

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA



TESIS PROFESIONAL

***Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en Morfofisiopatología y
Citodiagnóstico***

*“Modulación de la respuesta alérgica mediante la activación de células
iNKT con análogos de α -GalCer contenidos en liposomas, en un modelo murino de asma
alérgico”*

Alumna: Fernanda Denisse Antilén Arancibia.

Tutor: PhD. Leandro J. Carreño Márquez

Una firma manuscrita en tinta azul, que parece ser la del tutor, Leandro J. Carreño Márquez.

Firma tutor

21 de julio 2022.

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA



TESIS PROFESIONAL

***Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en Morfofisiopatología y
Citodiagnóstico***

*“Modulación de la respuesta alérgica mediante la activación de células
iNKT con análogos de α -GalCer contenidos en liposomas, en un modelo murino de asma
alérgico”*

Alumna: Fernanda Denisse Antilén Arancibia.

Tutor: PhD. Leandro J. Carreño Márquez

Una firma manuscrita en tinta azul que parece ser la del tutor, Leandro J. Carreño Márquez.

Firma tutor

21 de julio 2022.

ACTA CURSO TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

La **Srta. Fernanda Denisse Antilén Arancibia**, estudiante de Tecnología Médica con Mención en Morfofisiopatología y Citodiagnóstico, cumpliendo con los requisitos establecidos en el plan de estudio, realizó durante el noveno semestre de la carrera, la Tesis Profesional titulada: **“Inhibición de la respuesta alérgica mediante la inhibición de células B mediada por células NKT”**, dirigida por el **Prof. Leandro Carreño**, académico del Programa de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

La Escuela de Tecnología Médica designó para su corrección una Comisión integrada por: **Prof. Mónica Cáceres** y el **Prof. Oscar Cerda**, ambos académicos del Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

La calificación obtenida se detalla a continuación:

Corrector 1 Mónica Cáceres	6.87	25%
Corrector 2 Oscar Cerda	6.99	25%
Tutor(es) Guía:		
Evaluación intermedia	7.00	25%
Nota final tutor	7.00	25%
Nota final tesis profesional	6.97	

En consecuencia el estudiante **Fernanda Denisse Antilén Arancibia** aprueba satisfactoriamente la asignatura.



Prof. Maroly Müller Sobarzo
Coordinador(a) curso
Trabajo de Investigación



Prof. Hernán Torres Rivera
PEC curso
Trabajo de Investigación

Dedicatoria.

A mi familia, por siempre apoyar y aguantar cada decisión académica que he tomado. En especial a mi mamá por brindarme el apoyo emocional necesario durante los últimos años, y a mí papá y hermana, por darme la estabilidad necesaria para completar mis estudios.

A mis amigos, por darme cariño, comprensión, orientación y momentos de alegría y relajación. Gracias Javiera y Gomezal por siempre estar ahí cuando necesitaba ayuda y acompañamiento.

A mis mascotas, Éponine, Charlotte, Sabrina, Benjamín y ratoncitos quienes me han entregado cariño y risas y en especial a Copito, quién ha sido mi compañero fiel y me ha tolerado los últimos 13 años durante cada buena y mala decisión que he tomado.

A los profesores y profesoras y tecnólogos médicos que he tenido la fortuna de conocer durante mi tesis e internado, que me han forjado y se han tomado el tiempo de enseñarme lo que significa ser una buena tecnóloga.

Agradecimientos.

Al Dr. Leandro Carreño por haber confiado en mí y en mis habilidades al haberme permitido realizar mi tesis profesional en su laboratorio. Gracias por la atención y oportunidades que me brindó.

Al laboratorio de Inmunomodulación, lugar en donde realicé mi tesis, por la ayuda y orientación, así como también, agradecer al laboratorio de Envejecimiento y Reparación Tisular y al laboratorio de Mecanismos de Infección por haberme permitido desarrollar elementos histológicos claves de mi tesis y a Alejandro por quedarse tiñendo placas conmigo hasta las 10 pm.

A la Escuela de Tecnología Médica y a la profesora Marioly Müller y profesor Sebastián Indo por dejarme entrar al laboratorio para cortar y sacar fotos, además de brindarme apoyo emocional.

Esta tesis fue financiada gracias al proyecto FONDEF 21I10335.

Índice.

Índice.	4
Resumen.	5
Introducción.	6
Hipótesis.	12
Objetivo general.	12
Objetivos específicos.	12
Materiales y Métodos.	13
Resultados.	21
Discusión.	41
Conclusiones.	44
Bibliografía.	45
Anexos.	50

Resumen.

El asma es una enfermedad alérgica crónica inflamatoria que afecta a las vías respiratorias caracterizada por la remodelación del tejido respiratorio acompañado de una presencia elevada de eosinófilos. Las células T asesinas naturales invariantes (iNKT) son capaces de secretar rápidamente una amplia gama de citoquinas pro y antiinflamatorias, modulando las funciones de las células de la inmunidad innata y adaptativa. El subtipo celular de iNKT denominado NKT10 presenta un posible rol regulador debido a su secreción de IL-10. A través de la producción de IL-10, las células iNKT redujeron la enfermedad en la encefalomiелitis autoinmune experimental, un modelo de ratón de enfermedad autoinmune. La secreción de IL-10 inhibe aspectos claves de la respuesta alérgica, como cambio de isotipo y producción de IgE. Evidencias experimentales obtenidas en nuestro laboratorio demostraron que se puede promover la expansión de células NKT10 con α -GalCer, o análogos de α -GalCer contenidos en liposomas.

En este trabajo se buscó determinar si la activación de células iNKT de subtipo regulador mediante AH10-7 disminuye los efectos de la respuesta alérgica en un modelo murino de asma alérgico inducido por OVA. Para esto, se realizaron dos escenarios, preventivo y terapéutico. En ambos se evaluó su capacidad de disminuir focos de infiltrado inflamatorio, así como también la producción de mucus en las vías respiratorias, además se determinaron los niveles de eosinófilos y los niveles de IgE específico por OVA encontrados en el suero. Se encontró que AH10-7 presentaba un rol protector contra la inflamación solamente en un escenario preventivo, reduciendo los cambios histopatológicos provocados por el asma y disminuyendo el reclutamiento de eosinófilos en el tejido pulmonar, sin embargo, no se observaron los mismos efectos en un escenario terapéutico.

Introducción.

Alergia.

Mundialmente, las enfermedades alérgicas o atópicas afectan aproximadamente a un 25% de la población (1) en países industrializados y constituyen diversas enfermedades en las cuales se produce una respuesta alérgica, correspondiente a una reacción de hipersensibilidad tipo 1 y se definen como una respuesta anormal de la inmunidad adaptativa que ocurre en contra de sustancias ambientales no-infecciosas denominadas alérgenos, cuando un individuo que ha producido anticuerpos IgE en respuesta a un alérgeno se expone nuevamente a él, desencadenando una serie de respuestas inflamatorias características de la alergia.

La respuesta alérgica se puede separar en fases (1), la primera corresponde a la sensibilización, en la cual el alérgeno entra al tejido y es encontrado y procesado por células dendríticas que se activan y maduran, migrando al linfonodo regional en donde se presentan los péptidos del alérgeno a células T *naïve* bajo un contexto de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), cambiando su fenotipo a células T helper de tipo 2 (T_H2). Posterior a esto, el linfocito T_H2 va a interactuar con las células B, promoviendo su maduración a células plasmáticas y posterior secreción de anticuerpos IgE mediante la liberación de interleuquinas (IL)-4 por parte del linfocito T_H2 (2).

La siguiente fase, denominada reacción inmediata o temprana, ocurre una vez que el individuo ya sensibilizado contra el alérgeno se expone nuevamente a él. Esta reacción ocurre minutos tras la exposición y sus efectos (vasodilatación, aumento en la permeabilidad vascular, edema y reclutamiento de leucocitos locales) reflejan la secreción local de mediadores preformados por la unión del alérgeno a través del receptor (*FcεRI*) a los anticuerpos IgE presentes en mastocitos y basófilos.

La última fase, corresponde a la reacción tardía, que se desarrolla hasta 9 horas después de la exposición al alérgeno y consiste en la amplificación de la respuesta alérgica mediante el reclutamiento de linfocitos

T que reconocen péptidos derivados del alérgeno y también, mediante la liberación de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento recientemente sintetizados por mastocitos, eosinófilos y basófilos. En la vía respiratoria, esta etapa se expresa morfológicamente mediante la broncoconstricción y daño al epitelio respiratorio, como también, aumento en la secreción de mucus.

El asma alérgica es una enfermedad crónica del sistema respiratorio, que es un ejemplo de enfermedad alérgica y es inducida por exposición a desencadenantes ambientales. Se caracteriza por hiperreactividad de las vías respiratorias, aumento en los niveles de IgE, presencia de infiltrado inflamatorio crónico rodeando las vías respiratorias y remodelación del tejido respiratorio que consiste en principalmente en la generación de fibrosis subepitelial, hiperplasia de células caliciformes y engrosamiento de la capa de músculo liso que rodea a las vías respiratorias (1, 3)

Células *Invariant Natural Killer T* (iNKT).

Las células T asesinas naturales invariantes (iNKT) constituyen una subpoblación heterogénea de linfocitos T especializados caracterizada por su expresión de un receptor de células T (TCR) semi-invariante conformado por una cadena invariante V α (V α 24J α 18 en humanos y V α 14J α 18 en ratones) y una cadena V β de variaciones limitadas (V β 8.2, V β 7, o V β 2 en ratones, V β 11 en humanos). Además, estas células presentan receptores comúnmente asociados a células asesinas naturales (NK, Natural Killer) como NK1.1, NK2D, Nkrp1c y miembros de la familia Ly-49 (4).

El TCR de estas células reconoce antígenos glicolípidicos presentados por CD1d, molécula no polimórfica de tipo MHC I expresada en células de linaje mieloide, linfoide, así como también células fuera del sistema hematopoyético, como las células epiteliales y vasculares de músculo liso (5, 6). Tras el reconocimiento, las células iNKT son capaces de producir y liberar rápidamente citoquinas inflamatorias y antiinflamatorias (4), como, por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-13, IL-17A, IL-21, entre otras. Esta secreción de citoquinas es capaz de inducir la activación de células B, T (CD4+, CD8+), *Natural Killer* y dendríticas en un proceso denominado

como transactivación (7). De esta manera, las células iNKT son capaces de unir a la respuesta inmune innata con la adaptativa (8). Es por esto que, estas células se encuentran involucradas en diferentes procesos como, la protección contra bacterias (9), virus (10,11), enfermedades autoinmunes (12), cáncer (13) y regulación de rechazo de aloinjerto (14). Al contrario, estas células también pueden presentar un rol patogénico en procesos como la aterosclerosis (15), hepatitis (16) y alergia (17). En el caso del asma alérgico, las células iNKT actúan como células efectoras y amplificadoras de la respuesta (18) intensificando la inflamación en las vías respiratorias, como también la presencia de citoquinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α . (19).

Activación y modulación de la respuesta de las células iNKT.

La α -galactosilceramida (α -GalCer o también conocida como KRN7000) es un glicolípido sintético derivado de una molécula aislada de la esponja marina *Agelas mauritanus*. Es capaz de unirse y ser presentada por la molécula CD1d provocando la activación de las células iNKT y su posterior secreción de citoquinas proinflamatorias, antiinflamatorias y reguladoras, siendo clasificado como un ligando de células iNKT de tipo Th0 (4, 20).

A partir de α -GalCer, se han sintetizado distintos análogos con modificaciones en la cadena esfingosina, cadena N-acilo, enlace glicosídico y fracción carbohidrato (20) esto con el fin de inducir patrones de respuestas sesgadas a tipo Th1 o Th2 y de esta manera, modular la respuesta inmune.

Entre los análogos, se encuentran OCH, que presenta una cadena esfingosina truncada en el carbón 9 y una cadena N-acilo acortada en el carbón 24 y C20:2 que presenta una cadena acilo graso menos saturada. Estas modificaciones, les otorgan una mayor solubilidad en agua, produciendo una respuesta con tendencia a fenotipo Th₂ mediante una producción predominante de IL-4 por las células iNKT, lo que los hace aptos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes (51). Por otra parte, el análogo α -C-GalCer que presenta un enlace C-glucósido, el cual aumenta su hidrofobicidad y estabilidad, presentando una

tendencia a producir una respuesta proinflamatoria T_H1 (20, 21). Estos análogos han sido asociados con efectos terapéuticos favorables en cáncer y enfermedades infecciosas en modelos murinos (22, 23). Actualmente, el análogo AH10-7, que incorpora un éster de hidrocinaomilo en C6'' y carece de C4'-OH en la base esfingoide destaca por su capacidad de activación de un fuerte perfil proinflamatorio T_H1 en estudios in vivo tanto en ratones como en humanos (21, 24).

A partir de esto, se infiere que las modificaciones que permiten un aumento en la hidrofobicidad de los ligandos generan un perfil de respuesta proinflamatorio T_H1 , mientras que las que aumentan la hidrofiliidad, presentan un perfil de respuesta antiinflamatorio T_H2 . Se sugiere que este efecto se debe a que las modificaciones que disminuyen la afinidad por la interacción TCR/CD1d-glicolipido provocan una activación más débil, lo que estimula la respuesta antiinflamatoria $Th2$ (20, 25), mientras que, afinidades altas por la interacción con el TCR favorecen la respuesta proinflamatoria $Th1$ al generar una señalización más fuerte y de mayor duración. Sin embargo, existen excepciones a este modelo por parte de algunos análogos de α -GalCer (20).

Rol tolerogénico de las células iNKT y sus subtipos.

