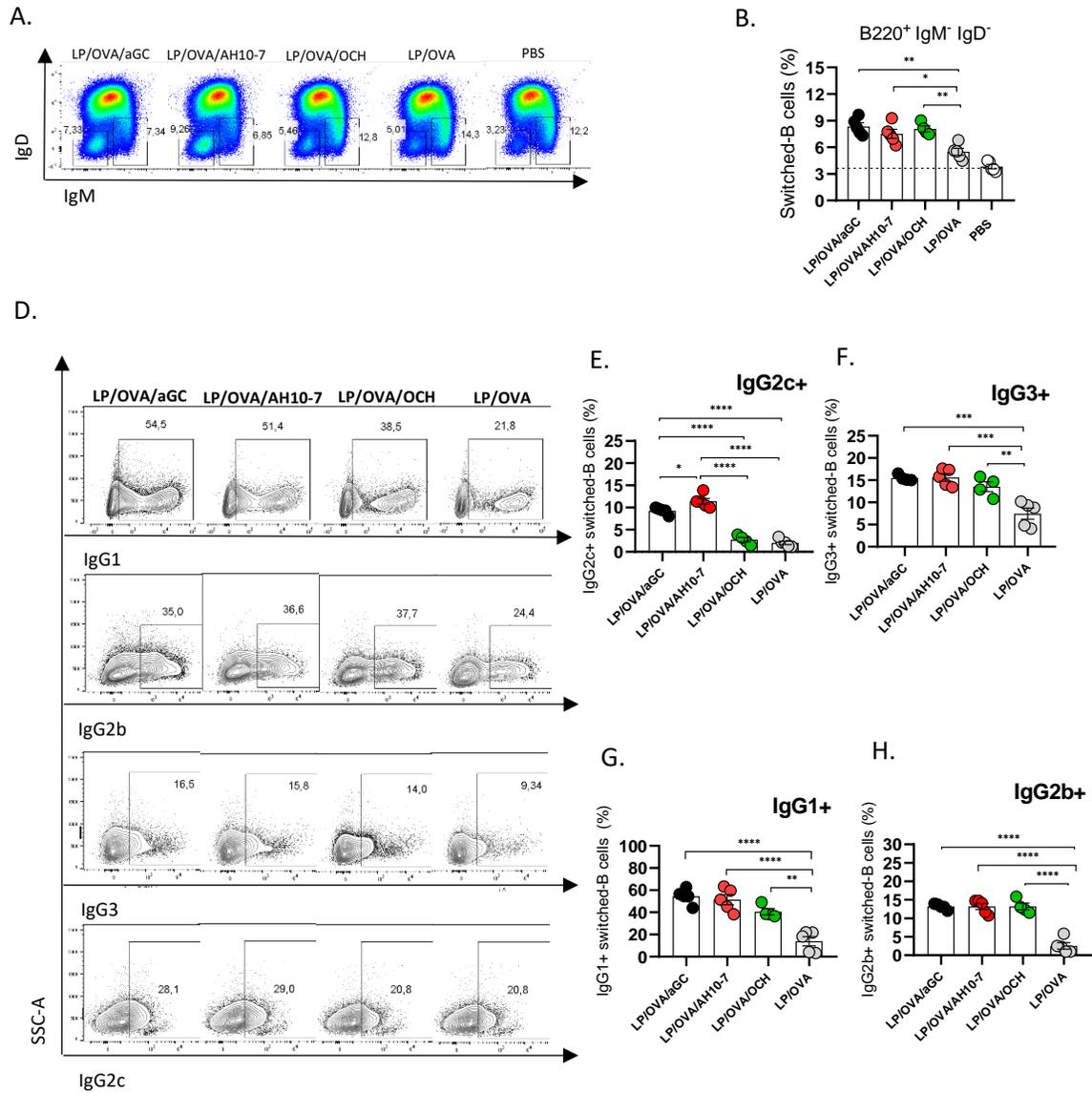


Figura 14. Detección de linfocitos sw-B obtenidos por la administración de LP/OVA/ligandos 7 días post inmunización. A.) Dotplot B220+ IgM- IgD-, B.) Porcentaje de linfocitos sw-B y C.) linfocitos B IgM+ inducidos por los distintos LPs. D.) Dotplot por cada subtipo de IgG. Porcentaje de linfocitos sw-B expresando en su superficie los isotipos E.) IgG2c F.) IgG3, G.) IgG1 e H.) IgG2b. H.) Barra tipo dona con la suma de los porcentajes de cada subtipo de linfocito B IgG+. Linfocitos B IgG1+ (amarillo), IgG2c+ (rojo), IgG2b+ (green), IgG3+ (negro) e IgM+ (gris). Las significancias estadísticas fueron determinadas utilizando ANOVA-one way con post-hoc Tukey * $p > 0.05$. (5 mice per condition, $n=2$).

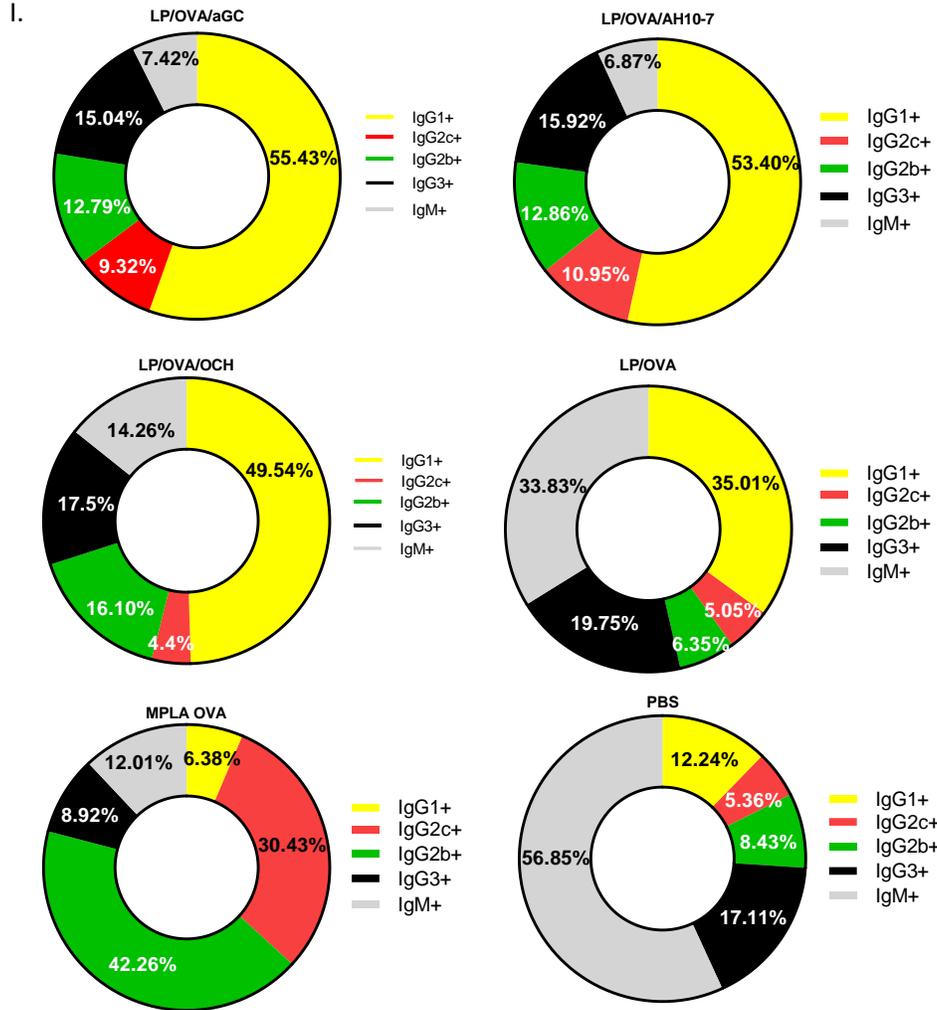


Figura 14. (Continuación). Detección de linfocitos sw-B obtenidos por la administración de LP/OVA/ligandos 7 días post inmunización. A.) Dotplot B220+ IgM- IgD-, B.) Porcentaje de linfocitos sw-B y C.) linfocitos B IgM+ inducidos por los distintos LPs. D.) Dotplot por cada subtipo de IgG. Porcentaje de linfocitos sw-B expresando en su superficie los isotipos E.) IgG2c F.) IgG3, G.) IgG1 e H.) IgG2b. H.) Barra tipo dona con la suma de los porcentajes de cada subtipo de linfocito B IgG⁺. Linfocitos B IgG1⁺ (amarillo), IgG2c⁺ (rojo), IgG2b⁺ (green), IgG3⁺ (negro) e IgM⁺ (gris). Las significancias estadísticas fueron determinadas utilizando ANOVA-one way con post-hoc Tukey * p>0.05. (5 mice per condition, n=2).

Cuando evaluamos la presencia de ASCs mediante ELISPOT OVA-específico, encontramos que los ratones que recibieron LP/OVA con glicolípidos tienen un mayor número de ASCs del tipo IgG1, en comparación al tratamiento sin ligando (**Fig. 16A**). En el caso de las ASCs que producen IgG2c, no se encontraron diferencias importantes entre los tratamientos con LP/OVA/ligandos (**Fig. 16B**).

Al evaluar si estas diferencias en la respuesta de memoria observadas en las ASCs IgG1+ son dependientes de células iNKT, se comparó el nivel de activación de ratones tratados con LP/OVA/AH10-7 y LP/OVA utilizando ratones KO para CD1d (**Fig. 16C**). Se encontró que las diferencias en el número de spot desaparecen entre ambas condiciones, confirmando que este efecto sería dependiente de CD1d.

10.10 La activación de células iNKT por LP/OVA con AH10-7 induce tempranamente transcritos de *switch*, AID y una mayor expansión de linfocitos TFH.

Dentro de los primeros pasos para iniciar la recombinación por cambio de clase esta la generación de transcritos de *switch* o transcritos germinales (GLTs). Evaluamos la transcripción de los GLTs 3 días post inmunización. Se utilizaron esplenocitos totales de ratones inmunizados para evaluar los niveles de GLTs al día 3 y se contrastó con el día 7, comparando su expresión relativa por qPCR (**Fig. 17**). A primera vista, observamos que los LP/OVA/ligandos generan un aumento en los niveles de GLTs al día 3 que incrementa considerablemente al día 7. El tratamiento de LP/OVA con AH10-7 genera los mayores niveles de GLT-IgG2c y GLT-IgG1 al día 7 en comparación con los demás tratamientos (**Fig. 17A-B**).

La transcripción de GLT-IgG3 fue inducida principalmente por los LP/OVA con glicolípidos al día 3, y en mayor magnitud al día 7, pero no se observaron diferencias entre tratamientos (**Fig. 17C**). La expresión de GLT-IgG2b incrementó significativamente con α GC y OCH en comparación al tratamiento sin glicolípidos al día 3 sosteniéndose hasta el día 7 (**Fig. 17D**), pudiendo esto relacionarse con el incremento visto de IgG2b en circulación (**Fig. 10D**).

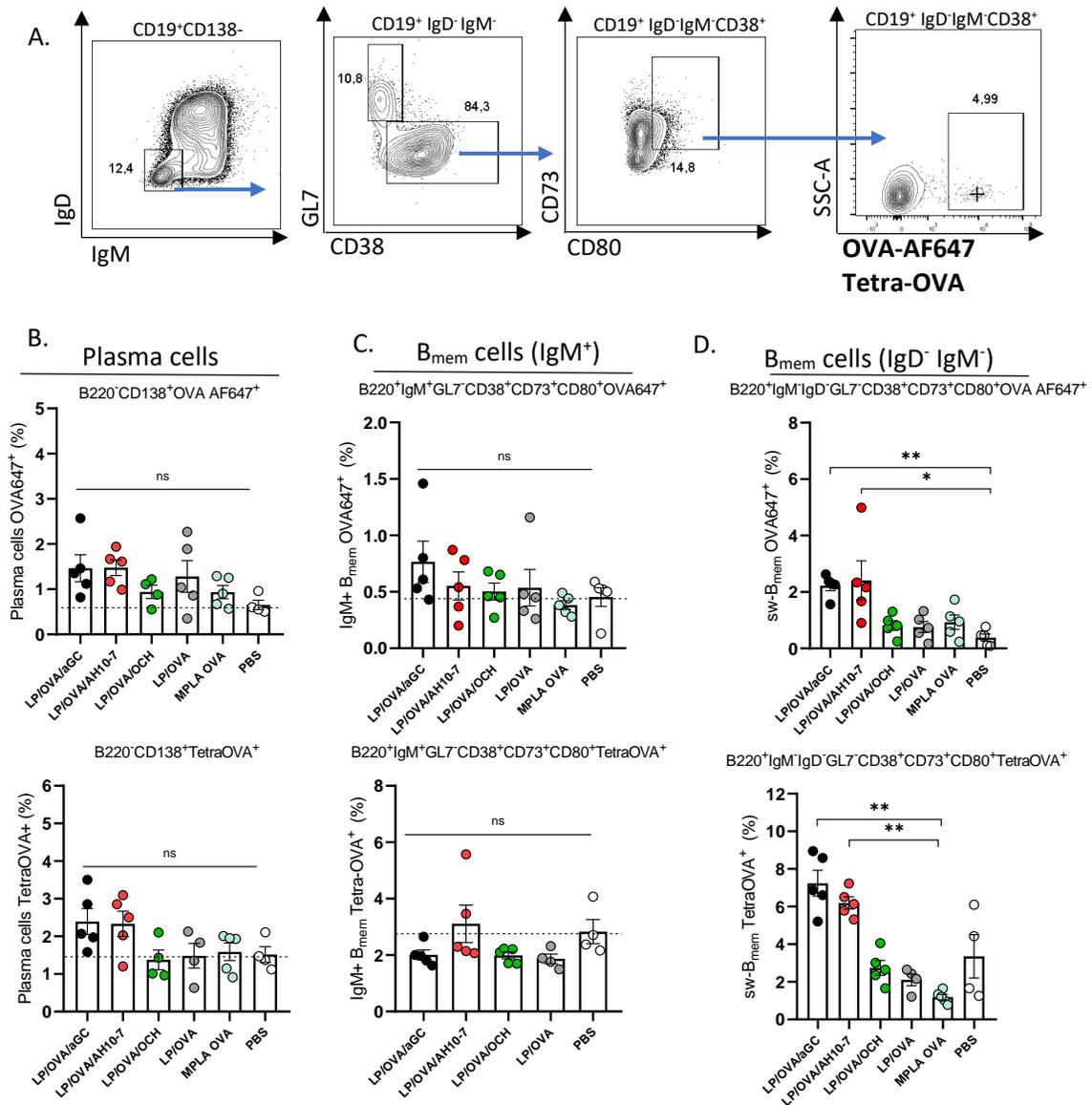
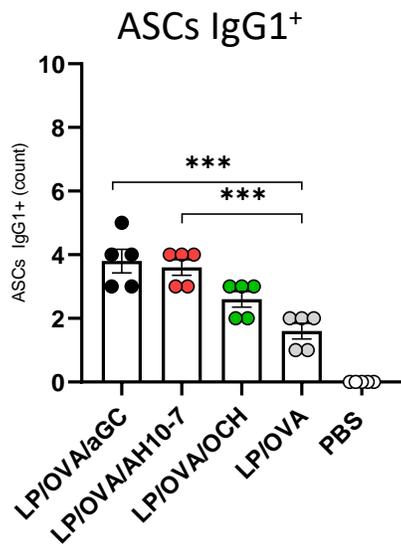
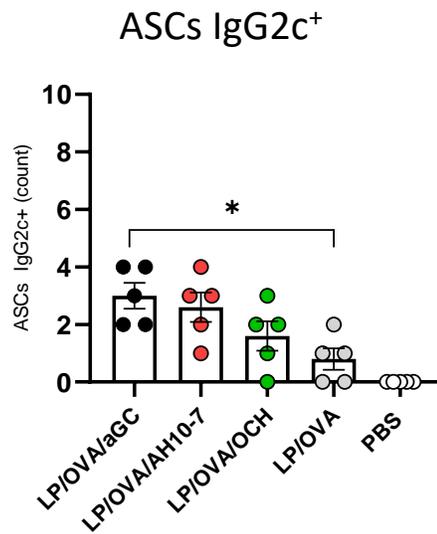


Figura 15. Identificación de linfocitos B_{mem} OVA-específicos que cambiaron de clase en bazo. Los bazos fueron analizados 60 días post inmunización. Los ratones recibieron un refuerzo al día 21. A.) Estrategia de *gating* mostrada en gráficos de contorno para la identificación de células plasmáticas y linfocitos B_{mem}. B.) Porcentaje de células plasmáticas OVA-específicas. C.) Porcentaje de linfocitos B_{mem} IgM⁺ OVA-específicas. D.) Porcentaje de linfocitos B_{mem} OVA-específicas que cambiaron de clase. Las significancias estadísticas fueron determinadas usando ANOVA one-way con test post-hoc Tukey * p>0.05. (5 ratones por condición, n=2).

