



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Unidad Zacatenco

Departamento de Biología Celular

**Dinámica de la generación de células plasmáticas ante la  
infección cutánea con virus del dengue en ratones  
inmunocompetentes**

**Tesis**

Que presenta

**M. en C. RAÚL ANTONIO MAQUEDA ALFARO**

Para obtener el Grado de  
**Doctor en Ciencias**

En la Especialidad de

**Biología Celular**

Directores de Tesis:

**Dr. José Leopoldo Flores Romo**

**Dr. Saúl Villa Treviño**

**Dra. Leticia Cedillo Barrón**

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología (Lab. 15) del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la tutoría del Dr. Leopoldo Flores Romo, el Dr. Saúl Villa Treviño y la Dra. Leticia Cedillo Barrón. Para el desarrollo de este proyecto el sustentante contó con una beca de Doctorado (CVU: 553390) que otorga el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) bajo la convocatoria de Becas Nacionales a estudiantes inscritos en Programas de Posgrado de Calidad (PNPC).

*DEDICATORIA*

*En memoria de mi entrañable maestro, guía y amigo, Dr. Leopoldo Flores Romo, quien inspiró a varias generaciones de científicos a través de su pasión por la ciencia y la inmunología.*

“Life is a Sisyphean race, run ever faster toward a finish line that is merely the start of the next race.”

Matt Ridley, *The Red Queen: Sex and the Evolution of Human Nature*

## Agradecimientos

Al Dr. Leopoldo Flores Romo, por todas las enseñanzas, apoyo, confianza y generosidad. Por su forma tan particular de guiarnos en el camino científico, y su preocupación por nuestra formación académica y personal. Un abrazo enorme “hasta donde esté”...,

A la Dra. Leticia Cedillo Barrón, por su invaluable apoyo y confianza. Por la discusión generada y las observaciones al trabajo. Por su disposición y guía en la etapa más crítica del proyecto y aceptarme como un alumno más de su equipo de trabajo,

Al Dr. Saúl Villa Treviño, por su confianza y guía durante mi formación académica y todo su apoyo y disposición para completar el proyecto,

Al Dr. Manuel Hernández, Dr. Emiliano Navarro, Dr. Vianney Ortiz y la Dra. Luvia Sánchez, por sus excelentes contribuciones al proyecto con toda su experiencia y la discusión generada durante los seminarios. Por su disposición a revisar la tesis y enriquecerla con sus observaciones y consejos,

Al CINVESTAV y al Departamento de Biología Celular, por la formación académica y profesional de alta calidad, y a todo el personal administrativo por su excelente trabajo, a Clarita, Cuqui y Lucero,

A todos los integrantes del Lab. 15 de Biología Celular, departamentales y “visitantes”, con los que tuve la gran fortuna de coincidir y convivir. Por todas las discusiones (científicas y no), por compartir conmigo el café, comidas, experimentos, fiestas, viajes. Por dejarme conocerlos y se hayan vuelto parte de mi familia durante todos estos años. A Juanita, Mariana, Isis, Adrián, Felipe, Edith, Estela, Uziel, Rafa,

Al Dr. Luis Donis, por sus enseñanzas, por su amistad, por todo su apoyo y confianza, desde hace años hasta ahora,

A Juan Carlos y Noni, por su apoyo, confianza, guía, amistad y cariño durante todos estos años y por empujarme a seguir adelante cuando las cosas se han complicado. Por creer en mí y permitirme colaborar en el quehacer científico,

Al Dr. Julio García Cordero y a Víctor Rosales, por su apoyo para realizar y concluir los experimentos, A mis amigos, por confiar y creer en mí...

A mi pequeña familia, que siempre me han apoyado en mi senda profesional y porque siempre han creído en que puedo lograrlo. A mis mamás Teresita, Techita y Chabita, a mis hermanos Daniel, Montse y Betito, a mi Tía Chali y Manuel y a mis niños Emiliano y Sophia,

A mi segunda familia, Don Richard, Doña Rosita y Nahui, por su invaluable apoyo y confianza, por estar siempre pendientes de mí,

A Olin,

A CONACYT, por el apoyo otorgado.

GRACIAS.