Las células iNKT presentan un rol tolerogénico al contribuir al mantenimiento de la tolerancia inmune en enfermedades como la diabetes (28). Este rol es posible gracias a que las células iNKT expresan citoquinas antiinflamatorias o reguladoras capaces de influenciar a células de tipo reguladoras como las células T reguladoras (Treg) o B reguladoras (Breg) (26,27). Específicamente, las citoquinas que liberan las células iNKT estimuladas por α -GalCer, como IL-2, IL-4 y TGF- β generan un ambiente favorable para el reclutamiento y expansión de las células Treg (29). Además, las células iNKT pueden promover el cambio de células dendríticas inmaduras a células dendríticas tolerogénicas mediante la secreción de IL-4 e IL-10, lo cual también favorece la activación de células Tregs (30,31,32). En el caso de las células Breg, estas

pueden interactuar mediante su molécula CD1d con las células iNKT, diferenciándolas y otorgándoles una capacidad supresora de la respuesta inmune mediante la secreción de citoquinas como IL-10 e IFN γ (33).

La IL-10 es una citoquina reguladora inmune con funciones inmunosupresoras en muchas células y distintos tipos de reacciones inflamatorias. Se ha comprobado que al ser secretada por células Treg y Breg en un ambiente tolerante de alérgenos, actúa a través de células accesorias para inhibir el cambio de isotipo a IgE, así como también su producción (34). Además, actúa directamente en las células B que ya reconocieron el antígeno para promover la producción de anticuerpos IgG4 e inhibe la acción y producción de citoquinas liberadas por eosinófilos, basófilos, mastocitos, células presentadoras de antígeno y células dendríticas (35).

En ratones, la diferenciación de los subtipos de iNKT, NKT1, NKT2, NKT17, y *follicular helper NKT cells* denominados según el tipo de respuesta que provocan, se determina en etapas tempranas del desarrollo de las células en el timo y se distribuyen diferencialmente a lo largo de los órganos linfoides (36, 37). Dentro de estos subtipos, se encuentra el subtipo celular definido NKT10 que existe tanto en ratones como humanos naturalmente y que, tras ser inducido, es estable por al menos 3 meses, periodo tras el cual recuperan su función de células iNKT original (38). Este subtipo se encuentra en mayores cantidades en tejido adiposo y secretan citoquinas reguladoras como IL-2 e IL-10, por lo que se sugiere un posible rol regulador de la respuesta inmune al reducir su capacidad productora de citoquinas proinflamatorias. Se ha observado, en un modelo murino de Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE) que este subtipo tiene un rol clave en la protección contra el avance de la enfermedad a diferencia de otros subtipos de células iNKT (39).

Debido a lo anteriormente mencionado, la activación con α -GalCer de las células iNKT puede modular la respuesta inmune de las células B, mediante diversos mecanismos, como reclutando células regulatorias y contribuyendo al efecto supresor de la inflamación, además, considerando que actualmente, no existen

tratamientos que inhiban el inicio de las reacciones alérgicas, sino que solo tratamiento paliativos de los síntomas provocados, resulta importante definir blancos terapéuticos dentro de la respuesta alérgica para poder crear estrategias que prevengan el desarrollo inicial de la respuesta alérgica o que la inhiban completamente.

Bajo este contexto, se ha comprobado que los análogos de α -GalCer que generan respuesta de tipo T_H1 , como AH10-7 pueden presentar un rol dual, evidencias experimentales en nuestro laboratorio descubrieron que estimulando y expandiendo el subtipo NKT10 siguiendo un esquema en el cual se pre-estimulan las células iNKT con una dosis de análogo y 30 días después se inyecta otra dosis que, va a activar y expandir el subgrupo NKT10 (38). De esta manera, se podría modular este perfil y provocar una liberación de citoquinas tolerogénicas que modulen la acción de las células B dentro de la respuesta alérgica para la creación de un posible tratamiento que reduzca o inhiba esta respuesta en un modelo de asma alérgico murino.

Hipótesis.

La activación de células iNKT mediante AH10-7 contenido en liposoma disminuye los efectos de la respuesta alérgica en modelo murino de asma alérgico inducido por OVA.

Objetivo general.

1. Determinar el efecto de la activación de células iNKT con glicolípidos α -GalCer o AH10-7 contenidos en liposomas en la prevención o tratamiento de la inflamación en un modelo murino de asma alérgico inducido por OVA.

Objetivos específicos.

1. Semi-cuantificar histológicamente los focos de infiltrado inflamatorio y cuantificar la producción de mucus presente en el tejido pulmonar de ratones con asma alérgico inducido por OVA tratados con los glicolípidos α -GalCer o AH10-7 contenidos en liposomas.
2. Determinar niveles de eosinófilos en lavado broncoalveolar (LBA) y tejido pulmonar de ratones con asma alérgico inducido por OVA tratados con los glicolípidos α -GalCer o AH10-7 contenidos en liposomas.
3. Determinar y cuantificar la cantidad de IgE específico por OVA presente en el suero de ratones con asma alérgico inducido por OVA tratados con los glicolípidos α -GalCer o AH10-7 contenidos en liposomas.

Materiales y Métodos.

Animales.

Los ratones utilizados durante los experimentos corresponden a la especie *Mus musculus*, cepa BALB/c *wild type*, hembras en edad adulta (8-10 semanas) con peso entre 17 y 35 gramos. Fueron adquiridos desde el Bioterio central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Los animales fueron aleatoriamente asignados a los grupos experimentales y fueron mantenidos en condiciones de agua y comida *ad libitum*. Todos los procedimientos realizados fueron aprobados explícitamente por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (22557 – MED – UCH).

Anestesia y Eutanasia.

Para la realización de las inmunizaciones intranasales los animales fueron anestesiados por 2 minutos dentro de una cámara de isoflurano. Los animales fueron monitoreados por 15 minutos tras despertar de la anestesia. Para la realización de la eutanasia, se les inyectó vía intraperitoneal a los animales una dosis letal de 100 μ L de ketamina 100 mg/mL y 25 μ L de xilacina 2%.

Glicolípidos y reactivos para la síntesis de liposomas.

El lípido α -GalCer (KRN7000) fue adquirido comercialmente desde Avanti Polar Lipids (Alabama, USA), AH10-7 fue dispuesto por Amy R. Howell, PhD. de University of Connecticut, USA. Fosfatidilcolina de huevo (EPC), colesterol (Chol) y 1,2-distearoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine-N-[amino (polyethylene glycol) -2000] (DSPE-PEG2000) fueron adquiridos comercialmente desde Avanti Polar Lipids (Alabama, USA). Péptido de penetración celular octa-arginina estearilada (STR-R8) fue adquirido comercialmente desde Life Tein (USA).

Síntesis de Liposomas inmunomoduladores.

Se realizó la síntesis de vesículas lipídicas mezclando bajo campana de flujo laminar 560 nmol de EPC, 240 nmol de colesterol, 40 nmol de STR-R8, y 16 nmol de DSPE-PEG200 en solución cloroformo/metanol 2:1, luego se agregó 100 µg del glicolípido inmunomodulador correspondiente (α -GalCer o AH10-7). El solvente fue eliminado por evaporación en un desecador al vacío durante la noche, obteniendo una película lipídica que fue rehidratada, ya sea con PBS (GIBCO Life Technologies, USA) u OVA (Sigma Aldrich, USA) disuelto en PBS. Los liposomas se mezclaron y luego pasaron por un ciclo de sonicación con baño termorregulado encendido y ultracongelación a -80°C, ambas por 5 minutos. Se repitió el ciclo dos veces. Los liposomas fueron extruidos mediante una membrana de policarbonato con tamaño de poro de 800 nm en un Mini Extruder (Avanti Polar Lipids, USA), tras esto, los liposomas fueron almacenados a 4°C. Para los liposomas que contenían OVA, se removió OVA no-encapsulado mediante lavados con PBS y centrifugación a 10.000 x g por 30 minutos en una ultracentrifugadora Ultracentrifuge Sorvall™ WX+ (Thermofisher, USA), seguida por centrifugación a 80.00 x g por 30 minutos tras eliminación de sobrenadante. Los pellets obtenidos fueron re-suspendidos en PBS y almacenados a 4°C.

Reconstitución de glicolípidos.

Para su uso *in vivo*, los glicolípidos fueron disueltos en DMSO hasta llegar a una concentración de 20 mM y luego fueron disueltos nuevamente hasta llegar a una concentración de 200 µM usando una mezcla de PBS y 0,5% Tween-20. Finalmente, la solución fue diluida 1:10 con PBS precalentado a 37°C antes de las inyecciones a los animales. Cada inyección contenía 200 µL del glicolípido en vehículo con una composición final de PBS + DMSO 0,1% + 0,05% Tween 20.

Inducción modelo de alergia y tratamiento en contexto preventivo y terapéutico.

Para la inducción del modelo de alergia, los ratones BALB/c fueron sensibilizados vía intraperitoneal (i.p) con 100 µg de OVA en 1 mg de Inject™ Alum (Thermo Scientific, USA), seguido por un desafío intranasal

(i.n) con 10 ug de OVA disuelto en PBS en los días 21, 24 y 28 después de las inmunizaciones. Se administraron los tratamientos en un escenario preventivo y en un escenario terapéutico, tras la administración, se realizó nuevamente un desafío i.n con 10 ug de OVA disuelto en PBS. 24 horas después se realizó la eutanasia de los ratones.

Lavado broncoalveolar (BAL).

El lavado broncoalveolar se realizó tras la eutanasia. Primero, se abrió la caja torácica y se despejó la tráquea. Tras esto, se realizó la canalización de la tráquea con catéter. Se ocluyó, con un hilo, el bronquio izquierdo. Se obtuvo fluido broncoalveolar inyectando vía el catéter 1 mL de solución PBS-EDTA 100 μ M (Sigma-Aldrich, EUA), insuflando los pulmones y recolectando la mayor cantidad de fluido posible. El procedimiento se repitió tres veces.

Colecta de elementos celulares y no celulares de lavado broncoalveolar.

El fluido obtenido tras la realización del BAL fue centrifugado a 400 G a 4 °C por 7 minutos, luego, se recolectó el sobrenadante y se almacenó a -20 °C, el pellet se resuspendió en 200 μ L de buffer de lisis ACK y se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos. Posteriormente, se añadió 1 mL de PBS y se centrifugó a 400 G a 4 °C por 7 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 200 μ L por muestra para la posterior tinción de FACS.

Procesamiento de pulmón para tinción de citometría de flujo.

El pulmón derecho fue cortado en pequeños trozos y fue digerido con 20 μ g/ml Liberasa™ (Roche, USA) y 10 U/ml DNase I (Roche, USA) en RPMI-1640 (GIBCO Life Technologies, USA). Se incubó el tejido por 30 minutos, realizando una homogenización cada 10 minutos. Tras esto, se tamizó la emulsión por un cell strainer de 70 μ m, se lavó 2 veces con RPMI suplementado, se resuspendió y homogenizó con 2 mL de ACK

(U α D) y se llevó a 10 mL con RPMI tras una incubación de 5 minutos a 4 °C, luego, se centrifugó para eliminar el medio y se resuspendió en PBS ajustando a 15×10^6 cell/mL.

Tinción de citometría.

Se depositaron 200 μ L de las suspensiones celulares (BAL o pulmón) por pozo en una placa de 96 pocillo con fondo de V y se les añadió 50 μ L de tinción de viabilidad Live/Dead-Zombie UV (1/500). Se incubó por 30 minutos en oscuridad a 4°C. Luego, se realizó un paso de lavado con 150 μ L de buffer FACS y se centrifugó a 600 G por 7 minutos, desechando el sobrenadante. Posteriormente, se resuspendió el pellet en 50 μ L de Fc Block (1/500) y se incubó por 5 minutos a 4°C en la oscuridad. Tras esto, se realizó la tinción añadiendo 50 μ L de los siguientes anticuerpos monoclonales anti-ratón: MHCII-FITC, SiglecF-PE, F4/80-PECy5.5, CD11c-PECy7, B220- APC, TCR-APC, Ly6G-APCCy7, CD45-AlexaFluor700, CD11b-V450 y se incubó por 1 hora a 4°C en la oscuridad. Luego, se lavaron las células con buffer FACS y se fijaron con 100 μ L de PFA al 2% por 10 minutos en hielo. Se lavaron las células y se resuspendieron en 200 μ L de buffer FACS. Finalmente, se transfirieron a tubos de citometría y se almacenaron a 4°C en oscuridad.

Para analizar el porcentaje de citoquinas expresadas en células iNKT, se ajustó la estrategia gating de acuerdo con los controles fluorescence minus one (FMO). El análisis de las muestras se realizó en citómetro de 18 colores (BD LSR FORTRESSA X-20). Los datos de las células adquiridas se analizaron en el software FlowJo V10. Para evaluar la cantidad de Eosinófilos y otras líneas celulares se utilizó la siguiente estrategia de gating: Leucocitos (CD45+), Macrófagos Alveolares (CD45+/ CD11c+CD11b-/ CD64+CD24-), Células dendríticas CD103+ (CD45+/ CD11c+CD11b- /CD64-CD24+) Neutrófilos (CD45+/CD11c-CD11b+/B220-TCR-/MHCII-CD11b+/MHCII-CD24+/SiglecF+/Ly6G-) y Eosinófilos (CD45+/CD11c-CD11b+/B220-TCR-/MHCII-CD11b+/MHCII-CD24+/SiglecF-/Ly6G+).

Obtención de suero y detección de cantidad de IgE específico por OVA mediante ELISA.