A.



B.



C.

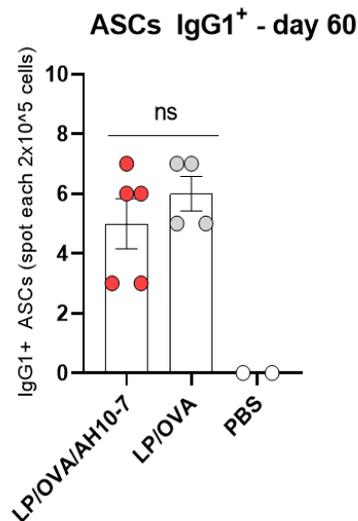


Figura 16. Identificación de ASCs productoras de IgG1 e IgG2c en médula ósea. Los ratones recibieron un refuerzo al día 21. Las médulas fueron analizadas 60 días post inmunización. A.) Cantidad de ASCs productoras de IgG1, B.) ASCs productoras de IgG2b. C.) Cantidad de ASCs IgG1+ derivadas de ratones Knock-Out para CD1d inmunizadas con el mismo esquema experimental. No se muestran las ASCs IgG2c+ de KO-CD1d ya que no pudieron visualizarse los *spots*. Las significancias estadísticas fueron determinadas usando ANOVA one-way con test post-hoc Tukey * $p > 0.05$. (5 ratones por condición, $n=2$).

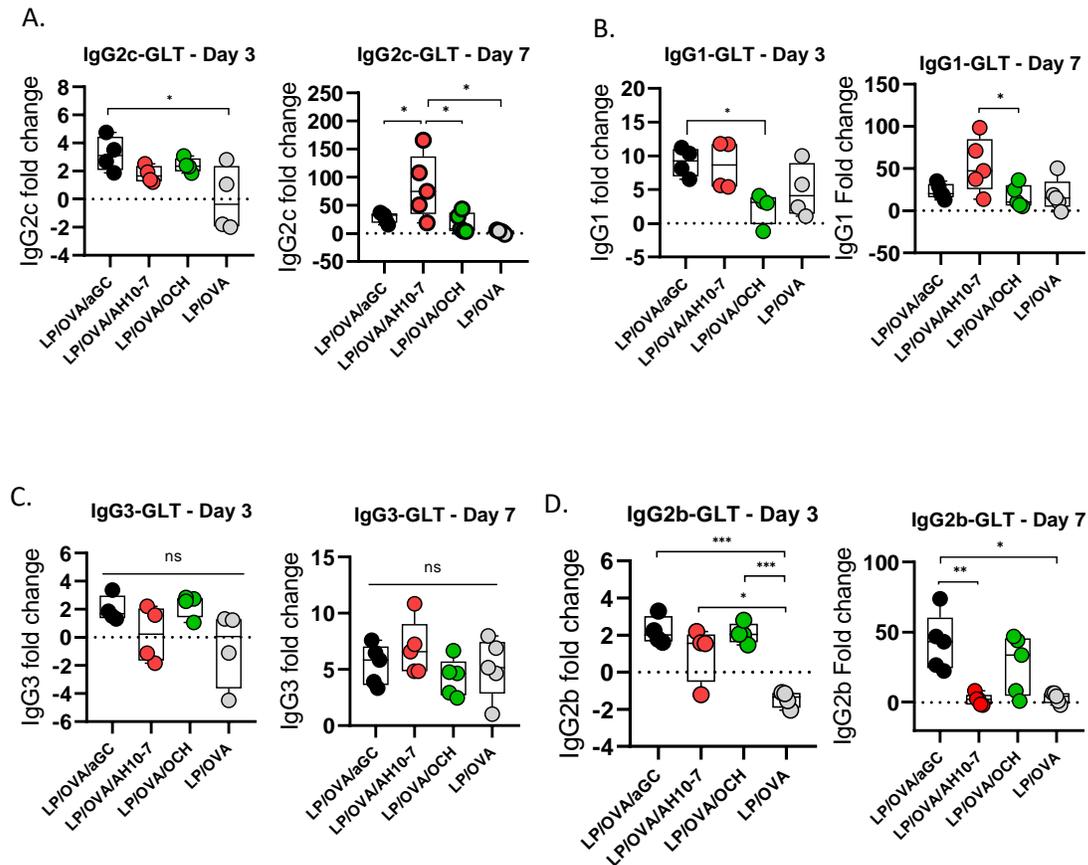
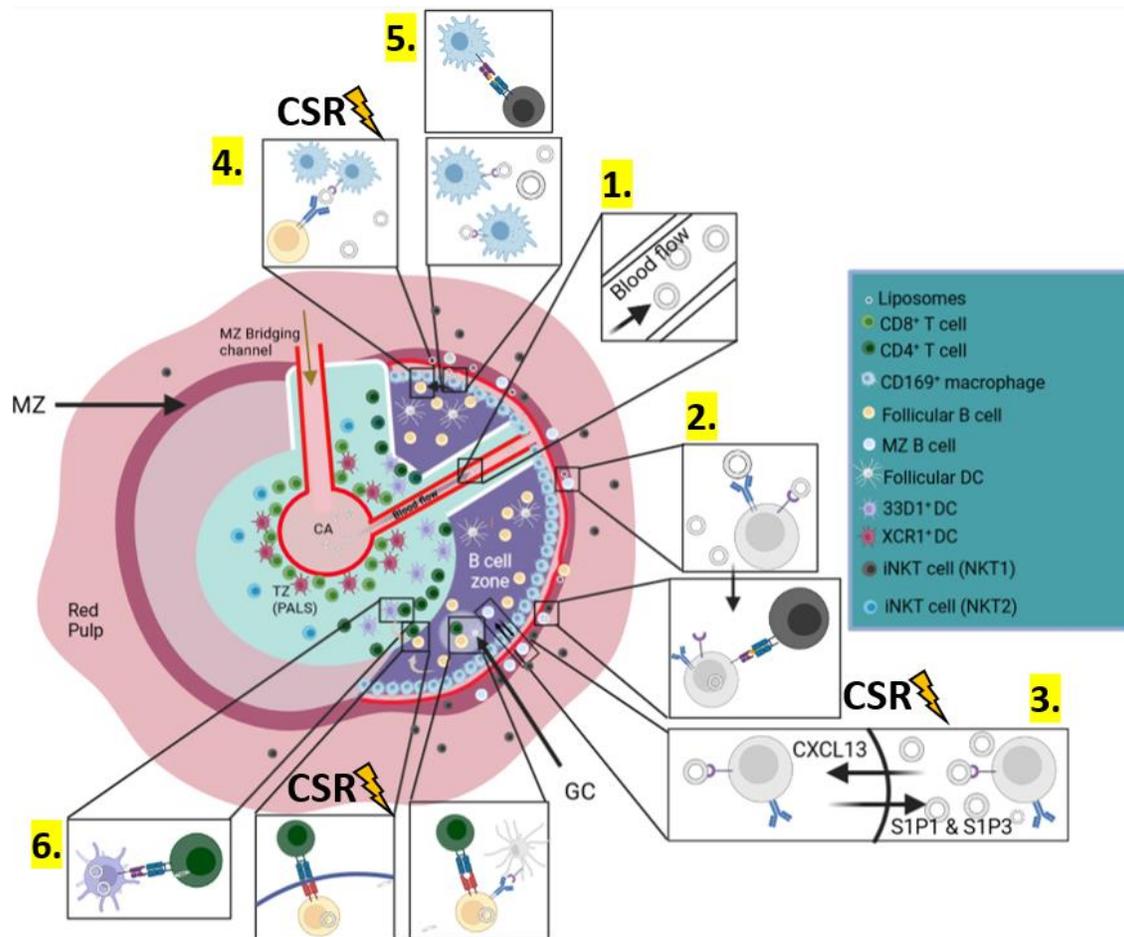


Figura 17. Transcritos de línea germinal (GLT) detectados después de inmunizar con LP/OVA/ligandos al día 3 y al día 7. Valores de las veces de cambio de A.) IgG2c-GLT, B.) IgG1-GLT, C.) IgG3-GLT and D.) IgG2b-GLT normalizados por la expresión de ubiquitina C (Ubc) y obtenidos por qPCR. La significancia estadística fue determinada utilizando ANOVA one-way con test post-hoc Tukey * $p > 0.05$. (5 ratones por condición, $n=2$).

11 Discusión

El uso de liposomas (LPs) para la co-activación de linfocitos B y células iNKT ha demostrado ser una herramienta útil para potenciar la CSR de los anticuerpos. Los mecanismos de acción teóricos por los que las células iNKT contribuyen a la CSR con la administración de nuestros LPs se exponen de forma secuencial en 6 pasos:



1. Una vez administrados vía intravenosa los LPs, que miden en promedio 200 nm de diámetro, estos llegan directamente a las distintas células del bazo a través de la arteriola central (CA) (Grivel & cols 1994).
2. Los linfocitos B de zona marginal (MZ B) que presenten mejor afinidad mediante sus BCR por OVA, endocitarán los LPs y los procesarán para su presentación por CD1d. Las células iNKT presentes en la pulpa roja (NKT1)

migrarán a la zona marginal donde interaccionarán mediante CD1d (Sonoda & cols., 2002; Chaudry & cols., 2014) y liberarán citoquinas a los linfocitos MZ B (Lee & cols., 2015), iniciando un primer nicho de CSR hacia IgG3 (Díaz de Ståhl & cols., 2003).

3. En paralelo, linfocitos MZ B que unirán liposomas opsonizados por el sistema del complemento, mediante receptores del complemento CR1/CR2, se translocarán mediante mecanismos de *shuttle* entre la MZ y la zona folicular utilizando gradientes de S1P1/S1P3 y la quimioquina CXCL13 secretada por las DCs foliculares (FDCs) (Ferguson & cols., 2004).
4. Otra vía de ingreso de los LPs es mediante células altamente “adhesivas” conocidas como macrófagos CD169⁺, análogos a los macrófagos del seno subcapsular presente en los linfonodos, que capturarán mediante CR1/CR2 a los LPs que lleguen opsonizados y se los entregarán a los linfocitos B presentes en los bordes foliculares para iniciar su activación (Moran & cols., 2019; Veninga & cols., 2015).
5. Los macrófagos CD169⁺ también fagocitarán parte de estos LPs y presentarán sus antígenos glicolipídicos a las células NKT1 contribuyendo en su perfil de activación (Barral & cols., 2010) y posterior interacción con linfocitos B MZ para inducir CSR.
6. DCs 33D1⁺, caracterizadas por inducir la diferenciación de linfocitos T naive a T CD4⁺ (Calabro & cols., 2016), se localizarán cercana a los folículos, donde presentarán los antígenos captados en circulación a linfocitos T. Los linfocitos B previamente activados interaccionarán con estos linfocitos T CD4⁺ activados en los bordes de los folículos donde ocurrirá el tercer y más clásico nicho de CSR. Finalmente, se promoverá la formación de Centros Germinales (CGs), donde ocurrirá la maduración de afinidad y la aparición de linfocitos B de memoria.

Independiente de los mecanismos teóricos que podrían gobernar esta modulación de los linfocitos B, nos encontramos con algunas dificultades respecto a la reproducibilidad de las preparaciones liposomales, en cuanto a su homogeneidad y agregación. La heterogeneidad de tamaños dentro de la muestra puede deberse a

que las proteínas conjugadas a los liposomas, en conjunto a la carga propia de la bicapa, favorecerían una disminución del pH acercando la carga neta de los liposomas a la neutralidad. Si el pH disminuye en el medio alcanzando el Punto isoeléctrico (Pi) de los liposomas con OVA, estos agregarán. Ya que OVA es una proteína con un Pi de 4.5 (Stein & cols., 1990); los componentes lipídicos de los liposomas (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, colesterol) no tienen carga (Petelska & cols., 2013; Pasenkiewicz-Gierula & cols., 1999) y las preparaciones son resuspendidas en PBS (pH 7.0), estos tendrán una carga negativa inicial, lo que se refleja en los resultados de potencial Z (**Fig. 7E**). De forma relevante, si se acidifica el medio estas preparaciones precipitarán y agregarán. Se ha reportado que el tiempo de almacenado puede aportar acidificación al medio por la reacción de agua con dióxido de carbono del ambiente (Pines & cols., 2016). Este fenómeno pudo haber contribuido a la agregación de nuestras muestras (**Fig. 7D**) ya que los stock de liposomas se ocuparon en más de una ocasión, existiendo intercambio gaseoso con el ambiente.

Un aspecto relevante de nuestras preparaciones es que la conjugación de proteínas en la superficie de los LPs puede promover también la agregación. La presencia de polietilenglicol (PEG) en la superficie proporciona un método efectivo para inhibir la interacción entre las proteínas de distintos liposomas al hacer la conjugación con estreptavidina, sin embargo, dependiendo el tamaño y composición de los LPs, la eficiencia de anclaje de las proteínas puede disminuir o aumentar en desmedro de la cantidad de PEG (Harasym & cols., 1995). La otra ventaja es que el uso de PEG en los liposomas previene la degradación o fagocitosis por células del sistema reticuloendotelial una vez realizada la inmunización (Li & Huang., 2009).