# Contenido

Agradecimientos .....	iv
Índice de figuras .....	vii
Lista de abreviaturas .....	viii
Resumen .....	x
Abstract.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
Marco Teórico .....	1
Dengue.....	1
Virus del Dengue (DENV) .....	2
Respuesta de anticuerpos contra DENV.....	4
Incremento de la infección dependiente de Abs: ADE.....	5
Células plasmáticas y su origen.....	7
Antecedentes.....	13
Generación de CPs en infecciones con DENV.....	13
Infección en ratones inmunocompetentes.....	14
2. JUSTIFICACIÓN.....	16
3. HIPÓTESIS .....	16
4. OBJETIVOS.....	17
General.....	17
Específicos.....	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
Ratones e inmunizaciones.....	18
Preparación de los stock virales (DENV2 y ZIKV).....	18
Producción de las proteínas virales recombinantes.....	19
Microscopía de inmunofluorescencia <i>in situ</i> .....	19
Citometría de flujo y análisis del ciclo celular.....	20
Ensayos de ELISPOT .....	22
Ensayos de ELISA de afinidad y evaluación de reacción cruzada .....	23
Ensayo de neutralización viral por citometría de flujo .....	23
Ensayo de neutralización por reducción de placa .....	24
Análisis estadístico.....	24
6. RESULTADOS .....	26

La inoculación cutánea del DENV induce una respuesta robusta de CPs en los ganglios linfáticos drenantes (DLNs).....	26
Las CPs que han hecho cambio de clase a IgG dominan la respuesta ante la inoculación cutánea con DENV .....	29
La respuesta de CPs específicas para las proteínas virales E y prM es similar post-inoculación con DENV .....	31
La localización de las CPs sugiere que derivan de respuestas tanto extrafoliculares como de GCs, y un gran porcentaje prolifera tempranamente durante la infección con DENV .....	33
Dinámica del ciclo celular en las CPs inducidas por la inoculación cutánea del DENV.....	35
La disminución en el número de CPs en los DLNs a partir del día 10 p.i cutánea con DENV es en parte debido a muerte celular por apoptosis.....	36
La afinidad de los Abs IgG anti-DENV incrementa progresivamente con el tiempo y tienen capacidad neutralizante.....	38
Una gran proporción de los Abs IgG anti-DENV generados en el modelo tienen reacción cruzada con ZIKV .....	40
7. DISCUSIÓN.....	42
8. CONCLUSIÓN .....	47
9. PERSPECTIVAS .....	48
10. Referencias .....	49
11. ANEXOS .....	59

## Índice de figuras y tablas

Figura 1. El origen de las células plasmáticas.....	12
Figura 2. Estrategia general de análisis de los datos de citometría para estudiar a la población de células plasmáticas por citometría de flujo. ....	25
Figura 3. Cinética de la generación de CPs en los ganglios linfáticos drenantes (DLNs) de ratones inmunocompetentes post-inoculación cutánea con DENV.....	27
Figura 4. Análisis in situ de las CPs CD138+ en los ganglios linfáticos drenantes (DLNs) de ratones inmunocompetentes durante la cinética post-inoculación cutánea con DENV.....	28
Figura 5. La respuesta de CPs inducidas por el DENV está dominada por células que han hecho cambio de clase a IgG. ....	30
Figura 6. Análisis por ELISPOT de la especificidad de las CPs generadas en el pico de la respuesta. .	31
Figura 7. Análisis de la especificidad de las CPs hacia las proteínas estructurales del DENV E y prM. ....	32
Figura 8. Distribución de las CPs dentro de los DLNs durante la cinética post-inoculación cutánea con DENV.....	34
Figura 9. Cuantificación de CPs proliferantes (Ki-67 <sup>+</sup> ) durante la cinética post-inoculación con DENV. ....	35
Figura 10. La infección cutánea con DENV induce una entrada rápida de las CPs en ciclo celular ....	36
Figura 11. Evaluación de la muerte celular por apoptosis de las CPs durante la cinética.....	37
Figura 12. La afinidad de los Abs IgG anti-DENV2 incrementa con el tiempo después de la infección cutánea.....	39
Figura 13. Los Abs generados durante la infección cutánea con DENV tienen alta capacidad neutralizante. ....	40
Figura 14. Los Abs IgG generados antes la inoculación cutánea con DENV tienen un porcentaje alto de reacción cruzada con ZIKV.....	41
Anexo 1. La afinidad de los Abs anti-DNP-KLH aumenta con el tiempo post-inmunización. ....	59
Anexo 2. Ensayo de neutralización por reducción de placas. ....	60
Tabla 1. Anticuerpos y colorantes utilizados para los ensayos de inmunofluorescencia <i>in situ</i> y para citometría de flujo .....	21