Para la obtención de suero, se expuso a los animales, previa eutanasia a una fuente de calor y se realizó una incisión en la vena de la cola con un bisturí. Se recolectó la sangre en tubos eppendorf 1,5 mL. Se incubó la sangre extraída por 1 hora a 37 °C, seguida de una incubación a 4 °C de 1 hora. Posteriormente, se centrifugó la sangre a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Finalmente, se extrajo el suero.

Se realizó la detección de niveles de OVA-IgE en el suero mediante ELISA indirecto. Se sensibilizaron placas de 96 pocillos (Nunc, USA) con 50 µL de 0,5 ug de OVA (Sigma-Aldrich, USA) en PBS (GIBCO Life Technologies, USA) por pocillo por 12 horas a 4 °C. Tras esto, se realizó un lavado con 250 µl por pocillo de solución PBS-Tween 20 0,1% en una placa lavadora de ELISA (HydroFlex, Austria). Se realizó el bloqueo de los pocillos con 200 µL de solución PBS-Leche al 1% por 1 hora a 37 °C. Luego, se incubaron los pocillos con muestras de suero diluidas por 12 horas a 4 °C. Se lavaron las placas y se incubaron por 1,5 horas a temperatura ambiente con anticuerpo IgE biotinilado anti-ratón (conejo, policlonal) (clone 23G3, Abcam, UK), en una concentración de 1:500 en buffer de ensayo. Posteriormente, los pocillos se lavaron e incubaron por 1 hora a temperatura ambiente con Estreptavidina-HRP (SAv-HRP; BD Biosciences, USA), en una concentración de 1:1500 en buffer de ensayo. Por último, se añadió el sustrato TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine; Life Technologies, USA). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente por 5 minutos y se detuvo con 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 2M. Finalmente, se leyó el resultado colorimétrico en un lector de placas de ELISA (Synergy HT, Bio-Tek, USA) a 450 nm y 570 nm longitudes de onda.

Histología.

El pulmón izquierdo que fue previamente ocluido fue recolectado y posteriormente fijado por perfusión con paraformaldehído al 4% (PFA) recién preparado hasta inflar completamente el pulmón, luego, se colocó el pulmón en un recipiente la solución fijadora PFA en un volumen 20 veces mayor que la muestra por 24 horas a 4 °C. Tras esto, el pulmón fue retirado del fijador y lavado en agua corriente por 5 minutos.

Los tejidos fueron procesados en un procesador automático de tejidos (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) en los cuales se deshidrataron los tejidos con cinco pasos de etanol en graduación ascendente (70°, 95°, 100°, 100°, 100°) por una hora cada uno, luego, se aclararon las muestras con tres pasos de xilol de una hora cada uno y finalmente se impregnaron en dos pasos de Paraplast de una hora cada uno. Finalmente, los tejidos fueron incluidos en Paraplast mediante un centro de inclusión obteniendo cassettes de parafina. Se obtuvieron cortes de 3 μ m de grosor usando microtomo rotatorio tipo Minot y se adhirieron en portaobjetos de carga positiva. Los cortes fueron secados a 37°C por 1 hora y posteriormente desparafinados con dos pasos de xilol, de 10 y 5 minutos respectivamente, 3 pasos de etanol en graduación descendente (100°, 95°, 70°) hasta llegar a agua destilada por 5 minutos cada uno.

Hematoxilina – Eosina (H&E).

Para el análisis histopatológico, los cortes fueron incubados en Hematoxilina de Mayer por 3 minutos, luego, se lavaron en agua corriente por 5 minutos y en agua destilada por un par de segundos. Tras esto, se realizó la incubación de los cortes por 5 segundos en eosina acuosa e inmediatamente se lavaron los cortes con agua destilada. Tras esto, se deshidrataron los cortes en cuatro pasos de etanol en concentración ascendente (70°,95°,100°,100°) y dos pasos de xilol por 30 segundos cada uno con agitación. Finalmente, los cortes fueron montados en Entellán y cubiertos con cubreobjeto.

Tinción *Periodic Acid Schiff* (PAS).

Para la identificación de células caliciformes y producción de mucus se realizó la técnica de PAS, en la cual, los cortes obtenidos fueron tratados con ácido peryódico 1% por 5 minutos, se lavaron con agua destilada por un par de segundos con agitación, posteriormente, los cortes fueron incubados Reactivo de Schiff de Coleman durante 15 minutos y se lavaron en agua corriente tibia por 10 minutos. Finalmente, se realizó la contratinción nuclear con Hematoxilina de Mayer durante 5 minutos seguida de un paso de lavado en agua corriente por 5 minutos. Tras esto, se deshidrataron los cortes en cuatro pasos de etanol en concentración

ascendente (70°,95°,100°,100°) y dos pasos de xilol por 30 segundos cada uno con agitación. Finalmente, los cortes fueron montados en Entellán y cubiertos con cubreobjeto.

Semicuantificación y Cuantificación.

Se realizó la semicuantificación del infiltrado inflamatorio presente en las vías respiratorias (bronquio y bronquiolos) y en las regiones perivasculares mediante la tinción de Hematoxilina – Eosina. Se escogieron 5 regiones representativas de cada muestra y se realizó la semicuantificación con un sistema de puntuación de 0 a 4. Donde 0: Ausencia de células inflamatorias, 1: Pocas células inflamatorias, 2: Anillo de células inflamatorias de una capa celular de profundidad, 3: Anillo de células inflamatorias de 2-4 capas celulares de profundidad, 4: Anillo de células inflamatorias de más de 4 capas celulares de profundidad. Tras esto, se sumaron los puntajes obtenidos en las zonas perivasculares y peribronquiales/bronquiolares. Según el método descrito por Rivas *et al* (2012) (40).

Para la cuantificación de PAS se seleccionaron 5 vías aéreas aleatoriamente. Se contó manualmente el número de las células caliciformes PAS-positivas y para la cuantificación de células caliciformes en los bronquios y bronquiolos, se usó un sistema de puntuación de 0 a 4, donde 0: <0,5% de las células son PAS positivas, 1: <25%, 2: 25-50%, 3: 50-75% y 4:75%. Luego, se midió la longitud de la lámina basal de bronquiolos y bronquios mediante software ImageJ. Se normalizaron los resultados dividiendo el número de células caliciformes PAS-positivas por la longitud del perímetro epitelial bronquial en el lado basal y se expresaron los resultados como número de células PAS-positivas por mm de membrana basal. Según el método descrito en Kim *et al* (2019) (3).

Tanto las semicuantificaciones, como las cuantificaciones fueron realizadas bajo microscopio, a 40X, en regiones representativas de cada muestra, sin saber a qué grupo experimental pertenecían las muestras. Las imágenes presentadas fueron obtenidas con la cámara MiniVID 5.1 MP 1/2.5" (LW Scientific Inc).

Análisis Estadístico.

El análisis estadístico se realizó usando GraphPad Prism 7 (GraphPad Software). Las diferencias estadísticas fueron evaluadas usando pruebas paramétricas (Student's T-test o ANOVA) y pruebas no paramétricas (Mann-Whitney o Kruskal Wallis) según la normalidad de los datos. La distribución normal fue evaluada con la prueba de Kolmogorov-Smirnov

Resultados.

Obtención del modelo de asma alérgico.

Para la obtención del modelo de asma alérgico, los ratones BALB/c fueron inmunizados mediante una inyección intraperitoneal (i.p) con 100 µg OVA en 1 mg de InjectTMAlum seguido por desafíos intranasales (i.n) con 10 µg de OVA disuelta en PBS en los días 21, 24 y 28 post-inmunización. Como control, a un grupo experimental de ratones se les administró intraperitoneal e intranasalmente PBS, siendo este el grupo sin inducción de alergia. Para la evaluación del efecto del glicolípido α -GalCer y su análogo AH10-7 contenidos en liposomas, se administraron vía intravenosa los días 8 y 1 día antes de la inmunización anteriormente descrita. Para asegurar que el efecto antialérgico observado fuese por la incorporación de los glicolípidos, se agregaron dos grupos control, en donde a uno se le administró OVA contenida en liposoma en vez del glicolípido, mientras que el otro se le administró OVA soluble en vez del glicolípido. Finalmente, los efectos inflamatorios del asma fueron evaluados 24 horas después del último desafío intranasal (Fig. 1)

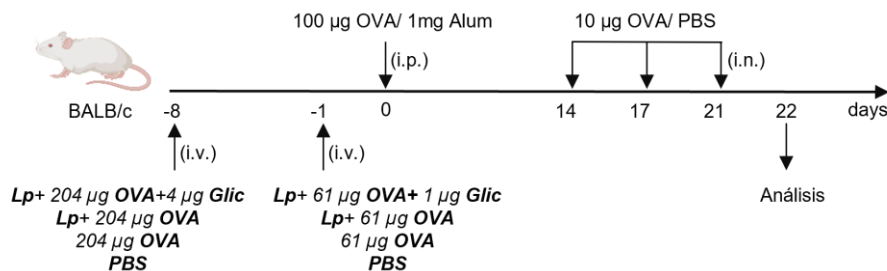


Figura 1. Obtención del modelo de asma alérgico. Escenario preventivo. Los ratones BALB/c (n= 4) fueron sensibilizados con 100 µg de OVA en 1 mg de Alum. En los días 21, 24 y 28 se realizaron los desafíos intranasales con una dosis de 10 µg de OVA en PBS. Las preparaciones liposomales y controles fueron administrados los días 8 y 1 antes de la sensibilización.

Semicuantificación de focos de infiltrado inflamatorio.

Mediante la tinción hematoxilina-eosina se pudieron observar las diferencias entre las vías respiratorias de ratones BALB/c sanos y con alergia inducida (Fig. 2) En ratones sin inducción de alergia (Fig. 2a) es posible observar el bronquio y bronquiolo con su epitelio respiratorio conservado, rodeado por estructuras alveolares sin presencia de focos de infiltrado inflamatorio. Mientras que, en ratones con alergia inducida (Fig. 2b, c, d, e, f) es posible observar cambios característicos del asma, como hipertrofia e hiperplasia de las células del epitelio respiratorio, que se aprecian como aumento en el número de células epiteliales y elongación del citoplasma de estas, hiperplasia de las células caliciformes y engrosamiento aparente de la capa muscular lisa que rodea a los bronquiolos (Fig. 2c, d, e, f). Así como también, un aumento de focos de infiltrado crónico mixto, predominantemente mononuclear.

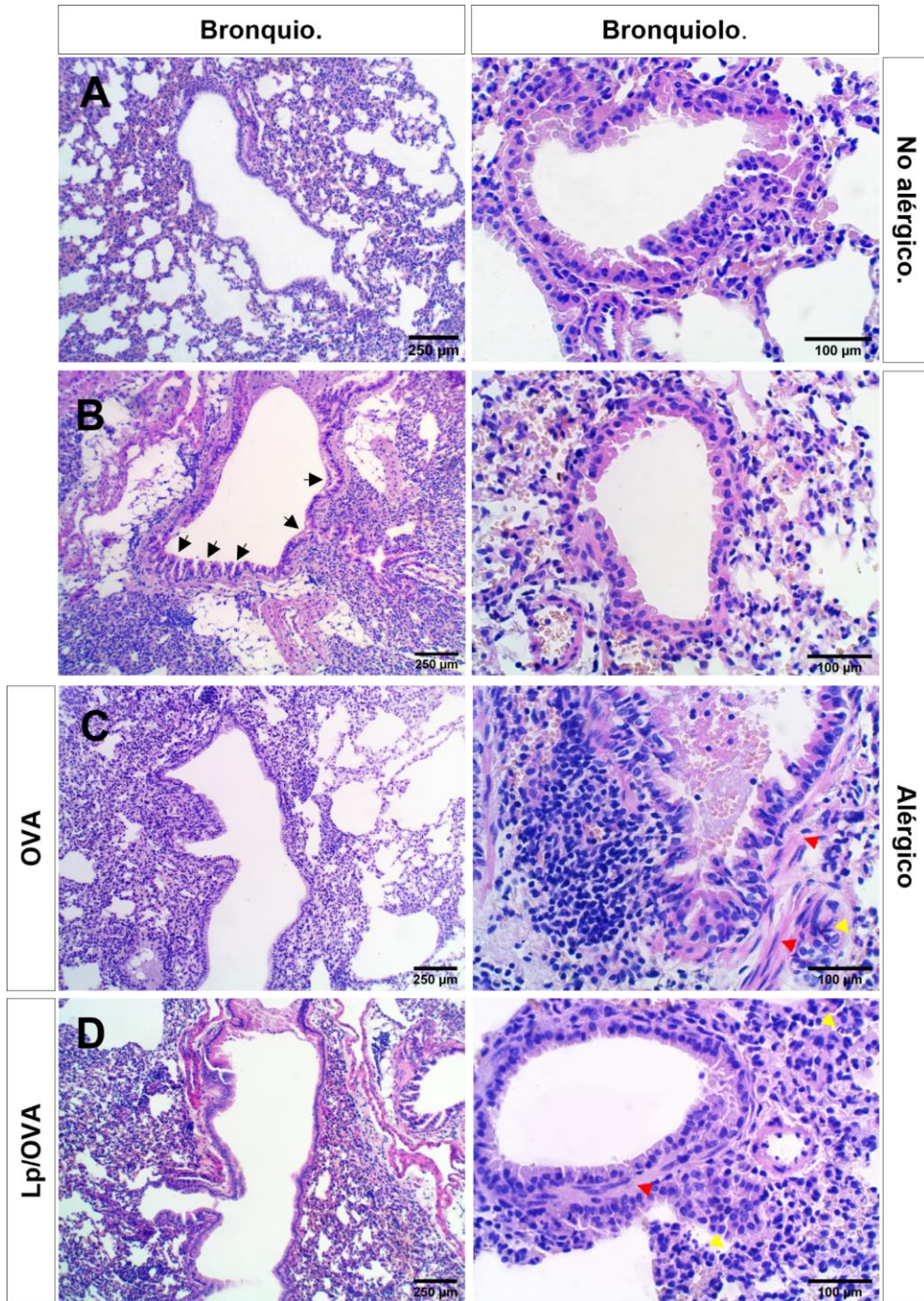
A mayor detalle, en ratones con alergia inducida (Fig. 2b) se observa la presencia de focos de infiltrado inflamatorio mononuclear cercanos al bronquio, así como también presencia de células inflamatorias mononucleares ubicadas irregularmente rodeando al bronquio. Además, es posible identificar hiperplasia de las células caliciformes en el epitelio (flechas negras). Respecto al bronquiolo, se observa presencia irregular de células inflamatorias mononucleares e hipertrofia del epitelio respiratorio.