Los primeros reportes que describieron la recombinación por cambio de clase se basaron en el uso de linfocitos B purificados en conjunto a LPS y distintas citoquinas recombinantes (Stavnezer & cols., 2014; Deenick & cols., 1999; Snapper & Mond., 1993; Mosmann & Coffman., 1989). Esta fue una de las primeras evidencias que demostró que la CSR hacia un isotipo preferente esta más relacionado con las

señales que recibe el linfocito B del ambiente que del antígeno inmunizante *per se* (Dougan & cols., 2012).

Las citoquinas aportadas por los subtipos de linfocitos T_H a los linfocitos B usualmente son menos polarizadas de lo que el modelo clásico propone. Por ejemplo, los linfocitos Th1 no solo secretan IFN γ , IL-2 y TNF α , sino que también pueden producir IL-4 (Kelso & cols., 1999). Los linfocitos B son capaces de integrar estas señales, aunque sean antagonistas, pudiendo lograr un mecanismo “sintonizable/de ajuste” en la respuesta (Hasbold & cols., 1999, Horton & cols., 2022). Estas señales de distintas citoquinas pueden provenir netamente de células iNKT, ya que la administración de LPs con OVA y aGC en ratones H2-Ab1^{-/-}, transgénicos que no expresan MHC-II, inducen la generación de IgM y los subtipos de IgG en una respuesta primaria (Chen & cols., 2018). Así, la administración de LPs con distintos ligandos puede promover la activación de células iNKT (**Fig. 9**), contribuyendo con las primeras señales para que el linfocito B haga cambio de clase.

Se ha reportado que las células iNKT por si solas pueden inducir el cambio de clase. Las iNKT residentes de tejidos, como en placas de Peyer, puede promover el *switch* a IgG1 de forma indirecta a través de IL-4 (Clancy-Thompson & cols., 2019). Adicionalmente, se ha descrito que es necesario el fenotipo NKT_{FH} para inducir el cambio de clase a IgG1 contra antígenos polisacáridos como Ficoll, ya que en modelos *knock-out* para Bcl6 se pierde este isotipo al administrar aGC (Lang & cols., 2019). Otros polisacáridos como el polisacárido II de *Clostridioides difficile* también favorecen el *switch* hacia IgG1 cuando las células iNKT son activadas por α GC (Lang & cols., 2021)

Las células iNKT se encuentran distribuidas en distintos tejidos, y dependiendo su localización puede presentar distintos perfiles transcripcionales (NKT1, NKT2, NKT17) y de activación (Crosby & Kronenberg, 2018). Las células iNKT que están presentes en el bazo son las primeras en responder a una inmunización vía intravenosa (Barral & cols., 2012). El subtipo NKT1 esta enriquecido en la zona

marginal del bazo y las NKT2 en la zona T. La administración de glicolípidos “arresta” a las células NKT1 en la pulpa roja del bazo generando una rápida activación contra antígenos presentes en circulación (Lee & cols., 2015). Como la administración de AH10-7 promueve un fuerte perfil tipo-TH1 (Chennamadhavuni & cols., 2018), probablemente las células NKT1, activadas por los LPs con este glicolípido, estarían modulando inicialmente el cambio de clase de los linfocitos B. Por otro lado, el subtipo NKT2 presente en la zona T del bazo contribuiría indirectamente a través del licenciamiento de DCs para iniciar el *priming* de los linfocitos T_H específicos de OVA.

En este trabajo reportamos que el uso de distintos ligandos activadores de células iNKT permite modular la magnitud con la que hacen *switch* de clase los linfocitos B hacia algunos isotipos. La activación tipo-TH1 o tipo-TH2 de las células iNKT por glicolípidos promovería un efecto de “*tuning*” en la magnitud de los anticuerpos, más que una producción polarizada hacia algún isotipo por la ayuda de linfocitos Th1 o Th2 (Reinhardt & cols., 2009). Los ligandos que contribuyen a una mayor liberación de citoquinas permiten la activación de más receptores de linfocitos B, por lo tanto, incrementando la transcripción de sus GLTs (Horton & cols., 2022); y esto se refleja cuando comparamos los niveles de transcripción de los mLPs en relación con el control de LPs sin glicolípidos. (**Fig. 17**).

La capacidad de secretar citoquinas con distintos perfiles inflamatorios y en alta magnitud, como lo observado en las células iNKT activadas por AH10-7 (**Fig. 9**), se ha observado con linfocitos T de memoria. Estas células son capaces de secretar un mayor variedad de citoquinas que los linfocitos T obtenidos de una respuesta primaria (Westerhof & cols., 2019). En nuestro trabajo, los LPs con AH10-7 inducen una notable expansión de células iNKT doble positivas (IFN γ ⁺IL-4⁺) (**Fig. 9E**), lo que explicaría su alta capacidad de inducir IgG1 e IgG2c (**Fig. 10**). En el caso de los LPs con OCH, estos son capaces de inducir la expansión de células productoras de IL-4, demostrando su perfil de activación tipo-TH2 y una aparente inclinación a inducir un mayor cambio de clase hacia IgG2b (**Fig. 10 y Fig. 14**).

Hay dos componentes moleculares críticos que son esenciales para el proceso de CSR: los GLTs y AID, donde ninguno de ellos es expresado en linfocitos B naive, y ambos son inducidos por estímulos externos durante la activación del linfocito B (Zhang et al., 2019). Es importante destacar que para que exista diversidad de anticuerpos, debe haber distintos patrones de expresión de AID y de transcritos germinales durante la división celular (Horton & cols., 2022). Las células iNKT aceleran la formación de los centros germinales, tardando alrededor de 3 días y, por otro lado, adquieren el fenotipo helper folicular al día 5, a diferencia de los linfocitos TFH que tardan alrededor de 7-10 días (Chang & cols., 2011). Los linfocitos B de centro germinal (GC B) que interaccionan con estas células colaboradoras se caracterizan por presentar una temprana y elevada expresión de AID (Mesin & cols., 2016).

Los LPs evaluados en este trabajo generan un aumento en la transcripción de AID al día 3 que se eleva fuertemente al día 7 (**Fig. 13A**), lo que se correlaciona con una temprana CSR y la posterior maduración de afinidad dentro del centro germinal (Roco & cols., 2019). De forma similar a la expansión de células iNKT al día 3 (**Fig. 9A**), observamos las mismas tendencias en la expansión de linfocitos T_{FH} al día 7 (**Fig. 13B**), sugiriendo que las células iNKT podrían estar licenciando de forma proporcional a las DCs que hacen el *priming* de las T_{FH}. En el caso de los linfocitos GC B (**Fig. 13C**), se observaron en menor grado las diferencias promovidas entre los glicolípidos, no obstante, se diferencian en mayor porcentaje del tratamiento sin ligando. Esto sugiere que podrían ser las mismas células iNKT con fenotipo de *helper folicular* (NKT_{FH}) las que podrían estar activando, en conjunto a los linfocitos T_{FH}, la expansión de los linfocitos GC B (Chen & cols., 2018).

Uno de los modelos que explica cómo ocurre la recombinación por cambio de clase (CSR) en modelos murinos, es el *modelo del cuarteto*. Este modelo plantea que todos los subtipos de IgG presentes en los linfocitos B se producen de forma simultánea frente a un antígeno, derivando todos de linfocitos B IgM⁺ (Collins & cols., 2016). En nuestro modelo, los LPs son capaces de inducir todos los subtipos de IgG con una inmunización (**Fig. 10**). En el *modelo del cuarteto*, IgG3 e IgG2b son

particularmente importantes al inicio de la respuesta, donde la ayuda TD puede ser limitada y la ayuda TI tener mayor protagonismo (Deenick & cols., 1999). El subtipo IgG3 se induce por la producción temprana de IFN γ e inicia la inflamación a través de la fijación del complemento, mientras que IgG2b proporciona funciones efectoras tempranamente mediante los Fc γ R de afinidad intermedia. Cuando administramos los LPs con α GC y AH10-7, se promueve en mayor magnitud los niveles de IgG3 circulantes (**Fig. 10B**) como la expansión de linfocitos B IgG3⁺ (**Fig. 14F**) al día 7, sugiriendo una mayor capacidad de activar el complemento y un fenotipo de activación tipo-TH1 (Raftery & cols., 2014).

Es interesante notar que OCH genera una expansión de linfocitos B IgG3⁺ y B IgG2b⁺ cercana a los otros ligandos (**Fig. 14F-H**). Esto se destaca con IgG2b, donde este subtipo es producido en la misma magnitud que con los otros glicolípidos a pesar de inducir una menor expansión de las células iNKT (**Fig. 9A**). La menor capacidad de expandir esta población se debe a que OCH genera menores niveles de CD40L (Oki & cols., 2005). Este menor porcentaje de células ayudando a los linfocitos B podría estar siendo compensado por mecanismos independientes de contacto o por otro tipo de células como neutrófilos que pueden interaccionar con células iNKT (De Santo & cols., 2010) y favorecer el cambio de clase en linfocitos B de zona marginal por medio de BAFF, APRIL e IL-21 (Li & cols., 2019).

La regulación de la respuesta humoral por medio de distintos subtipos de IgG promueve un balance entre los receptores FC activadores e inhibitorios (Nimmerjahn & Ravetch., 2006). Cuando la ayuda TD se consolida, la secreción de IgG2c -o su análogo IgG2a en BALB/c-, incrementa la participación de los receptores Fc γ activadores de alta afinidad que predominan en la eliminación de patógenos (Fornet & cols., 2018; Neuberger & cols., 1981). Adicionalmente, la producción de IgG1 ayuda a limitar la respuesta inflamatoria, inhibiendo el complemento y los receptores activadores, limitando posibles inmunopatologías (Lilienthal & cols., 2018; Huda & cols., 2015). Los LPs con α GC y AH10-7 fueron los que levantaron los mayores niveles de IgG2c circulantes, destacándose AH10-7 al

promover el mayor porcentaje de linfocitos B IgG2c⁺ (**Fig. 14E**). Este glicolípido podría estar induciendo de forma indirecta la expresión de MyD88,-una proteína adaptadora necesaria para que los linfocitos T/iNKT produzcan IFN γ -, y el *switch* hacia IgG2c (Barr & cols., 2009; Iweala & cols., 2009). En el caso del isotipo IgG1, -el isotipo más prevalente en los linfocitos B después de una inmunización- (Riedel & cols., 2020), este fue inducido por todos los LPs con ligandos sin diferencias significativas entre tratamientos (**Fig. 10C**), sugiriendo una rápida autoregulación a través de la activación de receptores inhibidores como el FCyRIIb (Nimmerjahn & Ravetch., 2006).

Una consideración importante para evaluar en una vacuna o inmunoterapia es la duración de la inmunidad. Cuando evaluamos los títulos a mayores tiempos post inmunización, encontramos que la producción de IgG1 es sostenida, sugiriendo la presencia de su rol inmunoregulador por varias semanas (Lilienthal & cols., 2018). Los isotipos IgG2c (**Fig. 11A**), IgG3 (**Fig. 11B**) e IgG2b (**Fig. 11C**) presentaron tendencias muy similares de inducción por los tres glicolípidos. Se destaca que los niveles de IgG2c fueron mantenidos en mayor título que los demás grupos con α GC y AH10-7, posiblemente porque es el isotipo que se une mejor a los receptores Fcy de alta afinidad pudiendo balancear la inhibición por IgG1 (Falconer & Barb, 2018)

Una mayor magnitud en el título de anticuerpos puede relacionarse con un incremento en el número de divisiones celulares y por ende más actividad de AID (Horton & cols., 2022). Esto favorece un mayor número de mutaciones en la secuencia nucleotídica de los anticuerpos correlacionándose con anticuerpos de mayor afinidad por su antígeno. Según el modelo de *switching* del cuarteto, las secuencias que codifican para IgG1 presentan más mutaciones que las de IgG2c (Collins & cols, 2015). Este hallazgo se condice con nuestros datos de avidéz relativa (**Fig. 12**), donde los mLPs con AH10-7 promovieron mayores RAVs de IgG1 que IgG2c. Interesantemente, los RAVs de IgG1 producidos por AH10-7 fueron más altos que los valores inducidos por α GC al día 28 (**Fig. 12C**), siendo esta una de las propiedades en las que se diferencian ambos glicolípidos.

En este trabajo también evaluamos cómo la activación inicial de las células iNKT por distintos ligandos contribuye en el porcentaje de linfocitos B_{mem} y en el *switch* de clase en bazo y en médula ósea. Se ha reportado que un factor determinante para decidir si se formarán linfocitos B_{mem} o células plasmáticas es el cambio de clase. Los linfocitos B IgM^+ tienden a diferenciarse en mayor porcentaje a linfocitos B_{mem} y los que cambian de clase a células plasmáticas (Palm & Henry, 2019). En este trabajo observamos que la inmunización con αGC o AH10-7 promueve una expansión significativa de linfocitos B_{mem} con cambio de clase (**Fig. 15D**) sin influir en los niveles de linfocitos $B_{\text{mem}} IgM^+$ (**Fig. 15C**). En este ensayo constatamos que el uso de tetrámeros de OVA permite una mayor detección de linfocitos B OVA-específicos, sin embargo, también detecta una población en la condición control (PBS), indicando que, a la dilución utilizada, el anticuerpo se une de forma inespecífica cuando no contiene un target, lo que podría mejorarse al utilizar diluciones más altas. En el caso de la OVA AF647, se observan tendencias similares a las observadas con el tetrámero, sin embargo, en menor grado sugiriendo una menor afinidad por los BCRs de los linfocitos B_{mem} generados.

En el caso de las células plasmáticas, no se observaron diferencias entre los tratamientos con glicolípido y el tratamiento sin ligando (**Fig. 15B**). Las poblaciones de linfocitos $B_{\text{mem}} IgG2c^+$ mostraron las mismas tendencias que la de los linfocitos B_{mem} totales (**Fig. 15E**, der) y, por otro lado, la expansión de los linfocitos $B_{\text{mem}} IgG1c^+$ mostró la misma tendencia que las células plasmáticas (**Fig. 15E**, izq).

Un estudio reciente sobre linfocitos B_{mem} que cambia de clase reportó que, tanto en médula ósea como en bazo, hay una población discreta de linfocitos $B_{\text{mem}} IgG2b^+$ mayor a la población $IgG1^+$, sin embargo, no declaran las poblaciones $IgG2c^+$ (Riedel & cols., 2020). Sería interesante evaluar a futuro cómo la población $IgG2b^+$ se relaciona con la activación temprana de las células iNKT por OCH.

Se ha descrito que el fenotipo de las Células Secretoras de Anticuerpos (ASCs) queda definido por las señales externas que recibe el linfocito B durante las etapas tempranas de su activación, manteniendo el “*imprinting*” clonal y el fenotipo ancestral del que provienen (Scharer & cols., 2020). Al evaluar las ASCs productoras de IgG1 en médula ósea mediante ELISPOT (**Fig. 16A**) (Shah & cols., 2015), se observaron poblaciones equivalentes a las detectadas al día 7 (**Fig. 10G**), no obstante, la población de ASCs IgG2c⁺ fue encontrada en niveles muy bajos (**Fig. 16B**) y en el caso de los ratones KO-CD1d fueron indetectables (**Fig. 16C**). Esta evidencia coincide con que los linfocitos sw-B_{mem} presentan principalmente los subtipos IgG1 e IgG2b; siendo los predominantes en estos órganos (Riedel & cols., 2020).