## Lista de abreviaturas

Abreviatura	Definition	Definición
Abs	<i>antibodies</i>	anticuerpos
ADE	<i>antibody-dependent enhancement</i>	Facilitamiento de la infección dependiente de anticuerpos
Ag	<i>antigen</i>	antígeno
Ags	<i>antigens</i>	antígenos
AID	<i>activation-induced deaminase</i>	Deaminasa inducida por activación
ANOVA	<i>analysis of variance</i>	análisis de varianza
BCR	<i>B cell receptor</i>	receptor de células B
BHK-21	<i>baby hamster kidney 21 cell line</i>	línea celular de riñón de hámster bebé
C	<i>capsid protein</i>	proteína de cápside
CF	<i>flow cytometry</i>	citometría de flujo
CPs	<i>plasma cells</i>	células plasmáticas
CSR	<i>class-switch recombination</i>	recombinación con cambio de clase de Ab
DENV	<i>dengue virus</i>	virus del dengue
DF	<i>Dengue fever</i>	Fiebre por dengue
DHF	<i>Dengue hemorrhagic fever</i>	Fiebre hemorrágica por dengue
DLNs	<i>draining lymph nodes</i>	ganglios linfáticos drenantes
DNP-KLH	<i>dinitrophenyl-Hemocyanin Conjugate Keyhole Limpet</i>	dinitrofenil conjugado a hemocianina de lapa californiana
DSS	<i>Dengue shock syndrome</i>	Síndrome de choque por dengue
E	<i>envelope protein</i>	proteína de envoltura
ED	<i>E domain</i>	domino de la proteína E
ER	<i>endoplasmic reticulum</i>	retículo endoplásmico
FBS	<i>fetal bovine serum</i>	suero fetal bovino
FcγR	<i>Fc gamma receptor</i>	receptor del Fc gamma
FDCs	<i>follicular dendritic cells</i>	células dendríticas foliculares
FL	<i>fusion loop</i>	asa de fusión
GC	<i>germinal center</i>	centro germinal
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>	peroxidasa de rábano
iDENV	<i>inactivated dengue virus</i>	virus dengue inactivado
IF	<i>immunofluorescence</i>	inmunofluorescencia
Ig	<i>Immunoglobulin</i>	inmunoglobulina
IPTG	<i>isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside</i>	isopropil tiogalactopiranosido
LNs	<i>lymph nodes</i>	ganglios linfáticos
MBCs	<i>memory B cells</i>	linfocitos B de memoria



MZBC	<i>marginal zone B cells</i>	linfocitos B de la zona marginal del bazo
NS	<i>non-structural protein</i>	proteína no estructural
p.i.	<i>post-inoculation</i>	post-inoculación
PBs	<i>plasmablasts</i>	plasmablastos
PFU	<i>plaque-forming unit</i>	unidad formadora de placa
prM	<i>pre-membrane protein</i>	proteína de pre-membrana
RNA	<i>ribonucleic acid</i>	ácido ribonucleico
Sav	<i>streptavidin</i>	estreptavidina
SD	<i>severe dengue</i>	dengue severo
SHM	<i>somatic hyper mutation</i>	hipermutación somática
SLOs	<i>secondary lymphoid organs</i>	órganos linfoides secundarios
ssRNA	<i>single-stranded RNA</i>	ARN de cadena sencilla
TLR	<i>toll-like receptor</i>	receptor tipo Toll
UPR	<i>unfolded protein response</i>	respuesta a proteínas desplegadas
ZIKV	<i>zika virus</i>	virus del zika