En ratones que fueron desafiados intranasalmente con su alérgeno OVA, ya sea de forma soluble (Fig. 2c) o contenido en liposomas (Fig. 2d) es posible observar una exacerbación de los efectos observados en B. Se observa una focalización del infiltrado inflamatorio mononuclear alrededor de los vasos sanguíneos extendiéndose hacia los bronquios. En el bronquiolo, se observan focos de infiltrado inflamatorio crónico mixto, predominantemente mononuclear, compuesto predominantemente por linfocitos y en menor medida, eosinófilos (flechas amarillas) dispuestos en zonas peribronquiales (Fig. 2c) y perivasculares (Fig. 2d). También, es posible observar cambios epiteliales, como la hiperplasia e hipertrofia de las células del epitelio respiratorio, apreciándose como alargamiento del citoplasma hacia el lumen, así como también la

presencia de un tapón mucoso que presenta glóbulos rojos y células inflamatorias mononucleares (Fig. 2c) y engrosamiento de la capa muscular lisa del bronquiolo (Fig. 2c, 2d).

En ratones con alergia inducida y que fueron tratados con α -Galcer contenido en liposomas (Fig. 2e), se puede observar una aparente disminución en la extensión de los focos inflamatorios tanto en los bronquios como en los bronquiolos en comparación a ratones con alergia inducida, sin embargo, esta disminución no es significativa. Respecto a los cambios epiteliales, se observa hiperplasia e hipertrofia del epitelio respiratorio, con un aparente engrosamiento de la pared de músculo liso que rodea al bronquiolo (flecha roja). Además, se puede apreciar la constricción del lumen del bronquiolo, que constituye otro indicador del proceso de remodelación inducido por el asma. El infiltrado inflamatorio acompañante se compone de mayoritariamente de linfocitos y en menor proporción eosinófilos (flechas amarillas).

Por otra parte, en ratones a los que se les administró el análogo AH10-7 contenido en liposomas (Fig. 2f), se observa una disminución significativa ($1,7 \pm 0,85$) (Fig. 2g), en comparación a ratones alérgicos de la extensión y número de los focos de infiltrado inflamatorio peribronquiales y perivasculares que, al igual que en los casos anteriores, se componen por células linfocitarias y eosinófilos. Además, se aprecian macrófagos con hemosiderina (asteriscos), indicadores de procesos hemorrágicos patológicos. Además, se observa una aparente conservación del epitelio respiratorio normal, sin un aparente engrosamiento de la capa muscular lisa.



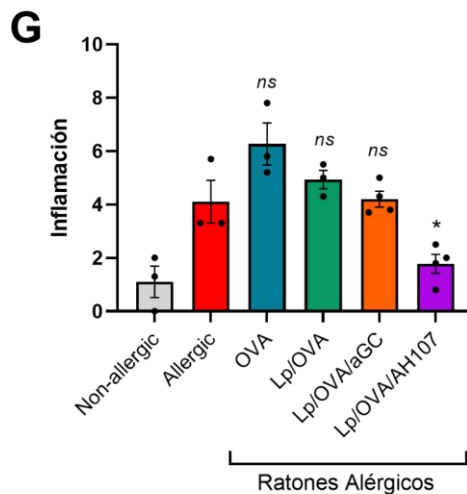
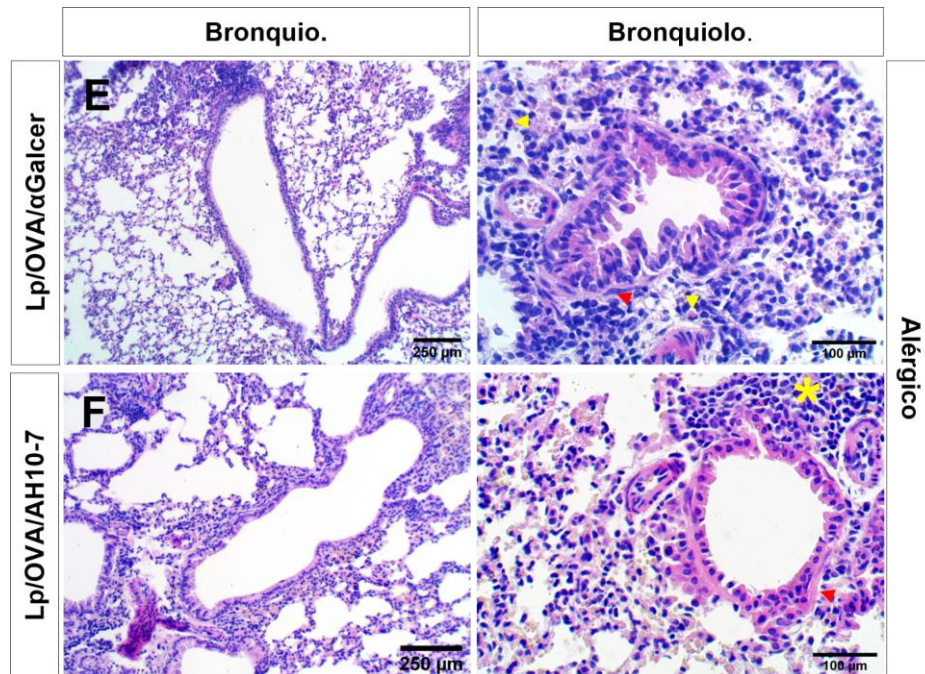


Figura 2. Tinción hematoxilina-eosina en bronquios y bronquiolos de ratones BALB/c con alergia inducida por OVA y tratados con glicolípidos α -GalCer y AH10-7. Imágenes representativas de: (A) Grupo sin inducción de alergia. (B) Grupo alérgico. (C) Grupo OVA. (D) Grupo Lp/OVA. (E) Grupo Lp/OVA/ α -GalCer. (F) Grupo Lp/OVA/ α -GalCer. Flechas amarillas indican eosinófilos, flechas rojas indican engrosamiento de capa muscular lisa, flechas negras indican células caliciformes. Asterisco (*) indica macrófagos con hemosiderina. Columna izquierda: barra de escala= 250 μ m, magnificación 100X. Columna derecha: barra de escala= 100 μ m, magnificación 400X. (G) Semicuantificación de los focos de infiltrado inflamatorio

peribronquiales y perivasculares en las vías aéreas. El gráfico ilustra el promedio \pm desviación estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas, ns = no significativo.

Cuantificación de la producción de mucus.

Para la cuantificación de las células caliciformes en el epitelio respiratorio observadas mediante la tinción de hematoxilina – eosina y como indicador de la producción de mucus, una de las características principales del asma alérgico, se realizó la tinción de PAS que identifica tanto las células caliciformes como el mucus de un color fucsia-rojizo intenso. Se contaron manualmente las células PAS-positivas en 5 campos aleatorios y se dividieron en el número de células del epitelio respiratorio total. La cuantificación de las células caliciformes PAS-positivas se expresó como número de células PAS positivas por milímetro (mm) de membrana basal para corregir por el tamaño de la vía respiratoria.

En ratones sin inducción de alergia (Fig. 3a) no se observan células ni sustancias PAS-positivas, mientras que en los ratones con inducción de alergia se observa un aumento tanto en el porcentaje de células PAS-positivas (3 ± 0) como en el número de células PAS-positivas por mm de membrana basal ($35,75 \pm 4,6$).

Ratones con alergia inducida y desafiados intranasalmente con su alérgeno OVA, ya sea soluble (Fig. 3c) o contenido en liposomas (Fig. 3d), presentan una cantidad similar de porcentaje de células PAS-positivas como en el número de células PAS-positivas por mm de membrana basal en comparación al grupo con alergia inducida, sin embargo, en estos últimos dos es posible observar tapones mucosos en el lumen bronquiolar.

En el grupo alérgico tratado con α -Galcer contenido en liposomas, es posible observar presencia de células PAS-positivas similar a los grupos alérgicos descritos anteriormente, sin presencia de tapones mucosos. Mientras que, en ratones alérgicos tratados con AH10-7 contenido en liposomas (Fig 3e), se observa una disminución significativa de células PAS-positivas ($0,5 \pm 0,6$) como en el número de células PAS-positivas

por mm de membrana basal ($3,26 \pm 3,6$), en comparación a ratones alérgicos, obteniendo valores similares a los de ratones no alérgicos (Fig. 3g).

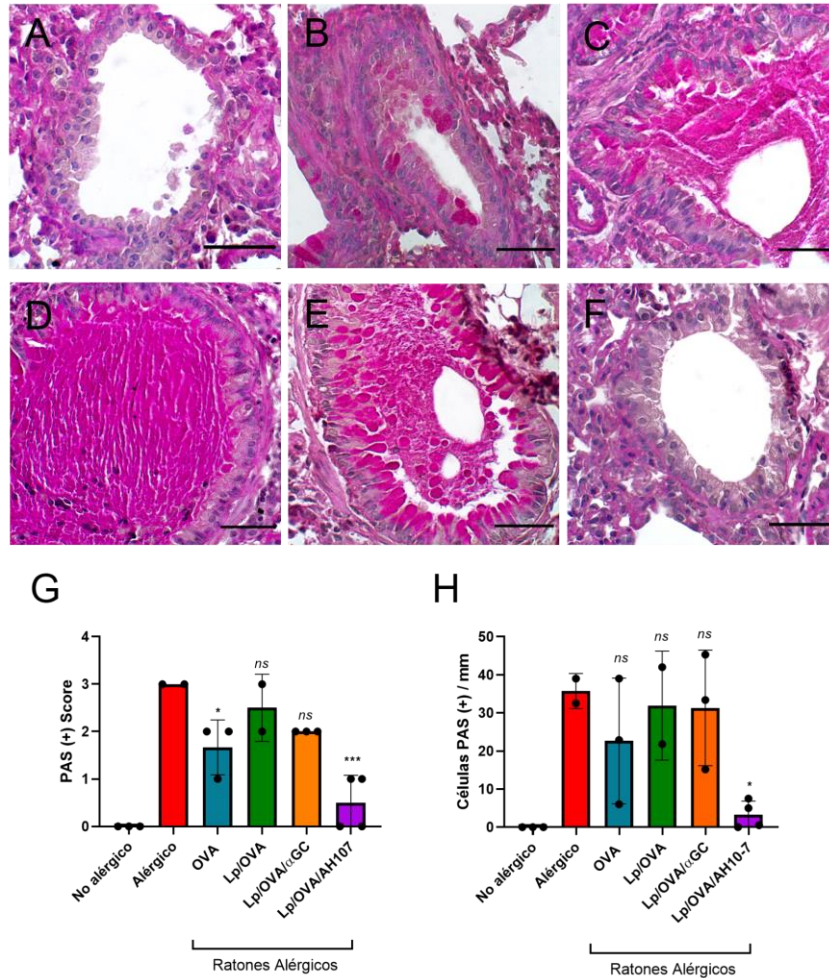


Figura 3. Tinción de PAS en bronquiolos de ratones BALB/c con alergia inducida por OVA y tratados con glicolípidos α -GalCer y AH10-7. Imágenes representativas de: (A) Grupo sin inducción de alergia. (B) Grupo alérgico. (C) Grupo OVA. (D) Grupo Lp/OVA. (E) Grupo Lp/OVA/ α -GalCer. (F) Grupo Lp/OVA/ α -GalCer. La tinción fucsia-rojiza indica presencia de células caliciformes o mucus. Barra de escala = 100 μ m. Magnificación 400X. (G) Porcentaje de células PAS (+) en el bronquiolo. (H) Número de células PAS (+) normalizado por la longitud del bronquiolo en mm. El gráfico ilustra el promedio \pm desviación estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas $<0,05$, (***) $<0,005$, ns = no significativo.

Reclutamiento de eosinófilos en pulmón y LBA.

Mediante citometría de flujo se determinaron los niveles de eosinófilos de la respuesta alérgica, de las células que infiltran el tejido pulmonar y de las células en la vía aérea extraídas desde el LBA. Estos resultados fueron obtenidos en conjunto con el candidato a Doctor, Richard García como parte de su tesis de doctorado.