12 Conclusiones

La activación que presentan las células iNKT por distintos ligandos, y por ende el impacto que tendrán en los linfocitos B, se relaciona con el mecanismo celular por el que CD1d adquiere estos ligandos para su presentación. Como CD1d es una proteína transmembrana, esta se recicla en compartimentos endocíticos, pudiendo adquirir lípidos endógenos como exógenos. Como los lípidos libres tienen poca solubilidad, requieren de proteínas *carrier* como Apolipoproteína E (ApoE) y otros componentes como la *hidrolasa de amida* de ácidos grasos (FAAH) para ingresar y ser cargados en CD1d, respectivamente (van den Elzen & cols., 2005; Freigang & cols., 2010). Otros receptores *como los scavengers* SRA, SRB1 y CD36, han sido involucrados en el ingreso y presentación de α GC como análogos (Freigang 2012). Estos distintos receptores podrían explicar en parte las variaciones observadas en la respuesta inmune al utilizar distintos lípidos (Freigang 2012).

Otro factor que aporta a estas variaciones observadas por cada glicolípido es su estructura química. Los análogos tipo-TH2, como OCH, al tener cadenas de esfingosina más cortas o dobles enlaces, se unen débilmente a CD1d, por lo que son desplazados por saponina B y la proteína activadora de GM2 (GM2A) al endocitarse (Kawasaki & cols., 2013; Zhou & cols., 2004). Esta cualidad le permite a OCH unirse directamente a las moléculas de CD1d presentes en la superficie de la célula. Por otro lado, los análogos tipo-TH1, se asocian establemente a CD1d en un ambiente endosomal, donde son presentados en *clusters* dentro de balsas lipídicas, lo que favorece una mayor activación (Im & cols., 2009). Importantly, la fuerza de una respuesta Th1 aumenta la unión del lípido a CD1d como resultado de inducir un mecanismo que adapta las sustituciones aromáticas a la hendidura de la molécula (Aspeshlagh & cols., 2011)

Dentro de las DCs convencionales (cDCs) de bazo que participan principalmente en la presentación de estos glicolípidos están las CD4⁺ 33D1⁺ y las CD4⁻ CD8 α ⁺ DC205⁺, usualmente referidas como las CD4⁺ y CD8 α ⁺ DCs (Calabro & cols.,

2016). Tanto las MZ B y CD8 α DCs expresan altos niveles de CD1d. Se ha sugerido que la presentación preferencial por estos distintos subtipos puede también contribuir a las variaciones en las respuestas por los distintos análogos y algunos datos apoyan esta posibilidad (Bai 2012). Otros estudios han mostrado que la mayoría y posiblemente todas las formas bien estudiadas de aGC son dependientes en su presentación por DCs CD8a+ (Arora & cols., 2014; King & cols., 2013).

La administración de glicolípidos dentro de liposomas presenta una herramienta altamente versátil al evadir la anergia (Parekh & cols., 2005), sin embargo, puede representar un mecanismo diferente para la incorporación de glicolípidos. De la misma forma, la exposición de antígenos proteicos en la superficie de liposomas permite estimular la producción de anticuerpos por linfocitos B, mientras que ambos, proteínas y glicolípidos, requieren de la disrupción intracelular del liposoma para ser accesible a la presentación por MHC-II y CD1d, respectivamente (Nisini & cols., 2018). Un mecanismo por el que pueden ingresar los LPs a la célula es mediante macropinocitosis constitutiva (Canton, 2018). Este proceso lo llevan a cabo principalmente macrófagos y DCs inmaduras, no obstante, linfocitos B, DCs maduras y macrófagos proinflamatorios captan mayormente por endocitosis convencional (West & cols, 2000). Como nuestros datos muestran que OCH sigue promoviendo una menor expansión de células iNKT, a pesar de ingresar mediante LPs a la vía endocítica, no lograría estabilizarse y cargarse en moléculas de CD1d endocítico para ser presentado en balsas lipídicas.

Cuando se administran moléculas relativamente grande como OVA o dextrano (50-70 kDa), estas son captadas por macropinocitosis (Singla & cols., 2018). Al igual que los glicolípidos solubles, cuando se administra OVA soluble este es captado principalmente mediante receptores de manosa y cuando se administra asociado a células puede ser captado y presentado independiente de estos receptores (Burgdorf & cols., 2006).

En el modelo de LPs con OVA anclada, posiblemente estos serían captados por macropinocitosis (DCs inmaduras, macrófagos) y endocitosis convencional (linfocitos B); luego los glicolípidos endocitados del tipo-TH1 se cargarían endosomalmente y se presentarían en balsas lipídicas y, por otro lado, los glicolípidos tipo-TH2 se quedarían en la superficie de la célula cuando se fusionan las membranas. Así, dependiendo la ruta de presentación, esto aportaría distintos perfiles de citoquinas que modularán el cambio de clase hacia distintos isotipos. En el caso de OVA, esta proteína podría ser presentada mediante MHC-II a linfocitos T_H0 , dependiendo el pH endosomal, ir a presentación cruzada para activar linfocitos T citotóxicos (Burgdorf & cols., 2006).

Ya que los LPs presentan una conformación muy similar a la de las partículas tipo-virus (VLPs, *virus-like particles*) se podrían homologar ciertas propiedades. Está descrito que las VLPs son capaces de llegar a la circulación para ser captadas directamente por linfocitos MZ B antígeno-específicos presentes en la zona marginal del bazo (Cinamon & cols., 2008; Barral & cols., 2012). Luego, estos linfocitos migran al área folicular para facilitar el transporte de las VLPs hasta las DCs foliculares (FDCs) sin la necesidad de ser captados por otros subtipos de DCs (Cinamon & cols., 2008) o ser captados por macrófagos del seno subcapsular (CD169+), para así darle los antígenos estructurales a los linfocitos B foliculares (Barral & cols., 2010). Así, este podría ser otro mecanismo por el que los linfocitos B son activados por los LPs con OVA y glicolípidos.

Proyecciones

Para entender de mejor forma cómo el uso de glicolípidos, como OCH, impacta en el cambio de clase de los anticuerpos, estudios adicionales utilizando OCH y linfocitos B permitirían dilucidar cuales mecanismos podrían estar promoviendo el cambio de clase hacia IgG2b sin una importante expansión de células iNKT. Una explicación podría ser que esta activación más ineficiente de CD40L en las iNKT por OCH (Oki & cols., 2005; Forestier & cols., 2007), podría estar promoviendo una mejor producción de TGF- β en el microambiente del linfocito B (Collins, 2016). Otra explicación es que la activación por OCH podría estar aumentando los niveles de LAG3,-un regulador negativo de la respuesta inmune-, en las células iNKT (Juno & cols., 2015), favoreciendo un fenotipo más regulatorio a través de la producción de la isoforma TGF- β 3 (Okamura & cols., 2015), pero hace falta demostrarlo.

En un escenario pato-fisiológico, postulamos que estas preparaciones utilizando OCH podrían ayudar a combatir el encefalomiелitis autoinmune ya que el aumento de IL-4 por parte de este ligando, ha demostrado ser neuroprotector (Miyamoto & cols., 2001), haciendo reversible el daño. Por otro lado, se ha descrito que el ambiente tumoral de un cáncer de mama triple negativo es inmunosupresor, ya que su programación conduce a una alta secreción de IL-10, lo que favorece el cambio de clase hacia IgG4, el análogo a IgG1 murino, característico de una respuesta inmunosupresiva (Toney & cols., 2022). El uso de LPs con AH10-7, además de favorecer la activación de linfocitos T citotóxicos (Chennamadhavuni & cols., 2018), podría favorecer el cambio de clase hacia IgG1, que es el análogo de IgG2c murino, para eliminar estas células tumorales de mamas.

Se ha reportado que las células iNKT presentes dentro de un tumor pueden sufrir un cambio en la polarización de sus citoquinas afectando la interacción con las APCs (Wang & cols., 2018). Además, los linfocitos B infiltrantes de tumor pueden producir grandes cantidades de IgG4, el isotipo inmunosupresor humano (Toney & cols., 2022), proponiendo una posible relación entre las células iNKT y los isotipos

secretados en el tumor. El potencial uso de distintos glicolípidos para modular la producción de anticuerpos en el tumor representaría una interesante forma de modificar el perfil de activación de las APCs para su eliminación. La incorporación de estos estudios adicionales proveería de datos más robustos para dilucidar el mecanismo de cómo esta ayuda por células iNKT a los linfocitos B puede orquestar la activación de distintas células inmunes involucradas.

13 Referencias

Stavnezer J, Schrader CE. IgH chain class switch recombination: mechanism and regulation. *J Immunol.* 2014 Dec 1;193(11):5370-8. doi: 10.4049/jimmunol.1401849. PMID: 25411432; PMCID: PMC4447316.

Xu Z, Zan H, Pone EJ, Mai T, Casali P. Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat Rev Immunol.* 2012 Jun 25;12(7):517-31. doi: 10.1038/nri3216. PMID: 22728528; PMCID: PMC3545482

Collins AM. IgG subclass co-expression brings harmony to the quartet model of murine IgG function. *Immunol Cell Biol.* 2016 Nov;94(10):949-954. doi: 10.1038/icb.2016.65. Epub 2016 Aug 9. PMID: 27502143.

Lu LL, Suscovich TJ, Fortune SM, Alter G. Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases. *Nat Rev Immunol.* 2018 Jan;18(1):46-61. doi: 10.1038/nri.2017.106. Epub 2017 Oct 24. PMID: 29063907; PMCID: PMC6369690

Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood.* 2012 Jun 14;119(24):5640-9. doi: 10.1182/blood-2012-01-380121. Epub 2012 Apr 25. PMID: 22535666.

Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity.* 2006 Jan;24(1):19-28. doi: 10.1016/j.immuni.2005.11.010. PMID: 16413920.

Prussin C, Metcalfe DD. 5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Feb;117(2 Suppl Mini-Primer):S450-6. doi: 10.1016/j.jaci.2005.11.016. PMID: 16455345

Baudino L, Shinohara Y, Nimmerjahn F, Furukawa J, Nakata M, Martínez-Soria E, Petry F, Ravetch JV, Nishimura S, Izui S. Crucial role of aspartic acid at position 265 in the CH2 domain for murine IgG2a and IgG2b Fc-associated effector functions. *J Immunol.* 2008 Nov 1;181(9):6664-9. doi: 10.4049/jimmunol.181.9.6664. PMID: 18941257.

Collins AM, Wang Y, Roskin KM, Marquis CP, Jackson KJ. The mouse antibody heavy chain repertoire is germline-focused and highly variable between inbred strains. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015 Sep 5;370(1676):20140236. doi: 10.1098/rstb.2014.0236. PMID: 26194750; PMCID: PMC4528413.

Harmer NJ, Chahwan R. Isotype switching: Mouse IgG3 constant region drives increased affinity for polysaccharide antigens. *Virulence.* 2016 Aug 17;7(6):623-6. doi: 10.1080/21505594.2016.1193278. Epub 2016 May 25. PMID: 27224549; PMCID: PMC4991320.

Saylor CA, Dadachova E, Casadevall A. Murine IgG1 and IgG3 isotype switch variants promote phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* through different receptors. *J Immunol.* 2010 Jan 1;184(1):336-43. doi: 10.4049/jimmunol.0902752. Epub 2009 Nov 30. PMID: 19949107; PMCID: PMC2799292.

Nimmerjahn F, Bruhns P, Horiuchi K, Ravetch JV. Fcγ₄RIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity*. 2005 Jul;23(1):41-51. doi: 10.1016/j.immuni.2005.05.010. PMID: 16039578.

Vinuesa CG, Chang PP. Innate B cell helpers reveal novel types of antibody responses. *Nat Immunol*. 2013 Feb;14(2):119-26. doi: 10.1038/ni.2511. Epub 2013 Jan 18. PMID: 23334833.

Minguet S, Dopfer EP, Pollmer C, Freudenberg MA, Galanos C, Reth M, Huber M, Schamel WW. Enhanced B-cell activation mediated by TLR4 and BCR crosstalk. *Eur J Immunol*. 2008 Sep;38(9):2475-87. doi: 10.1002/eji.200738094. PMID: 18819072.

Mond JJ, Lees A, Snapper CM. T cell-independent antigens type 2. *Annu Rev Immunol*. 1995;13:655-92. doi: 10.1146/annurev.iy.13.040195.003255. PMID: 7612238.

Puga I, Cols M, Barra CM, He B, Cassis L, Gentile M, Comerma L, Chorny A, Shan M, Xu W, Magri G, Knowles DM, Tam W, Chiu A, Bussel JB, Serrano S, Lorente JA, Bellosillo B, Lloreta J, Juanpere N, Alameda F, Baró T, de Heredia CD, Torán N, Català A, Torrebadell M, Fortuny C, Cusí V, Carreras C, Diaz GA, Blander JM, Farber CM, Silvestri G, Cunningham-Rundles C, Calvillo M, Dufour C, Notarangelo LD, Lougaris V, Plebani A, Casanova JL, Ganal SC, Diefenbach A, Aróstegui JI, Juan M, Yagüe J, Mahlaoui N, Donadieu J, Chen K, Cerutti A. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat Immunol*. 2011 Dec 25;13(2):170-80. doi: 10.1038/ni.2194. Erratum in: *Nat Immunol*. 2014 Feb;15(2):205. PMID: 22197976; PMCID: PMC3262910.

Nera KP, Kyläniemi MK, Lassila O. Regulation of B Cell to Plasma Cell Transition within the Follicular B Cell Response. *Scand J Immunol*. 2015 Sep;82(3):225-34. doi: 10.1111/sji.12336. PMID: 26118840.

Stebegg M, Kumar SD, Silva-Cayetano A, Fonseca VR, Linterman MA, Graca L. Regulation of the Germinal Center Response. *Front Immunol*. 2018 Oct 25;9:2469. doi: 10.3389/fimmu.2018.02469. PMID: 30410492; PMCID: PMC6209676.

Roco JA, Mesin L, Binder SC, Nefzger C, Gonzalez-Figueroa P, Canete PF, Ellyard J, Shen Q, Robert PA, Cappello J, Vohra H, Zhang Y, Nowosad CR, Schiepers A, Corcoran LM, Toellner KM, Polo JM, Meyer-Hermann M, Victora GD, Vinuesa CG. Class-Switch Recombination Occurs Infrequently in Germinal Centers. *Immunity*. 2019 Aug 20;51(2):337-350.e7. doi: 10.1016/j.immuni.2019.07.001. Epub 2019 Jul 30. PMID: 31375460; PMCID: PMC6914312.

Liu YJ, Malisan F, de Bouteiller O, Guret C, Lebecque S, Banchereau J, Mills FC, Max EE, Martinez-Valdez H. Within germinal centers, isotype switching of immunoglobulin genes occurs after the onset of somatic mutation. *Immunity*. 1996 Mar;4(3):241-50. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80432-x. PMID: 8624814.