## Resumen

El dengue es una amenaza que se está expandiendo mundialmente y es causada por la infección con el virus del dengue (DENV) del cual aún no existe un tratamiento específico o una vacuna efectiva y segura. Los anticuerpos (Abs) producidos por las células plasmáticas (CPs) están involucrados en la protección del hospedero pero también en la inmunopatología del dengue severo. Esto último se ha asociado a la generación de Abs no-neutralizantes en una primer infección y que pueden facilitar una segunda infección heteróloga. Aunado a esto, se ha reportado una aparición rápida y masiva de CPs en pacientes con dengue durante la etapa aguda de la infección, sin embargo esta respuesta no ha sido bien caracterizada debido a la dificultad de estudiar los mecanismos básicos de su generación en humanos. Por esto, quisimos estudiar la dinámica de la generación de las CPs en un modelo de infección cutánea con DENV en ratones inmunocompetentes y estudiar algunas de las características de los Abs producidos por estas células. Mediante una cinética post-inoculación (p.i.) detectamos que los números de CPs incrementaron significativamente en los ganglios linfáticos drenantes (DLNs) con el pico de la respuesta al día 10 p.i. con DENV y una disminución significativa al día 14. Las CPs IgG<sup>+</sup> aparecieron a partir del día 7 y dominaron la respuesta. En contraste, la respuesta de CPs IgM<sup>+</sup> fue más rápida pero los números fueron significativamente menores. La intensidad de la respuesta fue significativamente mayor con el DENV comparado con los ratones inoculados con el virus inactivado (iDENV). Interesantemente, demostramos una respuesta similar hacia la proteína E y prM por ELISPOT, y esto es relevante ya que una gran parte de los Abs no-neutralizantes descritos en humanos están dirigidos a la proteína prM. *In situ* observamos que las CPs se distribuyeron en los cordones medulares y en zonas adyacentes a los centros germinales (GCs), sugiriendo tanto un origen extrafolicular como folicular. Encontramos CPs proliferantes (Ki-67<sup>+</sup>) tan pronto como 3d p.i. y estas células estaban en diferentes fases activas del ciclo celular. Observamos la aparición progresiva de Abs IgG de alta afinidad DENV-específicos con capacidad neutralizante *in vitro* apoyando aún más la participación de respuestas de GC. Importantemente, demostramos que en este modelo se generan Abs IgG de reacción cruzada ya que una alta proporción de ellos reconocieron al virus del Zika (ZIKV). Consideramos que nuestras observaciones contribuyen a una mejor comprensión de la biología *in vivo* de la respuesta inmune humoral desencadenada por la infección cutánea con el DENV.

## Abstract

Dengue is a worldwide expanding threat caused by dengue virus (DENV) infection. To date, no specific treatment or effective vaccine is available. Antibodies (Abs) produced by plasma cells (PCs) might be involved concomitantly in protection and severe dengue immunopathology. The latter has been associated with the production of non-neutralizing Abs during a primary infection and these Abs might have the capacity of enhancing a secondary heterologous infection. Although a massive appearance of PCs has been reported in patients during acute DENV infection, this response has been poorly characterized due to the difficulty to study basic PC generation mechanisms in humans. Therefore, we studied the PC dynamics following cutaneous dengue virus infection in immune-competent mice and analyzed some characteristics of the Abs produced by these cells. We found that PC numbers increased significantly in the skin-draining lymph node (DLN), peaking at day 10 and abruptly decreasing by day 14 after DENV inoculation. Class-switched IgG<sup>+</sup> PCs appeared from day 7 and dominated the response. In contrast, IgM<sup>+</sup> PCs response was more rapid but the numbers were significantly lower compared to IgG<sup>+</sup> PCs. The intensity of the response was significantly higher with DENV compared to the inoculation of inactivated DENV (iDENV). Interestingly, we demonstrated a similar PC response to E and prM proteins by ELISPOT, and this is relevant because a substantial part of non-neutralizing Abs in humans is directed to prM. *In situ* characterization showed that PCs were distributed in the medullary cords and in close proximity to germinal centers (GCs), suggesting both an extrafollicular and a GC origin. Proliferating PCs (Ki-67<sup>+</sup>) were found as early as 3-day p.i., and in-depth analysis showed that these PCs were in active phases of cell cycle during the kinetic. Finally, we found a progressive appearance of high-affinity neutralizing DENV-specific IgG further supporting GC involvement. Of note, these antibodies seem to be highly cross-reactive, as a large proportion recognizes Zika virus (ZIKV). We consider that this study contributes to the understanding of the *in vivo* biology of the humoral immune response to cutaneous DENV infection.

# 1. INTRODUCCIÓN

## Marco Teórico

### *Dengue*

El dengue es una enfermedad viral transmitida por el piquete de mosquitos hembra del género *Aedes*, principalmente por *A. aegypti* y *A. albopictus*. Estos mosquitos también son los transmisores de los virus del Zika, Chikungunya y de la fiebre amarilla, entre otros. La enfermedad es común en países con climas tropicales y subtropicales donde los vectores encuentran las condiciones de temperatura, humedad y altura óptimas para su propagación y permanencia (1). Por esto, hasta el 40% de la población mundial está en riesgo de contagio con estimaciones de hasta 96 millones de casos clínicos cada año (2). Alrededor del 2% de las hospitalizaciones culminan con la muerte del paciente y cuando el manejo hospitalario no es el adecuado o en casos de enfermedad severa la tasa de mortalidad puede alcanzar hasta el 20% (1).