En ratones con alergia inducida, los niveles de eosinófilos aumentaron casi el doble ($24,03 \pm 7,4$) y triple ($12,4 \pm 7,6$) en tejido pulmonar y LBA, respectivamente, en comparación a ratones sin alergia inducida ($15 \pm 6,2$ y $3,7 \pm 3,1$). Esto es congruente con lo que ocurre en la alergia. En comparación al grupo experimental de ratones con alergia inducida, en tejido pulmonar se observa disminución en la cantidad de eosinófilos con todos los tratamientos, siendo sólo significativa en el grupo tratado con AH10-7 contenido en liposomas ($11,8 \pm 3,94$) (Fig. 4c). Aunque esta tendencia de disminución del reclutamiento eosinofílico en el grupo tratado con AH10-7 contenido en liposomas se repitió en los valores obtenidos en LBA ($4,6 \pm 2,7$) (Fig. 4d), esta disminución no alcanzó significancia estadística. Al comparar a los dos análogos usados como tratamiento, AH10-7 contenido en liposomas presenta mayor efectividad, en comparación a α -GalCer en liposomas, en reducir la infiltración de eosinófilos

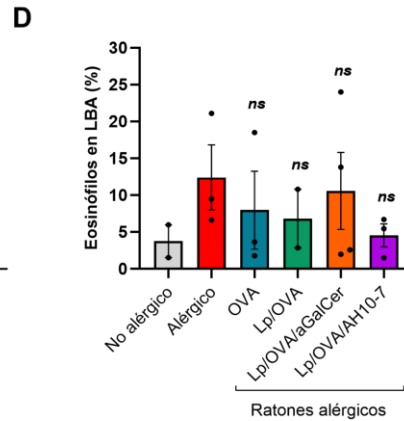
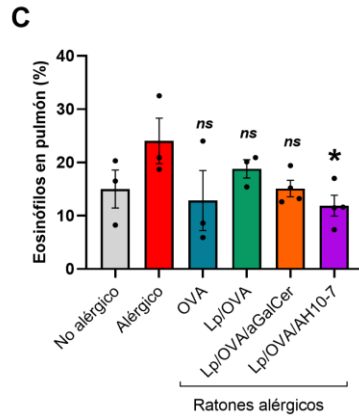
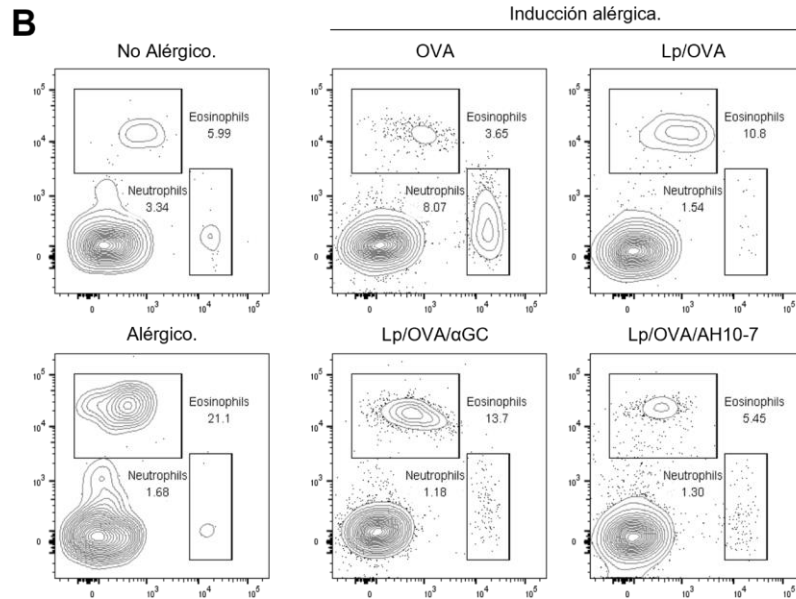
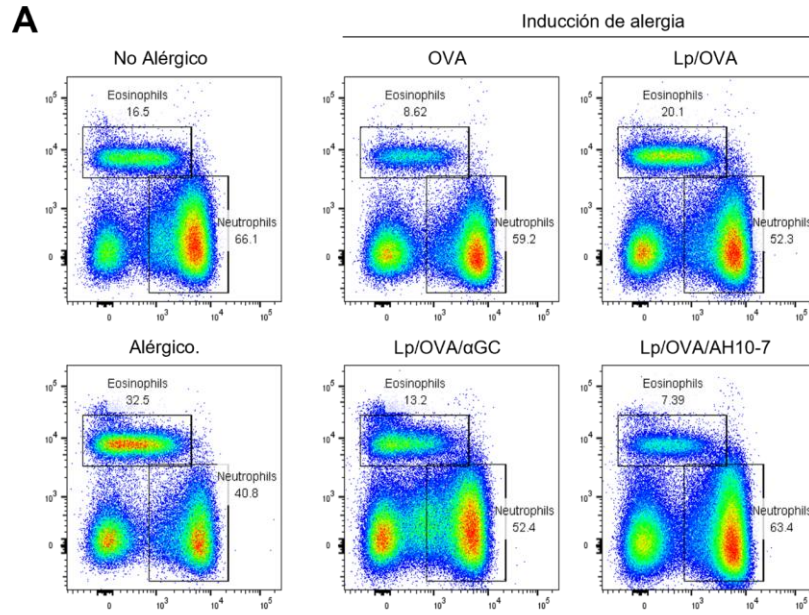


Figura 4. Cuantificación del reclutamiento de eosinófilos en tejido pulmonar y LBA en ratones BALB/c con alergia inducida por OVA y tratados con glicolípidos α -GalCer y AH10-7. (A) y (B) Gráficos de citometría de flujo representativos con la población de eosinófilos (CD45⁺, CD11c⁻, TCR⁻, B220⁻, CD11b⁺, MHCII⁻/bajo, Ly6G y SiglecF⁺ células) en tejido pulmonar y eosinófilos (CD45⁺, CD11c⁻, Ly6G⁻ y SiglecF⁺ células) en LBA. Gráficos (C) y (D) muestran el porcentaje promedio de los eosinófilos en pulmón y LBA, respectivamente. El gráfico ilustra el promedio \pm desviación estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas $<0,05$, ns = no significativo.

Niveles de IgE alérgeno específico.

En la respuesta alérgica se activa y estimula la producción de IgE en contra del alérgeno, por lo que, mediante ELISA, se midieron los niveles de IgE alérgeno específico en el suero de los grupos experimentales. En ratones alérgicos, se observó un aumento de los niveles de IgE alérgeno específico del doble ($4,7 \pm 0,9$) en comparación a ratones no alérgicos (2,4). En comparación al grupo experimental con alergia inducida, se observó un decrecimiento en todos los grupos experimentales, siendo estadísticamente significativo sólo en el grupo tratado con OVA ($2,9 \pm 0,53$). Mientras que, los grupos tratados con Lp/OVA ($3,5 \pm 0,3$), Lp/OVA/ α -GalCer ($3,5 \pm 0,3$) y Lp/OVA/AH10-7 ($3,6 \pm 0,41$), presentaron niveles similares entre sí. (Fig. 5b). Estos resultados fueron obtenidos en conjunto con el candidato a Doctor, Richard García como parte de su tesis de doctorado.

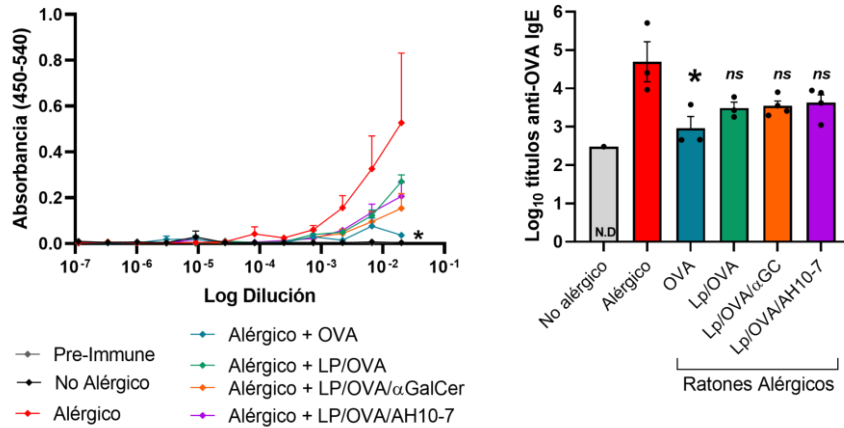


Figura 5. Niveles de IgE alérgeno específico en ratones BALB/c con alergia inducida por OVA y tratados con glicolípidos α -GalCer y AH10-7. (A) Gráficos de absorbancia vs el logaritmo del recíproco de la dilución de suero. (B) Se muestra el logaritmo del título IgE anti-OVA, se definió como punto de corte para determinar el título, doble del promedio de absorbancia del grupo pre-inmune. El gráfico ilustra el promedio \pm desviación estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas, ns = no significativo. Si la absorbancia es menor que el punto de corte, se considera el título como no determinable (N.D).

Obtención del modelo de asma alérgico.

Para la obtención del modelo de asma alérgico en un escenario terapéutico, los ratones BALB/c fueron inmunizados mediante una inyección intraperitoneal (i.p) con 100 μ g OVA en 1 mg de InjectTMAlum seguido por desafíos intranasales (i.n) con 10 μ g de OVA disuelta en PBS en los días 14, 16 y 18 post-inmunización. Como control, a un grupo experimental de ratones se les administró intraperitoneal e intranasalmente PBS, siendo este el grupo sin inducción de alergia. Los glicolípidos α -GalCer y su análogo AH10-7 contenidos en liposomas, fueron administraron vía intravenosa 3 semanas después del último desafío intranasal. Para asegurar que el efecto antialérgico observado fuese por la incorporación de los glicolípidos se agregaron dos grupos control, en donde a uno se le administró OVA contenida en liposoma en vez del glicolípidos,

mientras que el otro se le administró OVA soluble en vez del glicolípido. Finalmente, los efectos inflamatorios del asma fueron evaluados 24 horas después del último desafío intranasal (Fig. 6).

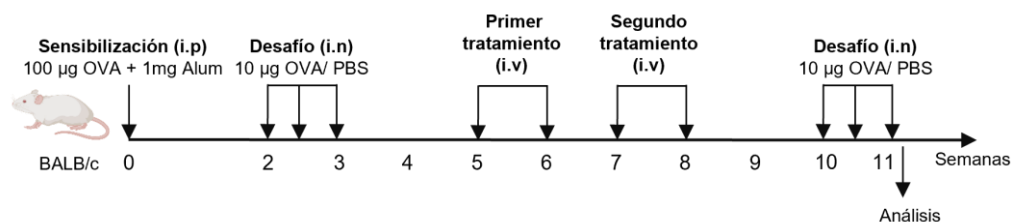


Figura 6. Obtención del modelo de asma alérgico. Escenario terapéutico. Los ratones BALB/c (n= 5) fueron sensibilizados con 100 µg de OVA en 1 mg de Alum. Tras dos semanas se realizaron los desafíos intranasales con tres dosis de 10 µg de OVA en PBS. Las preparaciones liposomales y controles fueron administrados dos semanas después del último desafío intranasal, siguiendo un esquema de dos regímenes de inmunizaciones. En la décima semana, los ratones fueron nuevamente desafiados con tres dosis i.n de 10 µg de OVA en PBS.

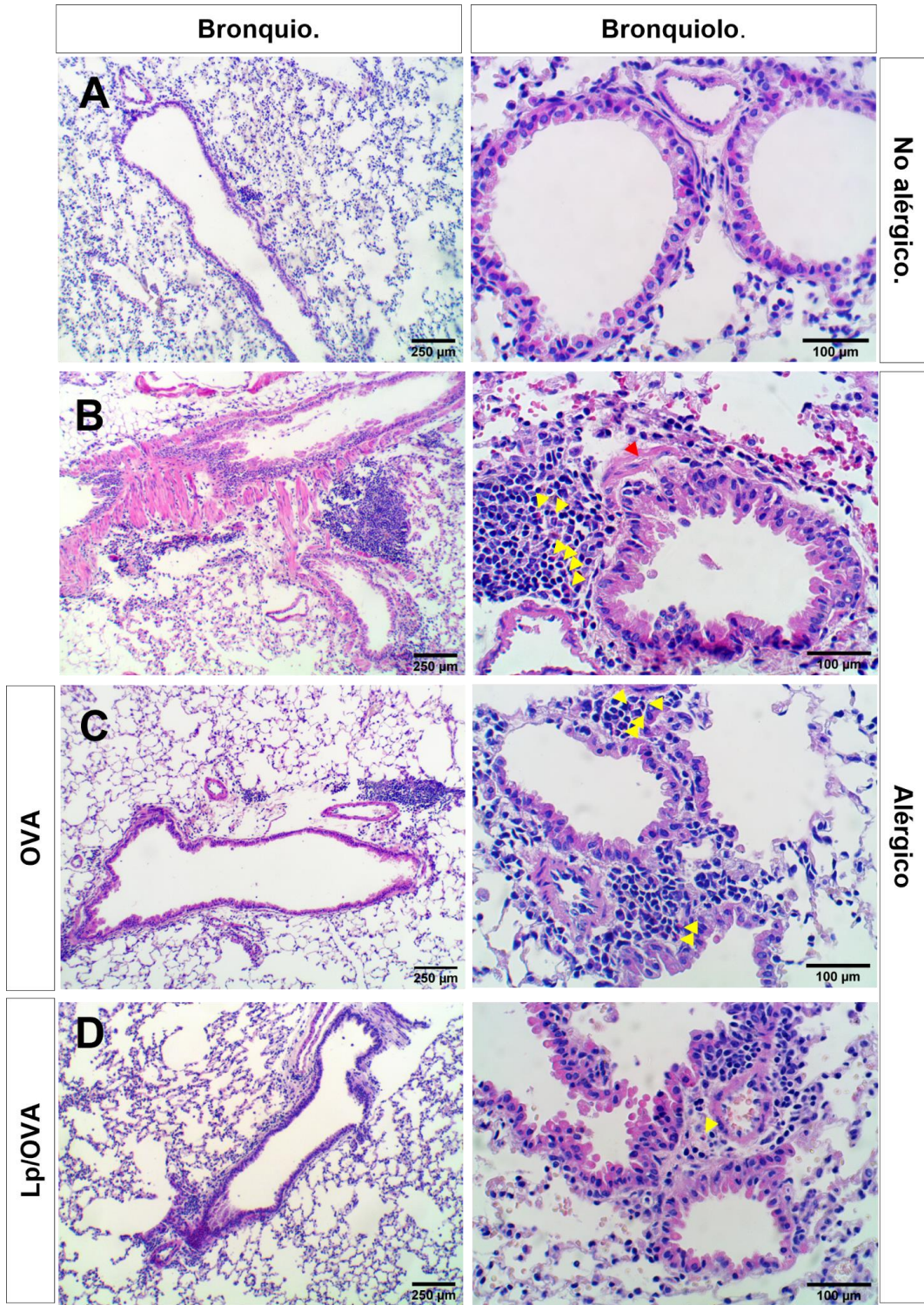
Semicuantificación de focos de infiltrado inflamatorio.