Pape KA, Kouskoff V, Nemazee D, Tang HL, Cyster JG, Tze LE, Hippen KL, Behrens TW, Jenkins MK. Visualization of the genesis and fate of isotype-switched B cells during a primary immune response. *J Exp Med*. 2003 Jun 16;197(12):1677-87. doi: 10.1084/jem.20012065. Epub 2003 Jun 9. PMID: 12796466; PMCID: PMC2193962.

Chan TD, Gatto D, Wood K, Camidge T, Basten A, Brink R. Antigen affinity controls rapid T-dependent antibody production by driving the expansion rather than the differentiation or extrafollicular migration of early plasmablasts. *J Immunol*. 2009 Sep 1;183(5):3139-49. doi: 10.4049/jimmunol.0901690. Epub 2009 Aug 7. PMID: 19666691.

Adler LN, Jiang W, Bhamidipati K, Millican M, Macaubas C, Hung SC, Mellins ED. The Other Function: Class II-Restricted Antigen Presentation by B Cells. *Front Immunol*. 2017 Mar 23;8:319. doi: 10.3389/fimmu.2017.00319. PMID: 28386257; PMCID: PMC5362600.

Deenick EK, Hasbold J, Hodgkin PD. Switching to IgG3, IgG2b, and IgA is division linked and independent, revealing a stochastic framework for describing differentiation. *J Immunol*. 1999 Nov 1;163(9):4707-14. PMID: 10528168.

Park SR. Activation-induced Cytidine Deaminase in B Cell Immunity and Cancers. *Immune Netw*. 2012 Dec;12(6):230-9. doi: 10.4110/in.2012.12.6.230. Epub 2012 Dec 31. PMID: 23396757; PMCID: PMC3566417.

Dunnick WA, Shi J, Holden V, Fontaine C, Collins JT. The role of germline promoters and I exons in cytokine-induced gene-specific class switch recombination. *J Immunol*. 2011 Jan 1;186(1):350-8. doi: 10.4049/jimmunol.1003108. Epub 2010 Dec 3. PMID: 21131417; PMCID: PMC3059604.

Wan YY. Multi-tasking of helper T cells. *Immunology*. 2010 Jun;130(2):166-71. doi: 10.1111/j.1365-2567.2010.03289.x. PMID: 20557575; PMCID: PMC2878461.

Corripio-Miyar Y, Hayward A, Lemon H, Sweeny AR, Bal X, Kenyon F, Pilkington JG, Pemberton JM, Nussey DH, McNeilly TN. Functionally distinct T-helper cell phenotypes predict resistance to different types of parasites in a wild mammal. *Sci Rep*. 2022 Feb 24;12(1):3197. doi: 10.1038/s41598-022-07149-9. PMID: 35210503; PMCID: PMC8873199.

Gracie JA, Bradley JA. Interleukin-12 induces interferon-gamma-dependent switching of IgG alloantibody subclass. *Eur J Immunol*. 1996 Jun;26(6):1217-21. doi: 10.1002/eji.1830260605. PMID: 8647195.

Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:925135. doi: 10.1155/2012/925135. Epub 2012 Mar 14. PMID: 22474485; PMCID: PMC3312336.

Reinhardt RL, Liang HE, Locksley RM. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat Immunol*. 2009 Apr;10(4):385-93. doi: 10.1038/ni.1715. Epub 2009 Mar 1. PMID: 19252490; PMCID: PMC2714053.

Gaya M, Barral P, Burbage M, Aggarwal S, Montaner B, Warren Navia A, Aid M, Tsui C, Maldonado P, Nair U, Ghneim K, Fallon PG, Sekaly RP, Barouch DH, Shalek AK, Bruckbauer A, Strid J, Batista FD. Initiation of Antiviral B Cell Immunity Relies on Innate Signals from Spatially Positioned NKT Cells. *Cell*. 2018 Jan 25;172(3):517-533.e20. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.036. Epub 2017 Dec 14. PMID: 29249358; PMCID: PMC5786505.

Lee MSJ, Natsume-Kitatani Y, Temizoz B, Fujita Y, Konishi A, Matsuda K, Igari Y, Tsukui T, Kobiyama K, Kuroda E, Onishi M, Marichal T, Ise W, Inoue T, Kurosaki T, Mizuguchi K, Akira S, Ishii KJ, Coban C. B cell-intrinsic MyD88 signaling controls IFN- γ -mediated early IgG2c class switching in mice in response to a particulate adjuvant. *Eur J Immunol*. 2019 Sep;49(9):1433-1440. doi: 10.1002/eji.201848084. Epub 2019 May 21. PMID: 31087643.

Gerth AJ, Lin L, Peng SL. T-bet regulates T-independent IgG2a class switching. *Int Immunol*. 2003 Aug;15(8):937-44. doi: 10.1093/intimm/dxg093. PMID: 12882831.

Crosby CM, Kronenberg M. Tissue-specific functions of invariant natural killer T cells. *Nat Rev Immunol*. 2018 Sep;18(9):559-574. doi: 10.1038/s41577-018-0034-2. PMID: 29967365; PMCID: PMC6343475.

Stetson DB, Mohrs M, Reinhardt RL, Baron JL, Wang ZE, Gapin L, Kronenberg M, Locksley RM. Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function. *J Exp Med*. 2003 Oct 6;198(7):1069-76. doi: 10.1084/jem.20030630. PMID: 14530376; PMCID: PMC2194220.

Wilson MT, Johansson C, Olivares-Villagómez D, Singh AK, Stanic AK, Wang CR, Joyce S, Wick MJ, Van Kaer L. The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 16;100(19):10913-8. doi: 10.1073/pnas.1833166100. Epub 2003 Sep 5. PMID: 12960397; PMCID: PMC196902.

Chang PP, Barral P, Fitch J, Pratama A, Ma CS, Kallies A, Hogan JJ, Cerundolo V, Tangye SG, Bittman R, Nutt SL, Brink R, Godfrey DI, Batista FD, Vinuesa CG. Identification of Bcl-6-dependent follicular helper NKT cells that provide cognate help for B cell responses. *Nat Immunol*. 2011 Nov 27;13(1):35-43. doi: 10.1038/ni.2166. PMID: 22120117.

Girardi E, Zajonc DM. Molecular basis of lipid antigen presentation by CD1d and recognition by natural killer T cells. *Immunol Rev*. 2012 Nov;250(1):167-79. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01166.x. PMID: 23046129; PMCID: PMC3471380.

Nyambayar D, Iwabuchi K, Hedlund E, Murakawa S, Shirai K, Iwabuchi C, Kon Y, Miyazaki Y, Yanagawa Y, Onoé K. Characterization of NKT-cell hybridomas expressing invariant T-cell antigen receptors. *J Clin Exp Hematop*. 2007 Apr;47(1):1-8. doi: 10.3960/jslrt.47.1. PMID: 17510531.

Yu KO, Im JS, Molano A, Dutronc Y, Illarionov PA, Forestier C, Fujiwara N, Arias I, Miyake S, Yamamura T, Chang YT, Besra GS, Porcelli SA. Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acyl variants of alpha-

galactosylceramides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar 1;102(9):3383-8. doi: 10.1073/pnas.0407488102. Epub 2005 Feb 18. PMID: 15722411; PMCID: PMC552918.

Garcia B, Rodríguez R, Angulo I, Heath AW, Howard MC, Subiza JL. Differential effects of transforming growth factor-beta 1 on IgA vs. IgG2b production by lipopolysaccharide-stimulated lymph node B cells: a comparative study with spleen B cells. *Eur J Immunol*. 1996 Oct;26(10):2364-70. doi: 10.1002/eji.1830261014. PMID: 8898946.

Shissler SC, Webb TJ. The ins and outs of type I iNKT cell development. *Mol Immunol*. 2019 Jan;105:116-130. doi: 10.1016/j.molimm.2018.09.023. Epub 2018 Nov 28. PMID: 30502719; PMCID: PMC6331266.

Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Van Kaer L, Saiki I, Okumura K. Differential regulation of Th1 and Th2 functions of NKT cells by CD28 and CD40 costimulatory pathways. *J Immunol*. 2001 May 15;166(10):6012-8. doi: 10.4049/jimmunol.166.10.6012. PMID: 11342617.

Carreño LJ, Saavedra-Ávila NA, Porcelli SA. Synthetic glycolipid activators of natural killer T cells as immunotherapeutic agents. *Clin Transl Immunology*. 2016 Apr 8;5(4):e69. doi: 10.1038/cti.2016.14. PMID: 27195112; PMCID: PMC4855264.

Kain L, Costanzo A, Webb B, Holt M, Bendelac A, Savage PB, Teyton L. Endogenous ligands of natural killer T cells are alpha-linked glycosylceramides. *Mol Immunol*. 2015 Dec;68(2 Pt A):94-7. doi: 10.1016/j.molimm.2015.06.009. Epub 2015 Jul 2. PMID: 26141240; PMCID: PMC4624034.

Matsuda JL, Naidenko OV, Gapin L, Nakayama T, Taniguchi M, Wang CR, Koezuka Y, Kronenberg M. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J Exp Med*. 2000 Sep 4;192(5):741-54. doi: 10.1084/jem.192.5.741. PMID: 10974039; PMCID: PMC2193268.

Engel I, Seumois G, Chavez L, Samaniego-Castruita D, White B, Chawla A, Mock D, Vijayanand P, Kronenberg M. Innate-like functions of natural killer T cell subsets result from highly divergent gene programs. *Nat Immunol*. 2016 Jun;17(6):728-39. doi: 10.1038/ni.3437. Epub 2016 Apr 18. Erratum in: *Nat Immunol*. 2019 Dec;20(12):1700. PMID: 27089380; PMCID: PMC4944658.

Slauenwhite D, Johnston B. Regulation of NKT Cell Localization in Homeostasis and Infection. *Front Immunol*. 2015 May 27;6:255. doi: 10.3389/fimmu.2015.00255. PMID: 26074921; PMCID: PMC4445310.

Jimeno R, Lebrusant-Fernandez M, Margreitter C, Lucas B, Veerapen N, Besra GS, Fraternali F, Spencer J, Anderson G, Barral P. Correction: Tissue-specific shaping of the TCR repertoire and antigen specificity of iNKT cells. *Elife*. 2020 Mar 18;9:e56997. doi: 10.7554/eLife.56997. Erratum for: *Elife*. 2019 Dec 16;8: PMID: 32186513; PMCID: PMC7080501.

Lee YJ, Wang H, Starrett GJ, Phuong V, Jameson SC, Hogquist KA. Tissue-Specific Distribution of iNKT Cells Impacts Their Cytokine Response. *Immunity*. 2015 Sep

15;43(3):566-78. doi: 10.1016/j.immuni.2015.06.025. Epub 2015 Sep 8. PMID: 26362265; PMCID: PMC4575275.

Kwon DI, Lee YJ. Lineage Differentiation Program of Invariant Natural Killer T Cells. *Immune Netw.* 2017 Dec;17(6):365-377. doi: 10.4110/in.2017.17.6.365. Epub 2017 Nov 27. PMID: 29302250; PMCID: PMC5746607.

Laurent X, Renault N, Farce A, Chavatte P, Hénon E. Relationships between Th1 or Th2 iNKT cell activity and structures of CD1d-antigen complexes: meta-analysis of CD1d-glycolipids dynamics simulations. *PLoS Comput Biol.* 2014 Nov 6;10(11):e1003902. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003902. PMID: 25376021; PMCID: PMC4222593.

Chennamadhavuni D, Saavedra-Avila NA, Carreño LJ, Guberman-Pfeffer MJ, Arora P, Yongqing T, Pryce R, Koay HF, Godfrey DI, Keshipeddy S, Richardson SK, Sundararaj S, Lo JH, Wen X, Gascón JA, Yuan W, Rossjohn J, Le Nours J, Porcelli SA, Howell AR. Dual Modifications of α -Galactosylceramide Synergize to Promote Activation of Human Invariant Natural Killer T Cells and Stimulate Anti-tumor Immunity. *Cell Chem Biol.* 2018 May 17;25(5):571-584.e8. doi: 10.1016/j.chembiol.2018.02.009. Epub 2018 Mar 22. Erratum in: *Cell Chem Biol.* 2018 Jul 19;25(7):925. PMID: 29576533; PMCID: PMC6025895.

Van Kaer L, Wu L. Therapeutic Potential of Invariant Natural Killer T Cells in Autoimmunity. *Front Immunol.* 2018 Mar 13;9:519. doi: 10.3389/fimmu.2018.00519. PMID: 29593743; PMCID: PMC5859017.

Sag D, Krause P, Hedrick CC, Kronenberg M, Wingender G. IL-10-producing NKT10 cells are a distinct regulatory invariant NKT cell subset. *J Clin Invest.* 2014 Sep;124(9):3725-40. doi: 10.1172/JCI72308. Epub 2014 Jul 25. PMID: 25061873; PMCID: PMC4151203.

Vomhof-DeKrey EE, Yates J, Leadbetter EA. Invariant NKT cells provide innate and adaptive help for B cells. *Curr Opin Immunol.* 2014 Jun;28:12-7. doi: 10.1016/j.coi.2014.01.007. Epub 2014 Feb 8. PMID: 24514004; PMCID: PMC4346131.

Tyznik AJ, Farber E, Girardi E, Birkholz A, Li Y, Chitale S, So R, Arora P, Khurana A, Wang J, Porcelli SA, Zajonc DM, Kronenberg M, Howell AR. Glycolipids that elicit IFN- γ -biased responses from natural killer T cells. *Chem Biol.* 2011 Dec 23;18(12):1620-30. doi: 10.1016/j.chembiol.2011.10.015. PMID: 22195564; PMCID: PMC3246403.

Arora P, Kharkwal SS, Ng TW, Kunnath-Velayudhan S, Saini NK, Johndrow CT, Chang YT, Besra GS, Porcelli SA. "Endocytic pH regulates cell surface localization of glycolipid antigen loaded CD1d complexes". *Chem Phys Lipids.* 2016 Jan;194:49-57. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2015.10.006. Epub 2015 Nov 6. PMID: 26496152.

Aspesslagh S, Li Y, Yu ED, Pauwels N, Trappeniers M, Girardi E, Decruy T, Van Beneden K, Venken K, Drennan M, Leybaert L, Wang J, Franck RW, Van Calenbergh S, Zajonc DM, Elewaut D. Galactose-modified iNKT cell agonists

stabilized by an induced fit of CD1d prevent tumour metastasis. *EMBO J.* 2011 Jun 1;30(11):2294-305. doi: 10.1038/emboj.2011.145. Epub 2011 May 6. PMID: 21552205; PMCID: PMC3117654

Bai L, Sagiv Y, Liu Y, Freigang S, Yu KO, Teyton L, Porcelli SA, Savage PB, Bendelac A. Lysosomal recycling terminates CD1d-mediated presentation of short and polyunsaturated variants of the NKT cell lipid antigen alphaGalCer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jun 23;106(25):10254-9. doi: 10.1073/pnas.0901228106. Epub 2009 Jun 8. PMID: 19506241; PMCID: PMC2693181.

Laurent X, Renault N, Farce A, Chavatte P, Hénon E. Relationships between Th1 or Th2 iNKT cell activity and structures of CD1d-antigen complexes: meta-analysis of CD1d-glycolipids dynamics simulations. *PLoS Comput Biol.* 2014 Nov 6;10(11):e1003902. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003902. PMID: 25376021; PMCID: PMC4222593.