Se conocen 4 serotipos del virus del dengue (DENV1-4) que comparten una homología genómica de alrededor del 65% (3). La infección con cualquiera de ellos puede desencadenar una infección sintomática con una amplia variedad de formas clínicas desde Fiebre por dengue (DF) hasta dengue severo (SD). Los síntomas de la DF incluyen: fiebre alta (~40°C) que dura de 2 a 10 días y se acompaña de dos o más manifestaciones clínicas como dolor de cabeza intenso, dolor retro-ocular, dolor muscular y articular, náuseas, vómito, agrandamiento de ganglios linfáticos y sarpullido. Algunos pacientes desarrollan SD, anteriormente conocido como fiebre hemorrágica por dengue (DHF), que es potencialmente mortal, ya que puede culminar en síndrome de choque por dengue (DSS). En estos casos severos las manifestaciones generalmente son hemorragias en encías, en otras mucosas y en cavidades, extravasación de plasma, dificultad respiratoria, acumulación de líquidos y falla orgánica (1,4).

Se ha documentado a partir de datos epidemiológicos que la enfermedad severa es más frecuente en infecciones secundarias heterólogas. (4,5). Si bien este fenómeno puede deberse a diferentes factores como la edad del paciente, o el intervalo entre infecciones; algunas hipótesis como el aumento de la virulencia de algunas variantes del virus, el serotipo o la susceptibilidad genética por parte del hospedero también son aceptadas, aunque esto no se ha podido demostrar

formalmente y tampoco se ha estudiado con suficiente detalle, (6,7). Una de las hipótesis principales planteada desde hace varias décadas es que la respuesta inmune de memoria que se ha generado durante la primera infección podría estar involucrada en la patología de la segunda infección, ya sea por una respuesta de tipo celular y/o de tipo humoral (anticuerpos). Esta última fue recientemente demostrada por Katzelnick *et al.* en 2017 donde estudiaron a una cohorte extensa de pacientes en Nicaragua (n= 8002) por un tiempo prolongado (12 años) y encontraron que la severidad del dengue en infecciones secundarias está asociada directamente con los niveles de anticuerpos preexistentes, aunque no se realizaron análisis cualitativos de estos anticuerpos, por ejemplo, los epítomos del virus que son reconocidos por el hospedero (8).

Hasta ahora no hay un tratamiento específico ni vacunas seguras para esta enfermedad y se proporcionan al paciente tratamiento de soporte como la fluidoterapia y control de los síntomas más severos que puedan presentarse. Debido al papel cada vez más evidente de la respuesta inmune en la patogénesis y severidad del dengue, es necesario estudiar con más detalle la respuesta inmune desencadenada en infecciones primarias y secundarias para un diseño más racional de fármacos y prospectos vacunales.

### ***Virus del Dengue (DENV)***

El DENV es un flavivirus de la familia *Flaviviridae*, es un virus envuelto, con genoma de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva (ssRNA). Existen cuatro serotipos del DENV que comparten ~65% de homología a nivel de nucleótidos. Su genoma es de alrededor de 11,000 nucleótidos que se traducen en una poliproteína que es procesada en tres proteínas estructurales: proteína de la cápside (C), precursora de membrana (prM) y proteínas de envoltura (E) y siete proteínas no estructurales (NS): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (3,9,10).

El virus ingresa a las células hospederas por endocitosis mediada por receptor a través de la proteína E que se encuentra presente en todos los flavivirus (11). En infecciones secundarias, anticuerpos preexistentes no neutralizantes pueden reconocer al DENV a través de las regiones o epítomos comunes y conservados entre los 4 serotipos ocasionando la entrada del virus en células con receptores Fc $\gamma$ R, y a este proceso se le ha denominado facilitamiento de la infección mediado por anticuerpos (ADE, *antibody-dependent enhancement*) que se describirá detalladamente más adelante.