En ratones sin inducción de alergia (Fig. 7a) es posible observar el bronquio y bronquiolo con su epitelio respiratorio conservado, rodeado por estructuras alveolares, sin presencia de focos de infiltrado inflamatorio extensos. Mientras que, en ratones con alergia inducida (Fig. 7b) presentan un aumento significativo de la inflamación ($4,15 \pm 0,17$), observándose focos extensos de infiltrado inflamatorio mononuclear rodeando tanto al bronquio como el bronquiolo. A mayor aumento, es posible identificar que este infiltrado inflamatorio es crónico y mixto, presentando predominantemente células linfocitarias y en menor cantidad, eosinófilos (flechas amarillas). El epitelio respiratorio de los bronquiolos presenta hiperplasia e hipertrofia de sus células, además, la capa muscular lisa que rodea al bronquiolo se encuentra engrosada (flechas rojas).

Similarmente, en ratones que fueron desafiados intranasalmente con su alérgeno OVA, ya sea de forma soluble (Fig. 7c) o encapsulado en liposomas (Fig. 7d) es posible observar efectos similares a los observados en el grupo de alergia inducida, sin embargo, los focos de infiltrado inflamatorio crónico mixto se encuentran predominantemente en regiones perivasculares a diferencia de peribronquiales. Este infiltrado tiene la misma composición observada en el caso anterior. El epitelio respiratorio de los bronquiolos presenta de igual manera hiperplasia e hipertrofia de sus células.

Por otra parte, en ratones con alergia inducida y que fueron tratados con α -GalCer contenido en liposomas (Fig. 7e), se puede observar una disminución significativa de los focos de infiltrado inflamatorio crónico mixto y la extensión de estos, ubicándose predominantemente en regiones peribronquiales y perivasculares y en menor medida, en regiones peribronquiolares ($1,94 \pm 1,01$). Aun así, el epitelio respiratorio sigue mostrando cambios por remodelación, como la hipertrofia e hiperplasia de sus células.

Por último, en ratones con alergia inducida y que fueron tratados con el análogo AH10-7 contenido en liposoma (Fig. 7f), se observan extensos focos de infiltrado inflamatorio crónico mixto que rodean al bronquio y su vaso sanguíneo y que se encuentran rodeando al bronquiolo en su totalidad. Respecto a los cambios epiteliales, es posible observar el alargamiento del citoplasma de las células del epitelio respiratorio, hiperplasia de las células y también una hiperplasia de las células caliciformes (flechas negras). Por último, se observa un engrosamiento aparente de la capa muscular lisa (flechas rojas).



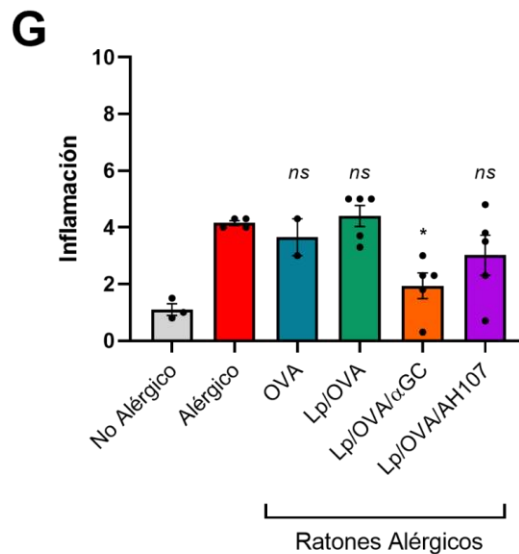
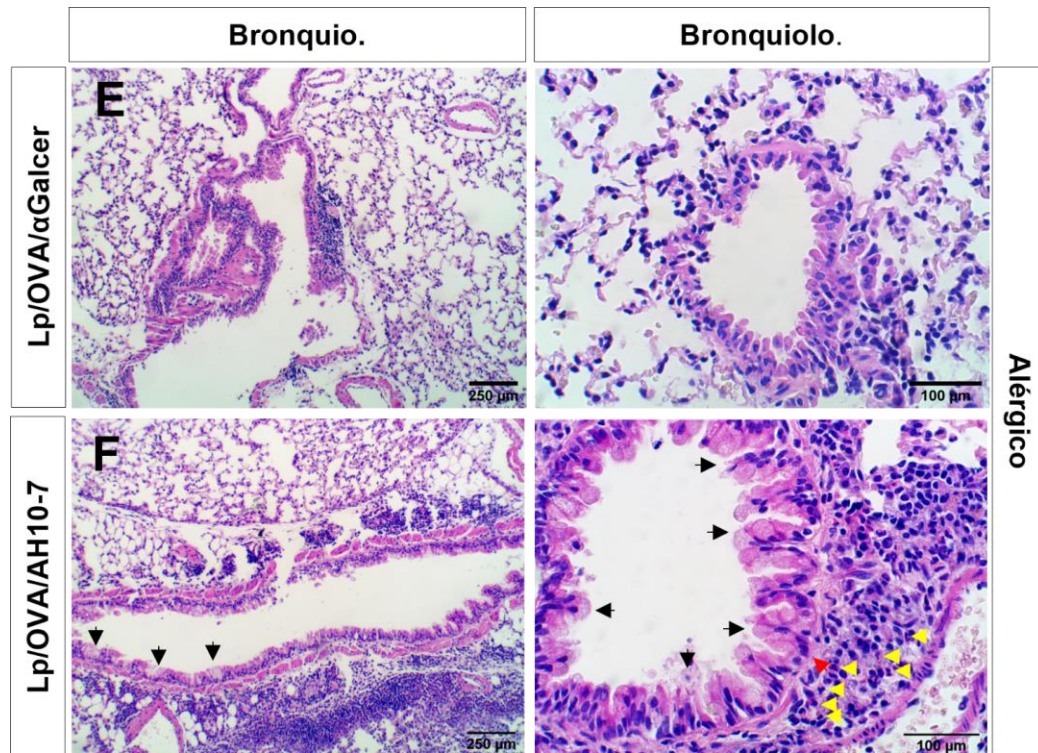


Figura 7. Tinción hematoxilina-eosina en bronquios y bronquiolos de ratones BALB/c con alergia inducida por OVA y tratados con glicolípidos α -GalCer y AH10-7. Imágenes representativas de: (A) Grupo sin inducción de alergia. (B) Grupo alérgico. (C) Grupo OVA. (D) Grupo Lp/OVA. (E) Grupo Lp/OVA/ α -GalCer. (F) Grupo Lp/OVA/ α -GalCer. Flechas amarillas indican eosinófilos, flechas rojas indican engrosamiento de

capa muscular lisa, flechas negras indican células caliciformes. Columna izquierda : barra de escala = 250 μm , magnificación 100X. Columna derecha: barra de escala = 100 μm , magnificación 400X. (G) Semicuantificación de los focos de infiltrado inflamatorio peribronquiales y perivasculares en las vías aéreas. El gráfico ilustra el promedio \pm desviación estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas, ns = no significativo.

Cuantificación de la producción de mucus.

Similar al escenario preventivo, ratones sin inducción de alergia no presentaron tinción PAS-positiva. Mientras que, ratones con alergia inducida presentaron un aumento significativo tanto en el porcentaje de células PAS-positivas ($2,6 \pm 0,58$) como en el número de células PAS-positivas por mm de membrana basal ($59,71 \pm 12,1$).

De igual manera, los ratones alérgicos desafiados intranasalmente con su alérgeno OVA libre o en liposomas, presentaron niveles similares al grupo experimental con alergia inducida de células PAS-positivas y número de células PAS-positivas por mm de membrana basal, sin embargo, a diferencia de ese grupo, los grupos OVA y Lp/OVA presentaron tapones mucosos en el lumen bronquiolar.

A diferencia del escenario preventivo, en ratones con alergia inducida tratados con α -GalCer (Fig. 8e) se observó una disminución significativa del porcentaje de células PAS-positivas (1 ± 0), como en el número de células PAS-positivas por mm de membrana basal ($9,5 \pm 10$). Sin observarse presencia de mucus en el lumen bronquiolar. En cambio, el tratamiento con AH10-7 (Fig. 8f), no logró disminuir significativamente el porcentaje células PAS-positivas, ni el número de células PAS-positivas por mm de membrana basal. Observándose inclusive presencia de mucus en el lumen bronquiolar.

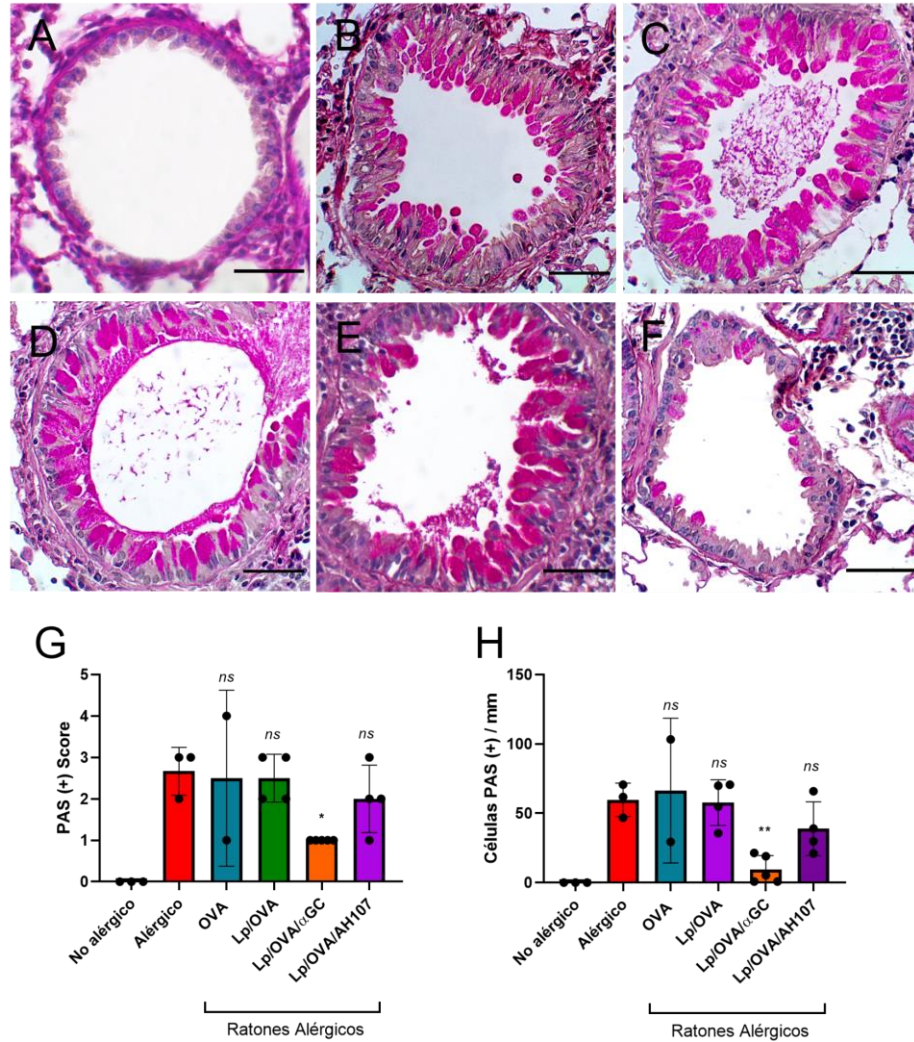


Figura 8. Tinción de PAS en bronquiolos de ratones BALB/c con alergia inducida por OVA y tratados con glicolípidos α -GalCer y AH10-7. Imágenes representativas de: (A) Grupo sin inducción de alergia. (B) Grupo alérgico. (C) Grupo OVA. (D) Grupo Lp/OVA. (E) Grupo Lp/OVA/ α -GalCer. (F) Grupo Lp/OVA/ α -GalCer. La tinción fucsia-rojiza indica presencia de células caliciformes o mucus. Barra de escala = 100 μ m. Magnificación 400X. (G) Porcentaje de células PAS (+) en el bronquiolo. (H) Número de células PAS (+) normalizado por la longitud del bronquiolo en mm. El gráfico ilustra el promedio \pm desviación estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas $<0,05$, (**) $<0,05$, ns = no significativo.

Reclutamiento de eosinófilos en pulmón y LBA.

Al igual que en el escenario anterior, el grupo experimental de ratones con alergia inducida presentó un valor aumentado de los niveles de eosinófilos que infiltran el tejido pulmonar ($15,4 \pm 10,8$) y que se encuentran en LBA ($45,2 \pm 29,19$) en comparación a los ratones sin inducción de alergia ($9,2 \pm 2,7$ y $13,41 \pm 6,5$, respectivamente).