Barral & cols., (2008). B cell receptor-mediated uptake of CD1d-restricted antigen augments antibody responses by recruiting invariant NKT cell help in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(24):8345-50. doi: 10.1073/pnas.0802968105.

Parekh VV, Wilson MT, Olivares-Villagómez D, Singh AK, Wu L, Wang CR, Joyce S, Van Kaer L. Glycolipid antigen induces long-term natural killer T cell anergy in mice. *J Clin Invest.* 2005 Sep;115(9):2572-83. doi: 10.1172/JCI24762. PMID: 16138194; PMCID: PMC1193878

Lyoda T, Ushida M, Kimura Y, Minamino K, Hayuka A, Yokohata S, Ehara H, Inaba K. Invariant NKT cell anergy is induced by a strong TCR-mediated signal plus co-stimulation. *Int Immunol.* 2010 Nov;22(11):905-13. doi: 10.1093/intimm/dxq444. PMID: 21118907.

Hong S, Zhang Z, Liu H, Tian M, Zhu X, Zhang Z, Wang W, Zhou X, Zhang F, Ge Q, Zhu B, Tang H, Hua Z, Hou B. B Cells Are the Dominant Antigen-Presenting Cells that Activate Naive CD4+ T Cells upon Immunization with a Virus-Derived Nanoparticle Antigen. *Immunity.* 2018 Oct 16;49(4):695-708.e4. doi: 10.1016/j.immuni.2018.08.012. Epub 2018 Oct 2. PMID: 30291027.

Carroll MC, Isenman DE. Regulation of humoral immunity by complement. *Immunity.* 2012 Aug 24;37(2):199-207. doi: 10.1016/j.immuni.2012.08.002. PMID: 22921118; PMCID: PMC5784422

Cinamon G, Zachariah MA, Lam OM, Foss FW Jr, Cyster JG. Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nat Immunol.* 2008 Jan;9(1):54-62. doi: 10.1038/ni1542. Epub 2007 Nov 25. PMID: 18037889; PMCID: PMC2488964.

Hudrisier D, Aucher A, Puaux AL, Bordier C, Joly E. Capture of target cell membrane components via trogocytosis is triggered by a selected set of surface molecules on T or B cells. *J Immunol.* 2007 Mar 15;178(6):3637-47. doi: 10.4049/jimmunol.178.6.3637. PMID: 17339461.

Zhao S, Zhang L, Xiang S, Hu Y, Wu Z, Shen J. Gnawing Between Cells and Cells in the Immune System: Friend or Foe? A Review of Trogocytosis. *Front Immunol*. 2022 Feb 3;13:791006. doi: 10.3389/fimmu.2022.791006. PMID: 35185886; PMCID: PMC8850298.

Kolašinac R, Kleusch C, Braun T, Merkel R, Csiszár A. Deciphering the Functional Composition of Fusogenic Liposomes. *Int J Mol Sci*. 2018 Jan 24;19(2):346. doi: 10.3390/ijms19020346. PMID: 29364187; PMCID: PMC5855568.

Elbahnasawy MA, Donius LR, Reinherz EL, Kim M. Co-delivery of a CD4 T cell helper epitope via covalent liposome attachment with a surface-arrayed B cell target antigen fosters higher affinity antibody responses. *Vaccine*. 2018 Oct 1;36(41):6191-6201. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.08.014. Epub 2018 Sep 7. PMID: 30197285; PMCID: PMC6192012.

Chang TZ, Stadtmiller SS, Staskevicius E, Champion JA. Effects of ovalbumin protein nanoparticle vaccine size and coating on dendritic cell processing. *Biomater Sci*. 2017 Jan 31;5(2):223-233. doi: 10.1039/c6bm00500d. PMID: 27918020; PMCID: PMC5285395.

Thapa P, Zhang G, Xia C, Gelbard A, Overwijk WW, Liu C, Hwu P, Chang DZ, Courtney A, Sastry JK, Wang PG, Li C, Zhou D. Nanoparticle formulated alpha-galactosylceramide activates NKT cells without inducing anergy. *Vaccine*. 2009 May 26;27(25-26):3484-8. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.01.047. Epub 2009 Feb 5. PMID: 19200815; PMCID: PMC5772602.

Deng S, Bai L, Reboulet R, Matthew R, Engler DA, Teyton L, Bendelac A, Savage PB. A peptide-free, liposome-based oligosaccharide vaccine, adjuvanted with a natural killer T cell antigen, generates robust antibody responses in vivo. *Chem Sci*. 2014 Apr;5(4):1437-1441. doi: 10.1039/C3SC53471E. PMID: 24683450; PMCID: PMC3966715.

Guan HH, Budzynski W, Koganty RR, Krantz MJ, Reddish MA, Rogers JA, Longenecker BM, Samuel J. Liposomal formulations of synthetic MUC1 peptides: effects of encapsulation versus surface display of peptides on immune responses. *Bioconjug Chem*. 1998 Jul-Aug;9(4):451-8. doi: 10.1021/bc970183n. PMID: 9667946.

Chen Z, Zhu S, Wang L, Xie D, Zhang H, Li X, Zheng X, Du Z, Li J, Bai L. Memory Follicular Helper Invariant NKT Cells Recognize Lipid Antigens on Memory B Cells and Elicit Antibody Recall Responses. *J Immunol*. 2018 May 1;200(9):3117-3127. doi: 10.4049/jimmunol.1701026. Epub 2018 Mar 26. PMID: 29581354.

Fujii S, Shimizu K, Smith C, Bonifaz L, Steinman RM. 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 Jul 21;198(2):267-79. doi: 10.1084/jem.20030324. PMID: 12874260; PMCID: PMC2194082.

Awasthi VD, Garcia D, Goins BA, Phillips WT. Circulation and biodistribution profiles of long-circulating PEG-liposomes of various sizes in rabbits. *Int J Pharm.* 2003 Mar 6;253(1-2):121-32. doi: 10.1016/s0378-5173(02)00703-2. PMID: 12593943.

Oussoren C, Zuidema J, Crommelin DJ, Storm G. Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection. II. Influence of liposomal size, lipid composition and lipid dose. *Biochim Biophys Acta.* 1997 Sep 4;1328(2):261-72. doi: 10.1016/s0005-2736(97)00122-3. PMID: 9315622

Manolova V, Flace A, Bauer M, Schwarz K, Saudan P, Bachmann MF. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *Eur J Immunol.* 2008 May;38(5):1404-13. doi: 10.1002/eji.200737984. PMID: 18389478

Jiang PL, Lin HJ, Wang HW, Tsai WY, Lin SF, Chien MY, Liang PH, Huang YY, Liu DZ. Galactosylated liposome as a dendritic cell-targeted mucosal vaccine for inducing protective anti-tumor immunity. *Acta Biomater.* 2015 Jan;11:356-67. doi: 10.1016/j.actbio.2014.09.019. Epub 2014 Sep 19. PMID: 25242652.

Chen M, Liu X, Fahr A. Skin penetration and deposition of carboxyfluorescein and temoporfin from different lipid vesicular systems: In vitro study with finite and infinite dosage application. *Int J Pharm.* 2011 Apr 15;408(1-2):223-34. doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.02.006. Epub 2011 Feb 21. PMID: 21316430.

Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, Khorasani S, Mozafari MR. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics.* 2018 May 18;10(2):57. doi: 10.3390/pharmaceutics10020057. PMID: 29783687; PMCID: PMC6027495.

Ma Y, Zhuang Y, Xie X, Wang C, Wang F, Zhou D, Zeng J, Cai L. The role of surface charge density in cationic liposome-promoted dendritic cell maturation and vaccine-induced immune responses. *Nanoscale.* 2011 May;3(5):2307-14. doi: 10.1039/c1nr10166h. Epub 2011 Apr 18. PMID: 21499635.

Bernfield M, Götte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:729-77. doi: 10.1146/annurev.biochem.68.1.729. PMID: 10872465.

Patil S, Sandberg A, Heckert E, Self W, Seal S. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials.* 2007 Nov;28(31):4600-7. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.029. Epub 2007 Aug 1. PMID: 17675227; PMCID: PMC2259388.

Yanasarn N, Sloat BR, Cui Z. Negatively charged liposomes show potent adjuvant activity when simply admixed with protein antigens. *Mol Pharm.* 2011 Aug 1;8(4):1174-85. doi: 10.1021/mp200016d. Epub 2011 Jun 7. PMID: 21615153; PMCID: PMC3148289

Litzinger DC, Buiting AM, van Rooijen N, Huang L. Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipathic poly(ethylene glycol)-

containing liposomes. *Biochim Biophys Acta*. 1994 Feb 23;1190(1):99-107. doi: 10.1016/0005-2736(94)90038-8. PMID: 8110825.

van Houte AJ, Snippe H, Schmitz MG, Willers JM. Characterization of immunogenic properties of haptened liposomal model membranes in mice. V. Effect of membrane composition on humoral and cellular immunogenicity. *Immunology*. 1981 Nov;44(3):561-8. PMID: 7033115; PMCID: PMC1554971.

Tana, Watarai S, Isogai E, Oguma K. Induction of intestinal IgA and IgG antibodies preventing adhesion of verotoxin-producing *Escherichia coli* to Caco-2 cells by oral immunization with liposomes. *Lett Appl Microbiol*. 2003;36(3):135-9. doi: 10.1046/j.1472-765x.2003.01278.x. PMID: 12581370.

Boyaka PN. Inducing Mucosal IgA: A Challenge for Vaccine Adjuvants and Delivery Systems. *J Immunol*. 2017 Jul 1;199(1):9-16. doi: 10.4049/jimmunol.1601775. PMID: 28630108; PMCID: PMC5719502.

Thatte J, Rath S, Bal V. Analysis of immunization route-related variation in the immune response to heat-killed *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect Immun*. 1995 Jan;63(1):99-103. doi: 10.1128/iai.63.1.99-103.1995. PMID: 7806391; PMCID: PMC172963.

Turner PV, Brabb T, Pekow C, Vasbinder MA. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2011 Sep;50(5):600-13. PMID: 22330705; PMCID: PMC3189662.

Chorny A, Casas-Recasens S, Sintes J, Shan M, Polentarutti N, García-Escudero R, Walland AC, Yeiser JR, Cassis L, Carrillo J, Puga I, Cunha C, Bastos H, Rodrigues F, Lacerda JF, Morais A, Dieguez-Gonzalez R, Heeger PS, Salvatori G, Carvalho A, Garcia-Sastre A, Blander JM, Mantovani A, Garlanda C, Cerutti A. The soluble pattern recognition receptor PTX3 links humoral innate and adaptive immune responses by helping marginal zone B cells. *J Exp Med*. 2016 Sep 19;213(10):2167-85. doi: 10.1084/jem.20150282. Epub 2016 Sep 12. Erratum in: *J Exp Med*. 2017 May 1;214(5):1559. PMID: 27621420; PMCID: PMC5030794.

Dölen Y, Valente M, Tagit O, Jäger E, Van Dinther EAW, van Riessen NK, Hruby M, Gileadi U, Cerundolo V, Figdor CG. Nanovaccine administration route is critical to obtain pertinent iNKT cell help for robust anti-tumor T and B cell responses. *Oncoimmunology*. 2020 Mar 17;9(1):1738813. doi: 10.1080/2162402X.2020.1738813. PMID: 33457086; PMCID: PMC7790498.

Klein-Schneegans AS, Kuntz L, Fonteneau P, Loor F. Serum concentrations of IgM, IgG1, IgG2b, IgG3 and IgA in C57BL/6 mice and their congenics at the *Ipr* (lymphoproliferation) locus. *J Autoimmun*. 1989 Dec;2(6):869-75. doi: 10.1016/0896-8411(89)90013-9. PMID: 2619870.

Lopez-Saucedo C, Bernal-Reynaga R, Zayas-Jahuey J, Galindo-Gomez S, Shibayama M, Garcia-Galvez C, Estrada-Parra S, Estrada-Garcia T. CD40 Ligand Deficient C57BL/6 Mouse Is a Potential Surrogate Model of Human X-Linked Hyper IgM (X-HIGM) Syndrome for Characterizing Immune Responses against Pathogens.

Biomed Res Int. 2015;2015:679850. doi: 10.1155/2015/679850. Epub 2015 May 3. PMID: 26064940; PMCID: PMC4433659.

Honjo K, Kubagawa Y, Jones DM, Dizon B, Zhu Z, Ohno H, Izui S, Kearney JF, Kubagawa H. Altered Ig levels and antibody responses in mice deficient for the Fc receptor for IgM (Fc μ R). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Sep 25;109(39):15882-7. doi: 10.1073/pnas.1206567109. Epub 2012 Sep 10. PMID: 22984178; PMCID: PMC3465379.

Castigli E, Scott S, Dedeoglu F, Bryce P, Jabara H, Bhan AK, Mizoguchi E, Geha RS. Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 16;101(11):3903-8. doi: 10.1073/pnas.0307348101. Epub 2004 Feb 26. PMID: 14988498; PMCID: PMC374342.

Tonti E, Fedeli M, Napolitano A, Iannacone M, von Andrian UH, Guidotti LG, Abrignani S, Casorati G, Dellabona P. Follicular helper NKT cells induce limited B cell responses and germinal center formation in the absence of CD4(+) T cell help. *J Immunol*. 2012 Apr 1;188(7):3217-22. doi: 10.4049/jimmunol.1103501. Epub 2012 Feb 29. PMID: 22379027; PMCID: PMC3559029.

Rampuria P, Lang GA, Devera TS, Gilmore C, Ballard JD, Lang ML. Coordination between T helper cells, iNKT cells, and their follicular helper subsets in the humoral immune response against *Clostridium difficile* toxin B. *J Leukoc Biol*. 2017 Feb;101(2):567-576. doi: 10.1189/jlb.4A0616-271R. Epub 2016 Aug 26. PMID: 27566831; PMCID: PMC5235901.

Grivel JC, Crook K, Leserman L. Endocytosis and presentation of liposome-associated antigens by B cells. *Immunomethods*. 1994 Jun;4(3):223-8. doi: 10.1006/immu.1994.1024. PMID: 7820453.

Sonoda KH, Stein-Streilein J. CD1d on antigen-transporting APC and splenic marginal zone B cells promotes NKT cell-dependent tolerance. *Eur J Immunol*. 2002 Mar;32(3):848-57. doi: 10.1002/1521-4141(200203)32:3<848::AID-IMMU848>3.0.CO;2-I. PMID: 11870629.

Chaudhry MS, Karadimitris A. Role and regulation of CD1d in normal and pathological B cells. *J Immunol*. 2014 Nov 15;193(10):4761-8. doi: 10.4049/jimmunol.1401805. PMID: 25381357; PMCID: PMC4512253.

Lee YJ, Wang H, Starrett GJ, Phuong V, Jameson SC, Hogquist KA. Tissue-Specific Distribution of iNKT Cells Impacts Their Cytokine Response. *Immunity*. 2015 Sep 15;43(3):566-78. doi: 10.1016/j.immuni.2015.06.025. Epub 2015 Sep 8. PMID: 26362265; PMCID: PMC4575275.