En comparación al grupo experimental de ratones con alergia inducida, en el tejido pulmonar se observa un aumento no estadísticamente significativo en la cantidad de eosinófilos con todos los tratamientos, siendo mayor en los grupos tratados con Lp/OVA ($30,46 \pm 15,2$) y Lp/OVA/AH10-7 ($31,4 \pm 25,3$) (Fig. 9c). En cambio, en LBA, si bien se observa un aumento no significativo del grupo experimental tratado con Lp/OVA/AH10-7 ($51,8 \pm 38$) y grupo experimental tratado con Lp/OVA ($49 \pm 20,2$), también es posible observar un decrecimiento no significativo del reclutamiento eosinofílico en el grupo tratado con Lp/OVA/ α -GalCer ($31,9 \pm 17$) y OVA soluble ($28,4 \pm 20,9$) en comparación al grupo con alergia inducida ($45,2 \pm 29,2$) (Fig. 9d). Estos resultados fueron obtenidos en conjunto con el candidato a Doctor, Richard García como parte de su tesis de doctorado.

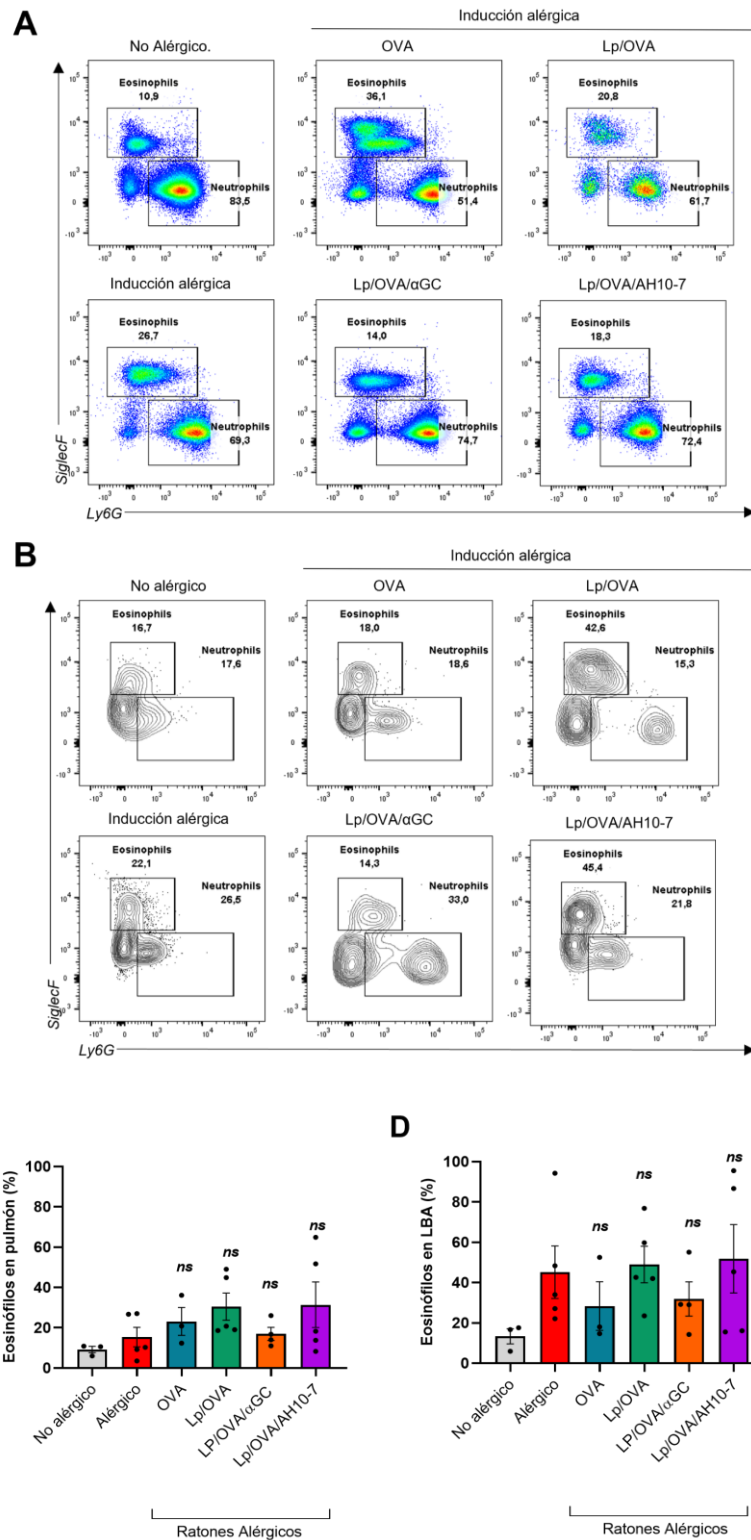


Figura 9. Cuantificación del reclutamiento de eosinófilos en tejido pulmonar y LBA en ratones BALB/c con alergia inducida por OVA y tratados con glicolípidos α -GalCer y AH10-7. (A) y (B) Gráficos de

citometría de flujo representativos con la población de eosinófilos (CD45+ , CD11c- , TCR- , B220- , CD11b+ , MHCII-/bajo, Ly6G y SiglecF+ células) en tejido pulmonar y eosinófilos (CD45+ , CD11c- , Ly6G- y SiglecF+ células) en LBA. Gráficos (C) y (D) muestran el porcentaje promedio de los eosinófilos en pulmón y LBA, respectivamente. El gráfico ilustra el promedio \pm desviación estándar. ns = no significativo.

Niveles de IgE alérgeno específico.

Al igual que en el escenario anterior, el grupo experimental con alergia inducida presentó mayores niveles de IgE alérgeno específico ($4,3 \pm 0,2$) en comparación al grupo sin inducción de alergia ($3,3 \pm 0,3$). Además, en comparación al grupo experimental con alergia inducida, se observaron valores similares en todos los grupos experimentales, OVA ($4,3 \pm 0,4$), Lp/OVA ($4,1 \pm 0,4$), Lp/OVA/ α -GalCer ($4,1 \pm 0,3$) y Lp/OVA/AH10-7 ($4,3 \pm 0,3$) (Fig. 10b). Estos resultados fueron obtenidos en conjunto con el candidato a Doctor, Richard García como parte de su tesis de doctorado.

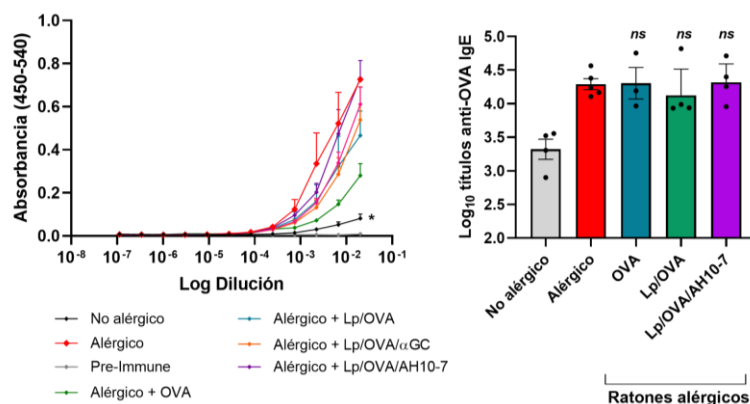


Figura 10. Niveles de IgE alérgeno específico en ratones BALB/c con alergia inducida por OVA y tratados con glicolípidos α -GalCer y AH10-7. (A) Gráficos de absorbancia vs el logaritmo del recíproco de la dilución de suero. (B) Se muestra el logaritmo del título IgE anti-OVA. Se definió como punto de corte para determinar el título, doble del promedio de absorbancia del grupo pre-inmune. El gráfico ilustra el promedio \pm desviación estándar. ns = no significativo.

Discusión.

El asma es una enfermedad crónica inflamatoria que afecta a las vías respiratorias y se caracteriza por un aumento de los niveles de IgE alérgeno específico, reclutamiento de eosinófilos (1, 3) y un constante proceso inflamatorio que se observa como focos de infiltrado inflamatorio crónico perivasculares y peribronquiales. Este último induce el tejido linfocitario asociado a bronquio (BALT), el cual promueve cambios estructurales patológicos en el pulmón como el engrosamiento de la capa muscular lisa, hipertrofia e hiperplasia del epitelio respiratorio, hiperplasia de las células caliciformes y fibrosis subepitelial (41). Debido a esto, es de alto interés la inducción de tolerancia para proteger contra la respuesta inflamatoria alérgica observada en el asma.

Las células iNKT son un blanco para la posible generación de inmunoterapias al ser capaces de producir y liberar rápidamente citoquinas pro y antiinflamatorias tras ser activadas por antígenos glicolipídicos presentados por CD1d (4,7). Esta liberación de citoquinas es capaz de inducir la activación de células de la inmunidad innata y adaptativa y puede ser restringida a una respuesta de citoquinas de tipo T_H1 al ser activada por análogos del glicolípido α -GalCer, como AH10-7, que estimula y expande el subtipo NKT10 regulador, capaz de producir IL-10 que presenta funciones inmunosupresoras de la inflamación (30).

En este trabajo se evaluó si la activación de células iNKT por este análogo es capaz de disminuir los efectos característicos del asma en un escenario preventivo, es decir, entregando el tratamiento vía intravenosa a ratones previa inducción de alergia y en un escenario terapéutico, en donde se entrega el tratamiento vía endovenosa después de la inducción de alergia. Si bien en un inicio, se planteó evaluar la conservación de los espacios alveolares, esto finalmente se dejó fuera de la investigación debido al método de fijación usado, el cual no mantiene la arquitectura real del pulmón, provocando zonas con estructuras alveolares colapsadas.

También, se realizó una caracterización de los focos de infiltrado inflamatorio, encontrando que estos estaban compuestos predominantemente por células mononucleares linfocitarias y en menor cantidad, por eosinófilos. Además, en algunos casos fue posible observar macrófagos con presencia de hemosiderina en su interior, indicadores de la presencia de procesos hemorrágicos crónicos. Estas observaciones son congruentes con lo descrito en Guest & Sell (2015) y sería interesante, a futuro, cuantificar los elementos mencionados mediante inmunohistoquímica. Además, se observó que los desafíos intranasales con el alérgeno, tras la inducción de la alergia, aumentan el número de células caliciformes predominantemente en los bronquiolos y no en los bronquios, a diferencia de lo planteado en Kim *et al* (2019).

Respecto al escenario preventivo, se encontró que ratones con alergia inducida por OVA tratados con Lp/OVA/AH10-7 presentaban una disminución estadísticamente significativa de los focos de infiltrado inflamatorio perivasculares y peribronquiales, estos resultados van acompañados de una disminución de los cambios histopatológicos característicos del asma, como la remodelación epitelial y producción de mucus. Además, se pudo observar una disminución significativa del reclutamiento de eosinófilos en el tejido pulmonar y no significativa en LBA, así como también, una disminución no significativa de los niveles de IgE alérgeno específico en el suero de estos ratones. Estos resultados indican que, el análogo de α -GalCer, AH10-7 presenta una actividad protectora contra la inflamación y que el tratamiento con Lp/OVA/AH10-7 disminuye la inflamación que precede a los cambios histopatológicos del asma en ratones BALB/c con alergia inducida por OVA en un escenario preventivo. Estos resultados pueden deberse a la capacidad de AH10-7 de inducir un perfil restringido de citoquinas Th1, expandiendo las células NKT10 y su secreción de IL-10 que presenta fuertes efectos inmunosupresores. Además, según lo planteado en Chen *et al* (2019), tratamiento con α -GalCer previo a sensibilización con OVA inhibe la respuesta celular Th2 y promueve la expansión y actividad supresora de células T reguladoras mediante la activación de las células iNKT, por lo tanto, sería interesante evaluar si el tratamiento con AH10-7 presenta estas mismas características en un trabajo a futuro. Dentro del escenario preventivo, se observó también una

disminución de los niveles de IgE en ratones tratados con OVA soluble, como también una disminución en la producción de mucus, esta disminución puede ser explicada, porque, la inoculación de un antígeno es capaz de producir una respuesta tolerogénica (42).

Con relación al escenario terapéutico, a diferencia del escenario anterior, AH10-7 no logró disminuir los focos de infiltrado inflamatorio, ni los cambios histopatológicos provocados por el asma. Aumentando, incluso, el reclutamiento de eosinófilos en el tejido pulmonar, así como los niveles de IgE alérgeno específico en el suero. En cambio, en este escenario, ratones tratados con α -GalCer sí mostraron una disminución significativa de los focos inflamatorios peribronquiales y perivasculares, así como también, una disminución significativa en su capacidad de producir mucus en comparación a ratones alérgicos. Sin embargo, no se lograron encontrar diferencias significativas en el reclutamiento de eosinófilos, ni en los niveles de IgE alérgeno específico en el suero. Estos resultados se pueden deber a que existe evidencia que la administración de α -GalCer puede inhibir la generación de la remodelación epitelial por el asma, así como también el reclutamiento de eosinófilos y disminuir los niveles de IgE OVA-específico en un modelo experimental de asma alérgico induciendo la acumulación de células iNKT en los pulmones y cambiando su perfil de citoquinas de IL-4 a IFN- γ (43). Teniendo lo anterior en consideración, en este trabajo se comprueba que la activación de células iNKT de subtipo regulador mediante AH10-7 disminuye los efectos de la respuesta alérgica en modelo murino de asma alérgico inducido por OVA en un escenario preventivo, a diferencia del escenario terapéutico, en donde se refuta.

Conclusiones.

- El análogo de α -GalCer AH10-7 disminuye la inflamación peribronquial y perivascular como también la producción de mucus en un escenario preventivo, no así en un escenario terapéutico.
- El análogo de α -GalCer AH10-7 disminuye el reclutamiento de eosinófilos en tejido pulmonar en un escenario preventivo y lo aumenta en un escenario terapéutico.
- El análogo de α -GalCer AH10-7 aumenta los niveles de IgE específico por OVA presentes en el suero en un escenario terapéutico.
- α -GalCer disminuye los focos de infiltrado inflamatorio peribronquiales y perivasculares y la producción de mucus en un escenario terapéutico.