Díaz de Ståhl T, Dahlstrom J, Carroll MC, Heyman B. A role for complement in feedback enhancement of antibody responses by IgG3. *J Exp Med*. 2003 May 5;197(9):1183-90. doi: 10.1084/jem.20022232. Erratum in: *J Exp Med*. 2003 Jun 2;197(11):1599. PMID: 12732659; PMCID: PMC2193980.

Ferguson AR, Youd ME, Corley RB. Marginal zone B cells transport and deposit IgM-containing immune complexes onto follicular dendritic cells. *Int Immunol*. 2004 Oct;16(10):1411-22. doi: 10.1093/intimm/dxh142. Epub 2004 Aug 23. PMID: 15326094.

Veninga H, Borg EG, Vreeman K, Taylor PR, Kalay H, van Kooyk Y, Kraal G, Martinez-Pomares L, den Haan JM. Antigen targeting reveals splenic CD169+ macrophages as promoters of germinal center B-cell responses. *Eur J Immunol*. 2015 Mar;45(3):747-57. doi: 10.1002/eji.201444983. Epub 2015 Jan 14. Erratum in: *Eur J Immunol*. 2016 Feb;46(2):493. PMID: 25487358; PMCID: PMC4843951.

Barral P, Polzella P, Bruckbauer A, van Rooijen N, Besra GS, Cerundolo V, Batista FD. CD169(+) macrophages present lipid antigens to mediate early activation of iNKT cells in lymph nodes. *Nat Immunol*. 2010 Apr;11(4):303-12. doi: 10.1038/ni.1853. Epub 2010 Mar 14. PMID: 20228797; PMCID: PMC2923071.

Calabro S, Liu D, Gallman A, Nascimento MS, Yu Z, Zhang TT, Chen P, Zhang B, Xu L, Gowthaman U, Krishnaswamy JK, Haberman AM, Williams A, Eisenbarth SC. Differential Intrasplenic Migration of Dendritic Cell Subsets Tailors Adaptive Immunity. *Cell Rep*. 2016 Aug 30;16(9):2472-85. doi: 10.1016/j.celrep.2016.07.076. Epub 2016 Aug 18. PMID: 27545885; PMCID: PMC6323650.

Moran I, Grootveld AK, Nguyen A, Phan TG. Subcapsular Sinus Macrophages: The Seat of Innate and Adaptive Memory in Murine Lymph Nodes. *Trends Immunol*. 2019 Jan;40(1):35-48. doi: 10.1016/j.it.2018.11.004. Epub 2018 Nov 27. PMID: 30502023.

Stein PE, Leslie AG, Finch JT, Turnell WG, McLaughlin PJ, Carrell RW. Crystal structure of ovalbumin as a model for the reactive centre of serpins. *Nature*. 1990 Sep 6;347(6288):99-102. doi: 10.1038/347099a0. PMID: 2395463.

Pines, D., Ditkovich, J., Mukra, T., Miller, Y., Kiefer, P. M., Daschakraborty, S., Hynes, J. T., & Pines, E. (2016). How Acidic Is Carbonic Acid?. *The journal of physical chemistry. B*, 120(9), 2440–2451. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b12428>

Petelska AD, Naumowicz M, Figaszewski ZA. The influence of pH on phosphatidylethanolamine monolayer at the air/aqueous solution interface. *Cell Biochem Biophys*. 2013 Mar;65(2):229-35. doi: 10.1007/s12013-012-9424-4. PMID: 22961427; PMCID: PMC3575562

M Pasenkiewicz-Gierula M, Takaoka Y, Miyagawa H, Kitamura K, Kusumi A. Charge pairing of headgroups in phosphatidylcholine membranes: A molecular dynamics simulation study. *Biophys J*. 1999 Mar;76(3):1228-40. doi: 10.1016/S0006-3495(99)77286-3. PMID: 10049307; PMCID: PMC130010

Harasym TO, Tardi P, Longman SA, Ansell SM, Bally MB, Cullis PR, Choi LS. Poly(ethylene glycol)-modified phospholipids prevent aggregation during covalent conjugation of proteins to liposomes. *Bioconjug Chem*. 1995 Mar-Apr;6(2):187-94. doi: 10.1021/bc00032a006. PMID: 7599262.

Brooks JF, Liu X, Davies JM, Wells JW, Steptoe RJ. Tetramer-based identification of naïve antigen-specific B cells within a polyclonal repertoire. *Eur J Immunol*. 2018 Jul;48(7):1251-1254. doi: 10.1002/eji.201747447. Epub 2018 Apr 17. PMID: 29572817.

Nguyen DC, Joyner CJ, Sanz I, Lee FE. Factors Affecting Early Antibody Secreting Cell Maturation Into Long-Lived Plasma Cells. *Front Immunol*. 2019 Sep 11;10:2138. doi: 10.3389/fimmu.2019.02138. PMID: 31572364; PMCID: PMC6749102.

Bai L, Deng S, Reboulet R, Mathew R, Teyton L, Savage PB, Bendelac A. Natural killer T (NKT)-B-cell interactions promote prolonged antibody responses and long-term memory to pneumococcal capsular polysaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Oct 1;110(40):16097-102. doi: 10.1073/pnas.1303218110. Epub 2013 Sep 16. PMID: 24043771; PMCID: PMC3791701.

Albershardt TC, Iritani BM, Ruddell A. Evaluation of reference genes for quantitative PCR analysis of mouse lymphocytes. *J Immunol Methods*. 2012 Oct 31;384(1-2):196-9. doi: 10.1016/j.jim.2012.07.020. Epub 2012 Aug 4. PMID: 22884776; PMCID: PMC3432750.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45. PMID: 11328886; PMCID: PMC55695.

Lu W, Qiu L, Yan Z, Lin Z, Cao M, Hu C, Wang Z, Wang J, Yu Y, Cheng X, Cao P, Li R. Cytotoxic T cell responses are enhanced by antigen design involving the presentation of MUC1 peptide on cholera toxin B subunit. *Oncotarget*. 2015 Oct 27;6(33):34537-48. doi: 10.18632/oncotarget.5307. PMID: 26417929; PMCID: PMC4741471.

Culbreth MJ, Biryukov SS, Shoe JL, Dankmeyer JL, Hunter M, Klimko CP, Rosario-Acevedo R, Fetterer DP, Moreau AM, Welkos SL, Cote CK. The Use of Analgesics during Vaccination with a Live Attenuated *Yersinia pestis* Vaccine Alters the Resulting Immune Response in Mice. *Vaccines (Basel)*. 2019 Dec 3;7(4):205. doi: 10.3390/vaccines7040205. PMID: 31816945; PMCID: PMC6963655

Roberts AD, Davenport TM, Dickey AM, Ahn R, Sochacki KA, Taraska JW. Structurally distinct endocytic pathways for B cell receptors in B lymphocytes. *Mol Biol Cell*. 2020 Dec 1;31(25):2826-2840. doi: 10.1091/mbc.E20-08-0532. Epub 2020 Oct 21. PMID: 33085561; PMCID: PMC7851864.

Hou P, Araujo E, Zhao T, Zhang M, Massenburg D, Veselits M, Doyle C, Dinner AR, Clark MR. B cell antigen receptor signaling and internalization are mutually exclusive events. *PLoS Biol*. 2006 Jul;4(7):e200. doi: 10.1371/journal.pbio.0040200. PMID: 16719564; PMCID: PMC1470458.

Qi H. T follicular helper cells in space-time. *Nat Rev Immunol.* 2016 Oct;16(10):612-25. doi: 10.1038/nri.2016.94. Epub 2016 Aug 30. PMID: 27573485

Fornefett J, Krause J, Klose K, Fingas F, Hassert R, Benga L, Grunwald T, Müller U, Schrödl W, Baums CG. Comparative analysis of humoral immune responses and pathologies of BALB/c and C57BL/6 wildtype mice experimentally infected with a highly virulent *Rodentibacter pneumotropicus* (*Pasteurella pneumotropica*) strain. *BMC Microbiol.* 2018 May 30;18(1):45. doi: 10.1186/s12866-018-1186-8. PMID: 29848308; PMCID: PMC5977748.

Lilienthal GM, Rahmöller J, Petry J, Bartsch YC, Leliavski A, Ehlers M. Potential of Murine IgG1 and Human IgG4 to Inhibit the Classical Complement and Fcγ Receptor Activation Pathways. *Front Immunol.* 2018 May 9;9:958. doi: 10.3389/fimmu.2018.00958. PMID: 29867943; PMCID: PMC5954034.

Oki S, Tomi C, Yamamura T, Miyake S. Preferential T(h)2 polarization by OCH is supported by incompetent NKT cell induction of CD40L and following production of inflammatory cytokines by bystander cells in vivo. *Int Immunol.* 2005 Dec;17(12):1619-29. doi: 10.1093/intimm/dxh342. Epub 2005 Nov 15. PMID: 16291659.

Huda R, Strait RT, Tüzün E, Finkelman FD, Christadoss P. IgG1 deficiency exacerbates experimental autoimmune myasthenia gravis in BALB/c mice. *J Neuroimmunol.* 2015 Apr 15;281:68-72. doi: 10.1016/j.jneuroim.2015.03.004. Epub 2015 Mar 6. PMID: 25867470; PMCID: PMC4395862.

Neuberger MS, Rajewsky K. Activation of mouse complement by monoclonal mouse antibodies. *Eur J Immunol.* 1981 Dec;11(12):1012-6. doi: 10.1002/eji.1830111212. PMID: 7327198.

Snapper CM, Mond JJ. Towards a comprehensive view of immunoglobulin class switching. *Immunol Today.* 1993 Jan;14(1):15-7. doi: 10.1016/0167-5699(93)90318-F. PMID: 8442856.

Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:145-73. doi: 10.1146/annurev.iy.07.040189.001045. PMID: 2523712.

Dougan SK, Ogata S, Hu CC, Grotenbreg GM, Guillen E, Jaenisch R, Ploegh HL. IgG1+ ovalbumin-specific B-cell transnuclear mice show class switch recombination in rare allelically included B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Aug 21;109(34):13739-44. doi: 10.1073/pnas.1210273109. Epub 2012 Aug 6. PMID: 22869725; PMCID: PMC3427072.

Horton MB, Cheon H, Duffy KR, Brown D, Naik SH, Alvarado C, Groom JR, Heinzl S, Hodgkin PD. Lineage tracing reveals B cell antibody class switching is stochastic, cell-autonomous, and tuneable. *Immunity.* 2022 Oct 11;55(10):1843-1855.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2022.08.004. Epub 2022 Sep 14. PMID: 36108634.

Kelso A, Groves P, Ramm L, Doyle AG. Single-cell analysis by RT-PCR reveals differential expression of multiple type 1 and 2 cytokine genes among cells within polarized CD4⁺ T cell populations. *Int Immunol*. 1999 Apr;11(4):617-21. doi: 10.1093/intimm/11.4.617. PMID: 10323215.

Hasbold J, Hong JS, Kehry MR, Hodgkin PD. 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 Oct 15;163(8):4175-81. PMID: 10510353.

Clancy-Thompson E, Chen GZ, LaMarche NM, Ali LR, Jeong HJ, Crowley SJ, Boelaars K, Brenner MB, Lynch L, Dougan SK. Transnuclear mice reveal Peyer's patch iNKT cells that regulate B-cell class switching to IgG1. *EMBO J*. 2019 Jul 15;38(14):e101260. doi: 10.15252/embj.2018101260. Epub 2019 May 31. PMID: 31304630; PMCID: PMC6627243

Lang GA, Amadou Amani S, Quinn JL, Axtell RC, Lang ML. Immunization-Expanded NKT Follicular Helper Cells Drive IgG1 Isotype Switch against an Exogenous T-Independent Polysaccharide but Do Not Promote Recall Responses. *Immunotoxins*. 2019 Mar;3(3):88-93. doi: 10.4049/immunohorizons.1800081. PMID: 31342012; PMCID: PMC6655531.

Lang GA, Shrestha B, Amadou Amani S, Shadid TM, Ballard JD, Lang ML. α -Galactosylceramide-Reactive NKT Cells Increase IgG1 Class Switch against a *Clostridioides difficile* Polysaccharide Antigen and Enhance Immunity against a Live Pathogen Challenge. *Infect Immun*. 2021 Oct 15;89(11):e0043821. doi: 10.1128/IAI.00438-21. Epub 2021 Aug 23. PMID: 34424751; PMCID: PMC8519279.

Barral P, Sánchez-Niño MD, van Rooijen N, Cerundolo V, Batista FD. The location of splenic NKT cells favours their rapid activation by blood-borne antigen. *EMBO J*. 2012 May 16;31(10):2378-90. doi: 10.1038/emboj.2012.87. Epub 2012 Apr 13. PMID: 22505026; PMCID: PMC3364740.

Westerhof LM, McGuire K, MacLellan L, Flynn A, Gray JI, Thomas M, Goodyear CS, MacLeod MK. Multifunctional cytokine production reveals functional superiority of memory CD4 T cells. *Eur J Immunol*. 2019 Nov;49(11):2019-2029. doi: 10.1002/eji.201848026. Epub 2019 Jun 13. PMID: 31177549; PMCID: PMC6900100.

Zhang X, Zhang Y, Ba Z, Kyritsis N, Casellas R, Alt FW. Fundamental roles of chromatin loop extrusion in antibody class switching. *Nature*. 2019 Nov;575(7782):385-389. doi: 10.1038/s41586-019-1723-0. Epub 2019 Oct 30. PMID: 31666703; PMCID: PMC6856444.

Falconer DJ, Barb AW. Mouse IgG2c Fc loop residues promote greater receptor-binding affinity than mouse IgG2b or human IgG1. *PLoS One*. 2018 Feb

6;13(2):e0192123. doi: 10.1371/journal.pone.0192123. Erratum in: PLoS One. 2018 Apr 24;13(4):e0196609. PMID: 29408873; PMCID: PMC5800599

Mesin L, Ersching J, Victora GD. Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity*. 2016 Sep 20;45(3):471-482. doi: 10.1016/j.immuni.2016.09.001. PMID: 27653600; PMCID: PMC5123673.

Riedel R, Addo R, Ferreira-Gomes M, Heinz GA, Heinrich F, Kummer J, Greiff V, Schulz D, Klaeden C, Cornelis R, Menzel U, Kröger S, Stervbo U, Köhler R, Haftmann C, Kühnel S, Lehmann K, Maschmeyer P, McGrath M, Naundorf S, Hahne S, Sercan-Alp Ö, Siracusa F, Stefanowski J, Weber M, Westendorf K, Zimmermann J, Hauser AE, Reddy ST, Durek P, Chang HD, Mashreghi MF, Radbruch A. Discrete populations of isotype-switched memory B lymphocytes are maintained in murine spleen and bone marrow. *Nat Commun*. 2020 May 22;11(1):2570. doi: 10.1038/s41467-020-16464-6. PMID: 32444631; PMCID: PMC7244721.