Bibliografía.

1. Galli S, Tsai M, Piliponsky A. (2008). The development of allergic inflammation. *Nature*. 454(7203): 445-454.
2. Peebles R, Aronica M. (2019). Proinflammatory Pathways in the Pathogenesis of Asthma. *Clinics in Chest Medicine*. 40(1):29-50.
3. Kim, D.I., Song, MK., Lee, K. (2019). Comparison of asthma phenotypes in OVA-induced mice challenged via inhaled and intranasal routes. *BMC Pulm Med* 19, 241.
4. Gálvez, N. M. S., Bohmwald, K., Pacheco, G. A., Andrade, C. A., Carreño, L. J., Kalergis, A. M. (2021). Type I natural killer T cells as key regulators of the immune response to infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 34.
5. Cui, S., Wang, C., Bai, W., Li, J., Pan, Y., Huang, X., Yang, H., Feng, Z., Xiang, Q., Fei, L., Zheng, L., Huang, J., Zhang, Q., Wu, Y., & Chen, Y. (2020). CD1d1 intrinsic signaling in macrophages controls NLRP3 inflammasome expression during inflammation. *Science advances*, 6(43).
6. Chaudhry, M. S., Karadimitris, A. (2014). Role and regulation of CD1d in normal and pathological B cells. *Journal of immunology* 193(10), 4761–4768.
7. Arora, P., Baena, A., Yu, K. O., Saini, N. K., Kharkwal, S. S., Goldberg, M. F., Kunnath-Velayudhan, S., Carreño, L. J., Venkataswamy, M. M., Kim, J., Lazar-Molnar, E., Lauvau, G., Chang, Y. T., Liu, Z., Bittman, R., Al-Shamkhani, A., Cox, L. R., Jervis, P. J., Veerapen, N., Besra, G. S., ... Porcelli, S. A. (2014). A single subset of dendritic cells controls the cytokine bias of natural killer T cell responses to diverse glycolipid antigens. *Immunity*, 40(1), 105–116.
8. Coquet, J. M., Chakravarti, S., Kyparissoudis, K., McNab, F. W., Pitt, L. A., McKenzie, B. S., Berzins, S. P., Smyth, M. J., & Godfrey, D. I. (2008). Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(32), 11287–11292.
9. Noto Llana, M., Sarnacki, S. H., Morales, A. L., Aya Castañeda, M., Giacomodonato, M. N., Blanco, G., & Cerquetti, M. C. (2017). Activation of iNKT Cells Prevents Salmonella-Enterocolitis and Salmonella-Induced Reactive Arthritis by Downregulating IL-17-Producing $\gamma\delta$ T Cells. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 398.
10. Aget, C., Ivanov, S., Fontaine, J., Renneson, J., Blanc, F., Pichavant, M., Dumoutier, L., Ryffel, B., Renaud, J. C., Gosset, P., Gosset, P., Si-Tahar, M., Faveeuw, C., & Trottein, F. (2012). Interleukin-22 is produced by invariant natural killer T lymphocytes during influenza A virus infection: potential

- role in protection against lung epithelial damages. *The Journal of biological chemistry*, 287(12), 8816–8829.
11. Juno, J.A., Y. Keynan, K.R. Fowke, (2012). Invariant NKT cells: regulation and function during viral infection. *PLoS Pathog*, 8(8): p. e1002838.
 12. Uchida, T., Nakashima, H., Yamagata, A., Ito, S., Ishikiriyama, T., Nakashima, M., Seki, S., Kumagai, H., & Oshima, N. (2018). Repeated administration of alpha-galactosylceramide ameliorates experimental lupus nephritis in mice. *Scientific reports*, 8(1), 8225.
 13. Nair, S., Dhodapkar, M. V. (2017). Natural Killer T Cells in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in immunology*, 8, 1178.
 14. Hongo, D., Tang, X., Zhang, X., Engleman, E. G., Strober, S. (2017). Tolerogenic interactions between CD8+ dendritic cells and NKT cells prevent rejection of bone marrow and organ grafts. *Blood*, 129(12), 1718–1728.
 15. Getz, G. S., Reardon, C. A. (2017). Natural killer T cells in atherosclerosis. *Nature reviews. Cardiology*, 14(5), 304–314.
 16. Guan, J., Wang, G., Yang, Q., Chen, C., Deng, J., Gu, X., Zhu, H. (2021). Natural Killer T Cells in Various Mouse Models of Hepatitis. *BioMed research international*, 2021, 1782765.
 17. Meyer, E. H., DeKruyff, R. H., Umetsu, D. T. (2007). iNKT cells in allergic disease. *Current topics in microbiology and immunology*, 314, 269–291.
 18. Iwamura C, Nakayama T. (2010) Role of NKT cells in allergic asthma. *Current Opinion in Immunology*. 22(6):807-813.
 19. Tsao, C. C., Tsao, P. N., Chen, Y. G., Chuang, Y. H. (2016). Repeated Activation of Lung Invariant NKT Cells Results in Chronic Obstructive Pulmonary Disease-Like Symptoms. *PloS one*, 11(1), e0147710.
 20. Carreño, L. J., Kharkwal, S. S., Porcelli, S. A. (2014). Optimizing NKT cell ligands as vaccine adjuvants. *Immunotherapy*, 6(3), 309–320.
 21. Chennamadhavuni, D., Saavedra-Avila, N. A., Carreño, L. J., Guberman-Pfeffer, M. J., Arora, P., Yongqing, T., Pryce, R., Koay, H. F., Godfrey, D. I., Keshipeddy, S., Richardson, S. K., Sundararaj, S., Lo, J. H., Wen, X., Gascón, J. A., Yuan, W., Rossjohn, J., Le Nours, J., Porcelli, S. A., & Howell, A. R. (2018). Dual Modifications of α -Galactosylceramide Synergize to Promote Activation of Human Invariant Natural Killer T Cells and Stimulate Anti-tumor Immunity. *Cell chemical biology*, 25(5), 571–584.e8.

22. Krijgsman, D., Hokland, M., Kuppen, P. (2018). The Role of Natural Killer T Cells in Cancer-A Phenotypical and Functional Approach. *Frontiers in immunology*, 9, 367.
23. Kopecky-Bromberg, S. A., Fraser, K. A., Pica, N., Carnero, E., Moran, T. M., Franck, R. W., Tsuji, M., Palese, P. (2009). Alpha-Galactosylceramide as an adjuvant for a live attenuated influenza virus vaccine. *Vaccine*, 27(28), 3766–3774.
24. Washah H, Agoni C, Olotu F, Munsamy G, Soliman M. (2019). Tweaking α -galactoceramides: Probing the dynamical mechanisms of improved recognition for invariant natural killer T-cell receptor in cancer immunotherapeutics. *Curr Pharm Biotechnol*.
25. Miyamoto K, Miyake S, Yamamura T. (2001). A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature*. 413(6855):531–4.
26. Zhu, T., Wang, R., Miller, H., Westerberg, L. S., Yang, L., Guan, F., Lee, P., Gong, Q., Chen, Y., & Liu, C. (2022). The interaction between iNKT cells and B cells. *Journal of leukocyte biology*, 111(3), 711–723.
27. Chen, Q., Guo, X., Deng, N., Liu, L., Chen, S., Wang, A., Li, R., Huang, Y., Ding, X., Yu, H., Hu, S., & Nie, H. (2019). α -Galactosylceramide treatment before allergen sensitization promotes iNKT cell-mediated induction of Treg cells, preventing Th2 cell responses in murine asthma. *The Journal of biological chemistry*, 294(14), 5438–5455.
28. Nowak, M., Stein-Streilein, J. (2007). Invariant NKT cells and tolerance. *International reviews of immunology*, 26(1-2), 95–119.
29. Lynch, L., Michelet, X., Zhang, S., Brennan, P. J., Moseman, A., Lester, C., Besra, G., Vomhof-Dekrey, E. E., Tighe, M., Koay, H. F., Godfrey, D. I., Leadbetter, E. A., Sant'Angelo, D. B., von Andrian, U., Brenner, M. B. (2015). Regulatory iNKT cells lack expression of the transcription factor PLZF and control the homeostasis of T(reg) cells and macrophages in adipose tissue. *Nature immunology*, 16(1), 85–95.
30. Zhao, L., Yang, X. (2022). Cross Talk Between Natural Killer T and Dendritic Cells and Its Impact on T Cell Responses in Infections. *Frontiers in immunology*, 13, 837767.
31. Silva, P., Bier, J., Paiatto, L. N., Galdino Albuquerque, C., Lopes Souza, C., Fernandes, L. G., Tamashiro, W. M., Simioni, P. U. (2015). Tolerogenic Dendritic Cells on Transplantation: Immunotherapy Based on Second Signal Blockage. *Journal of immunology research*, 856707.
32. La Cava, A., Van Kaer, L., Fu-Dong-Shi (2006). CD4⁺CD25⁺ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators. *Trends in immunology*, 27(7), 322–327.

33. Vomhof-DeKrey, E. E., Yates, J., Hägglöf, T., Lanthier, P., Amiel, E., Veerapen, N., Besra, G. S., Karlsson, M. C., Leadbetter, E. A. (2015). Cognate interaction with iNKT cells expands IL-10-producing B regulatory cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(40), 12474–12479.
34. Lin A, Freeman A, Nutman T. (2018) IL-10 Indirectly Downregulates IL-4–Induced IgE Production by Human B Cells. *ImmunoHorizons*. 2(11):398-406.
35. Satitsuksanoa P, van de Veen W, Akdis M. (2019). B-cell responses in allergen immunotherapy. *Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology*. 19(6):632-
36. Melgar-Rodríguez, S., Cafferata, E. A., Díaz, N. I., Peña, M. A., González-Osuna, L., Rojas, C., Sierra-Cristancho, A., Cárdenas, A. M., Díaz-Zúñiga, J., & Vernal, R. (2021). Natural Killer T (NKT) Cells and Periodontitis: Potential Regulatory Role of NKT10 Cells. *Mediators of inflammation*, 2021, 5573937.
37. Crosby, C.M., M. Kronenberg. (2018). Tissue-specific functions of invariant natural killer T cells. *Nat Rev Immunol* 18(9): p. 559-574.
38. Sag D, Krause P, Hedrick C, Kronenberg M, Wingender G. (2014) IL-10–producing NKT10 cells are a distinct regulatory invariant NKT cell subset. *Journal of Clinical Investigation*. 124(9):3725-3740.
39. Singh, A. K., Wilson, M. T., Hong, S., Olivares-Villagómez, D., Du, C., Stanic, A. K., Joyce, S., Sriram, S., Koezuka, Y., & Van Kaer, L. (2001). Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of experimental medicine*, 194(12), 1801–1811.
40. Rivas, M. N., Koh, Y. T., Chen, A., Nguyen, A., Lee, Y. H., Lawson, G., Chatila, T. A. (2012). MyD88 is critically involved in immune tolerance breakdown at environmental interfaces of Foxp3-deficient mice. *The Journal of clinical investigation*, 122(5), 1933–1947.
41. Guest, I., Sell, S. (2015). Bronchial lesions of mouse model of asthma are preceded by immune complex vasculitis and induced bronchial associated lymphoid tissue (iBALT). *Lab Invest* 95, 886–902.
42. Wisniewski J, Agrawal R, Woodfolk JA. (2013). Mechanisms of tolerance induction in allergic disease: integrating current and emerging concepts. *Clin Exp Allergy*. Feb;43(2):164-76.
43. Hachem, P., Lisbonne, M., Michel, M. L., Diem, S., Roongapinun, S., Lefort, J., Marchal, G., Herbelin, A., Askenase, P. W., Dy, M., Leite-de-Moraes, M. C. (2005). Alpha-galactosylceramide-induced iNKT cells suppress experimental allergic asthma in sensitized mice: role of IFN-gamma. *European journal of immunology*, 35(10), 2793–2802.

44. Chen, Q., Guo, X., Deng, N., Liu, L., Chen, S., Wang, A., Li, R., Huang, Y., Ding, X., Yu, H., Hu, S., & Nie, H. (2019). α -Galactosylceramide treatment before allergen sensitization promotes iNKT cell-mediated induction of Treg cells, preventing Th2 cell responses in murine asthma. *The Journal of biological chemistry*, 294(14), 5438–5455.

Anexos.

Anexo 1. Certificado de aprobación protocolo bioética.

Santiago, 02 de mayo de 2022
Certificado N°: 22557 – MED – UCH

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el Protocolo **CBA 1210 FMUCH** del Proyecto de Investigación titulado **“Inhibición de la respuesta alérgica mediante la modulación de células B mediada por células iNKT”**, de la investigadora **Srta. Fernanda Antilén**, tesista de pregrado de la Escuela de Tecnología Médica y del académico patrocinante **Dr. Leandro Carreño**, Profesor Asociado, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas bioéticas 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 **70 ratones**, especie *Mus musculus*, cepa BALB/c wild type, provenientes del **Bioterio Central, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile**, desde el **2 de mayo del 2022 hasta el 31 de julio del 2022**, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por el proyecto **FONDEF N° ID21|10335**.

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.


Claudia Delgado Acevedo
Directora Ejecutiva
CICUA – VID
Universidad de Chile




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

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile
<http://www.uchile.cl/portal/investigacion/152120/comite-institucional-de-cuidado-y-uso-de-animales-cicua>
email: coordinador.cicua@uchile.cl