De Santo C, Arscott R, Booth S, Karydis I, Jones M, Asher R, Salio M, Middleton M, Cerundolo V. Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A. *Nat Immunol*. 2010 Nov;11(11):1039-46. doi: 10.1038/ni.1942. Epub 2010 Oct 3. PMID: 20890286; PMCID: PMC3001335.

Li Y, Wang W, Yang F, Xu Y, Feng C, Zhao Y. The regulatory roles of neutrophils in adaptive immunity. *Cell Commun Signal*. 2019 Nov 14;17(1):147. doi: 10.1186/s12964-019-0471-y. PMID: 31727175; PMCID: PMC6854633.

Barr TA, Brown S, Mastroeni P, Gray D. B cell intrinsic MyD88 signals drive IFN-gamma production from T cells and control switching to IgG2c. *J Immunol*. 2009 Jul 15;183(2):1005-12. doi: 10.4049/jimmunol.0803706. Epub 2009 Jun 19. PMID: 19542370; PMCID: PMC7224988.

Iweala OI, Smith DW, Matharu KS, Sada-Ovalle I, Nguyen DD, Dekruyff RH, Umetsu DT, Behar SM, Nagler CR. Vaccine-induced antibody isotypes are skewed by impaired CD4 T cell and invariant NKT cell effector responses in MyD88-deficient mice. *J Immunol*. 2009 Aug 15;183(4):2252-60. doi: 10.4049/jimmunol.0804011. Epub 2009 Jul 20. PMID: 19620295; PMCID: PMC4454352

Raftery MJ, Wolter E, Fillatreau S, Meisel H, Kaufmann SH, Schönrich G. NKT cells determine titer and subtype profile of virus-specific IgG antibodies during herpes simplex virus infection. *J Immunol*. 2014 May 1;192(9):4294-302. doi: 10.4049/jimmunol.1300148. Epub 2014 Mar 28. PMID: 24683192.

Lang GA, Amadou Amani S, Quinn JL, Axtell RC, Lang ML. Immunization-Expanded NKT Follicular Helper Cells Drive IgG1 Isotype Switch against an Exogenous T-Independent Polysaccharide but Do Not Promote Recall Responses. *Immunchorizons*. 2019 Mar;3(3):88-93. doi: 10.4049/immunchorizons.1800081. PMID: 31342012; PMCID: PMC6655531.

Toellner KM. Cognate interactions: extrafollicular IL-4 drives germinal-center reactions, a new role for an old cytokine. *Eur J Immunol*. 2014 Jul;44(7):1917-20. doi: 10.1002/eji.201444825. PMID: 24965782; PMCID: PMC4140537.

Lorenz M, Jung S, Radbruch A. Switch transcripts in immunoglobulin class switching. *Science*. 1995 Mar 24;267(5205):1825-8. doi: 10.1126/science.7892607. PMID: 7892607.

Hein K, Lorenz MG, Siebenkotten G, Petry K, Christine R, Radbruch A. Processing of switch transcripts is required for targeting of antibody class switch recombination. *J Exp Med*. 1998 Dec 21;188(12):2369-74. doi: 10.1084/jem.188.12.2369. PMID: 9858523; PMCID: PMC2212419.

Barnett BE, Staupe RP, Odorizzi PM, Palko O, Tomov VT, Mahan AE, Gunn B, Chen D, Paley MA, Alter G, Reiner SL, Lauer GM, Teijaro JR, Wherry EJ. Cutting Edge: B Cell-Intrinsic T-bet Expression Is Required To Control Chronic Viral Infection. *J Immunol*. 2016 Aug 15;197(4):1017-22. doi: 10.4049/jimmunol.1500368. Epub 2016 Jul 18. PMID: 27430722; PMCID: PMC4975981.

McHeyzer-Williams LJ, Milpied PJ, Okitsu SL, McHeyzer-Williams MG. Class-switched memory B cells remodel BCRs within secondary germinal centers. *Nat Immunol*. 2015 Mar;16(3):296-305. doi: 10.1038/ni.3095. Epub 2015 Feb 2. PMID: 25642821; PMCID: PMC4333102.

Taylor JJ, Pape KA, Jenkins MK. A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response. *J Exp Med*. 2012 Mar 12;209(3):597-606. doi: 10.1084/jem.20111696. Epub 2012 Feb 27. PMID: 22370719; PMCID: PMC3302224.

Shah HB, Koelsch KA. B-Cell ELISPOT: For the Identification of Antigen-Specific Antibody-Secreting Cells. *Methods Mol Biol*. 2015;1312:419-26. doi: 10.1007/978-1-4939-2694-7_42. PMID: 26044023.

Juno JA, Stalker AT, Waruk JL, Oyugi J, Kimani M, Plummer FA, Kimani J, Fowke KR. Elevated expression of LAG-3, but not PD-1, is associated with impaired iNKT cytokine production during chronic HIV-1 infection and treatment. *Retrovirology*. 2015 Feb 13;12:17. doi: 10.1186/s12977-015-0142-z. PMID: 25810006; PMCID: PMC4332911

van den Elzen P, Garg S, León L, Brigl M, Leadbetter EA, Gumperz JE, Dascher CC, Cheng TY, Sacks FM, Illarionov PA, Besra GS, Kent SC, Moody DB, Brenner MB. Apolipoprotein-mediated pathways of lipid antigen presentation. *Nature*. 2005 Oct 6;437(7060):906-10. doi: 10.1038/nature04001. PMID: 16208376.

Freigang S, Zadorozhny V, McKinney MK, Krebs P, Herro R, Pawlak J, Kain L, Schrantz N, Masuda K, Liu Y, Savage PB, Bendelac A, Cravatt BF, Teyton L. Fatty acid amide hydrolase shapes NKT cell responses by influencing the serum transport of lipid antigen in mice. *J Clin Invest*. 2010 Jun;120(6):1873-84. doi: 10.1172/JCI40451. Epub 2010 May 17. PMID: 20484813; PMCID: PMC2877940.

Freigang S, Landais E, Zadorozhny V, Kain L, Yoshida K, Liu Y, Deng S, Palinski W, Savage PB, Bendelac A, Teyton L. Scavenger receptors target glycolipids for natural killer T cell activation. *J Clin Invest*. 2012 Nov;122(11):3943-54. doi: 10.1172/JCI62267. Epub 2012 Oct 15. PMID: 23064364; PMCID: PMC3484437.

Im JS, Arora P, Bricard G, Molano A, Venkataswamy MM, Baine I, Jerud ES, Goldberg MF, Baena A, Yu KO, Ndonye RM, Howell AR, Yuan W, Cresswell P, Chang YT, Illarionov PA, Besra GS, Porcelli SA. Kinetics and cellular site of glycolipid loading control the outcome of natural killer T cell activation. *Immunity*. 2009 Jun 19;30(6):888-98. doi: 10.1016/j.immuni.2009.03.022. PMID: 19538930; PMCID: PMC2719696.

Kawasaki N, Vela JL, Nycholat CM, Rademacher C, Khurana A, van Rooijen N, Crocker PR, Kronenberg M, Paulson JC. Targeted delivery of lipid antigen to macrophages via the CD169/sialoadhesin endocytic pathway induces robust invariant natural killer T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 May 7;110(19):7826-31. doi: 10.1073/pnas.1219888110. Epub 2013 Apr 22. PMID: 23610394; PMCID: PMC3651435.

Zhou D, Cantu C 3rd, Sagiv Y, Schrantz N, Kulkarni AB, Qi X, Mahuran DJ, Morales CR, Grabowski GA, Benlagha K, Savage P, Bendelac A, Teyton L. Editing of CD1d-bound lipid antigens by endosomal lipid transfer proteins. *Science*. 2004 Jan 23;303(5657):523-7. doi: 10.1126/science.1092009. Epub 2003 Dec 18. PMID: 14684827; PMCID: PMC2918537.

Aspeshlagh S, Li Y, Yu ED, Pauwels N, Trappeniers M, Girardi E, Decruy T, Van Beneden K, Venken K, Drennan M, Leybaert L, Wang J, Franck RW, Van Calenbergh S, Zajonc DM, Elewaut D. Galactose-modified iNKT cell agonists stabilized by an induced fit of CD1d prevent tumour metastasis. *EMBO J*. 2011 Jun 1;30(11):2294-305. doi: 10.1038/emboj.2011.145. Epub 2011 May 6. PMID: 21552205; PMCID: PMC3117654.

Nisini R, Poerio N, Mariotti S, De Santis F, Fraziano M. The Multirole of Liposomes in Therapy and Prevention of Infectious Diseases. *Front Immunol*. 2018 Feb 5;9:155. doi: 10.3389/fimmu.2018.00155. PMID: 29459867; PMCID: PMC5807682.

Canton J. Macropinocytosis: New Insights Into Its Underappreciated Role in Innate Immune Cell Surveillance. *Front Immunol*. 2018 Oct 2;9:2286. doi: 10.3389/fimmu.2018.02286. PMID: 30333835; PMCID: PMC6176211.

West MA, Prescott AR, Eskelinen EL, Ridley AJ, Watts C. Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation. *Curr Biol*. 2000 Jul 13;10(14):839-48. doi: 10.1016/s0960-9822(00)00595-9. PMID: 10899002.

Singla B, Ghoshal P, Lin H, Wei Q, Dong Z, Csányi G. PKC δ -Mediated Nox2 Activation Promotes Fluid-Phase Pinocytosis of Antigens by Immature Dendritic

Cells. *Front Immunol.* 2018 Mar 26;9:537. doi: 10.3389/fimmu.2018.00537. PMID: 29632528; PMCID: PMC5879126.

Burgdorf S, Lukacs-Kornek V, Kurts C. The mannose receptor mediates uptake of soluble but not of cell-associated antigen for cross-presentation. *J Immunol.* 2006 Jun 1;176(11):6770-6. doi: 10.4049/jimmunol.176.11.6770. PMID: 16709836.

Barral P, Polzella P, Bruckbauer A, van Rooijen N, Besra GS, Cerundolo V, Batista FD. CD169(+) macrophages present lipid antigens to mediate early activation of iNKT cells in lymph nodes. *Nat Immunol.* 2010 Apr;11(4):303-12. doi: 10.1038/ni.1853. Epub 2010 Mar 14. PMID: 20228797; PMCID: PMC2923071.

Forestier C, Takaki T, Molano A, Im JS, Baine I, Jerud ES, Illarionov P, Ndonge R, Howell AR, Santamaria P, Besra GS, DiIorenzo TP, Porcelli SA. Improved outcomes in NOD mice treated with a novel Th2 cytokine-biasing NKT cell activator. *J Immunol.* 2007 Feb 1;178(3):1415-25. doi: 10.4049/jimmunol.178.3.1415. PMID: 17237389.

Li L, Wan T, Wan M, Liu B, Cheng R, Zhang R. The effect of the size of fluorescent dextran on its endocytic pathway. *Cell Biol Int.* 2015 May;39(5):531-9. doi: 10.1002/cbin.10424. Epub 2015 Jan 26. PMID: 25623938.

Bai L, Constantinides MG, Thomas SY, Reboulet R, Meng F, Koentgen F, Teyton L, Savage PB, Bendelac A. Distinct APCs explain the cytokine bias of α -galactosylceramide variants in vivo. *J Immunol.* 2012 Apr 1;188(7):3053-61. doi: 10.4049/jimmunol.1102414. Epub 2012 Mar 5. PMID: 22393151; PMCID: PMC3311697.

Arora P, Baena A, Yu KO, Saini NK, Kharkwal SS, Goldberg MF, Kunnath-Velayudhan S, Carreño LJ, Venkataswamy MM, Kim J, Lazar-Molnar E, Lauvau G, Chang YT, Liu Z, Bittman R, Al-Shamkhani A, Cox LR, Jervis PJ, Veerapen N, Besra GS, Porcelli SA. A single subset of dendritic cells controls the cytokine bias of natural killer T cell responses to diverse glycolipid antigens. *Immunity.* 2014 Jan 16;40(1):105-16. doi: 10.1016/j.immuni.2013.12.004. Epub 2014 Jan 9. PMID: 24412610; PMCID: PMC3895174.

King IL, Amiel E, Tighe M, Mohrs K, Veerapen N, Besra G, Mohrs M, Leadbetter EA. The mechanism of splenic invariant NKT cell activation dictates localization in vivo. *J Immunol.* 2013 Jul 15;191(2):572-82. doi: 10.4049/jimmunol.1300299. Epub 2013 Jun 19. PMID: 23785119; PMCID: PMC3710125.

Calabro S, Liu D, Gallman A, Nascimento MS, Yu Z, Zhang TT, Chen P, Zhang B, Xu L, Gowthaman U, Krishnaswamy JK, Haberman AM, Williams A, Eisenbarth SC. Differential Intrasplenic Migration of Dendritic Cell Subsets Tailors Adaptive Immunity. *Cell Rep.* 2016 Aug 30;16(9):2472-85. doi: 10.1016/j.celrep.2016.07.076. Epub 2016 Aug 18. PMID: 27545885; PMCID: PMC6323650.

Okamura T, Sumitomo S, Morita K, Iwasaki Y, Inoue M, Nakachi S, Komai T, Shoda H, Miyazaki J, Fujio K, Yamamoto K. TGF- β 3-expressing CD4+CD25(-)LAG3+ regulatory T cells control humoral immune responses. *Nat Commun*. 2015 Feb 19;6:6329. doi: 10.1038/ncomms7329. PMID: 25695838; PMCID: PMC4346620.

Wang L, Liu Z, Wang L, Wu Q, Li X, Xie D, Zhang H, Zhang Y, Gu L, Xue Y, Yue T, Liu G, Ji W, Wei H, Xu T, Bai L. Spatial distribution of IL4 controls iNKT cell-DC crosstalk in tumors. *Cell Mol Immunol*. 2020 May;17(5):496-506. doi: 10.1038/s41423-019-0243-z. Epub 2019 Jun 3. PMID: 31160756; PMCID: PMC7192838.

Li SD, Huang L. Nanoparticles evading the reticuloendothelial system: role of the supported bilayer. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Oct;1788(10):2259-66. doi: 10.1016/j.bbamem.2009.06.022. Epub 2009 Jul 10. PMID: 19595666; PMCID: PMC2757503.

Palm AE, Henry C. Remembrance of Things Past: Long-Term B Cell Memory After Infection and Vaccination. *Front Immunol*. 2019 Jul 31;10:1787. doi: 10.3389/fimmu.2019.01787. PMID: 31417562; PMCID: PMC6685390.

Scharer CD, Patterson DG, Mi T, Price MJ, Hicks SL, Boss JM. Antibody-secreting cell destiny emerges during the initial stages of B-cell activation. *Nat Commun*. 2020 Aug 10;11(1):3989. doi: 10.1038/s41467-020-17798-x. PMID: 32778653; PMCID: PMC7417592.

Toney NJ, Opdenaker LM, Cicek K, Frerichs L, Kennington CR, Oberly S, Archinal H, Somasundaram R, Sims-Mourtada J. Tumor-B-cell interactions promote isotype switching to an immunosuppressive IgG4 antibody response through upregulation of IL-10 in triple negative breast cancers. *J Transl Med*. 2022 Mar 7;20(1):112. doi: 10.1186/s12967-022-03319-5. PMID: 35255925; PMCID: PMC8900352.