Durante la endocitosis mediada por receptor, la proteína E sufre cambios conformacionales debido al pH ácido de los endosomas promoviendo la fusión del virus con la membrana endosomal. El material genético escapa al citoplasma y se inicia la traducción y replicación del genoma viral en el retículo endoplásmico (ER). El ARN viral se asocia a la proteína C y se acopla con las proteínas E y prM en membranas derivadas del ER formándose así las partículas virales completas pero inmaduras. Estos viriones inmaduros son transportados a través de la vía secretoria desde el ER (12–14). Cuando el virión alcanza la región trans-Golgi, proteasas furinas -codificadas por el genoma del hospedero- escinden la proteína prM y se forman dos porciones: la proteína de membrana (M) y el péptido Pr, dando lugar al virión maduro infeccioso (15,16).

El ER de las células hospederas -donde ocurre la traducción y replicación viral- sufre rearrreglos y se expande durante la infección. Se ha observado que el DENV puede hacer frente al estrés que se genera en el ER durante este proceso infeccioso. Esto lo logra con la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, unfolded protein response) a través de las proteínas NS4A principalmente y también por NS2B/3. Esto reduce la muerte por apoptosis de la célula hospedera durante la replicación viral (17,18).

Las partículas virales maduras contienen proteínas E plegadas en estructuras alargadas tipo “varillas” de forma antiparalela, que forman 90 homodímeros antiparalelos y que están organizados en 30 balsas (*rafts*), y cada balsa está compuesta por 3 dímeros -en total hay 180 proteínas E por partícula viral- (19). La proteína E está compuesta por 3 ectodominios estructural y funcionalmente diferentes llamados EDI, II y III. EDI posee una estructura  $\beta$ -barril de 8 hebras y se localiza en el centro del monómero paralelo a la membrana viral (20). El EDII contiene un asa de fusión (FL, *fusión loop*) hidrofóbica rica en glicina, muy conservada entre flavivirus. El EDIII es un dominio de  $\beta$ -barril de tipo Inmunoglobulina (Ig) y muestra variabilidad entre los diferentes serotipos, además se ha demostrado que interactúa con diversos receptores celulares (21). El dominio III está formado por una secuencia continua unida al EDI mientras que los dominios EDI y el EDII son discontinuos y se conectan por 4 péptidos de unión y forman la “bisagra” EDI/EDII (22). Durante la reorganización conformacional de la superficie viral -inducida por el pH ácido endosomal-, el EDII reorienta a la proteína E formándose un trímero paralelo pero vertical a la membrana viral exponiéndose así el FL hacia afuera para iniciar el proceso de fusión con la membrana endosomal (16). Esta reorientación podría ocurrir también durante el tránsito del virus al medio extracelular, sin embargo, la proteína prM

interacciona con la proteína E en el FL previniendo una fusión prematura del virus con la membrana del ER (12). Como se mencionó anteriormente, la porción Pr es escindida por la proteasa furina durante el tránsito en la red del Golgi, y permanece unida a la proteína E hasta que el virus es secretado (23). Una vez en el medio extracelular, el pH neutro estabiliza a los dímeros E y se promueve la disociación de la porción Pr (24,25). Es importante mencionar que el proceso de maduración de las partículas virales no es completamente eficiente. Algunos estudios en líneas celulares de mamíferos (BHK-21 o Vero) o de mosquitos (C6/36) infectados con DENV, muestran un porcentaje alto (~50%) de partículas virales secretadas inmaduras (26,27). Si bien no se ha estudiado a profundidad la proporción de partículas virales inmaduras secretadas durante infecciones en humanos, la detección de títulos altos de anticuerpos contra la proteína prM en infecciones primarias y secundarias en suero de pacientes (28) sugiere que el proceso de maduración del virus tampoco es completamente eficiente en humanos. Se ha propuesto que estas partículas inmaduras están fuertemente asociadas al proceso de ADE (28,29), aunque no son las únicas como se describirá con más detalle.

### ***Respuesta de anticuerpos contra DENV***

Al igual que con otras infecciones virales, la respuesta inmune adaptativa tiene un papel fundamental en la defensa contra el DENV. Sin embargo, la respuesta de Abs contra dengue es muy compleja, tanto que puede ser benéfica o incluso perjudicial para el hospedero. Los 4 serotipos del DENV contienen epítomos -o determinantes antigénicos- que son reconocidos por nuestro sistema inmune incluyendo los Abs. Estos epítomos pueden ser únicos de cada serotipo o algunos son compartidos con los demás. Así, pacientes recuperados de infecciones primarias con DENV desarrollan respuestas robustas de Abs que pueden proteger parcial y transitoriamente contra los 4 serotipos e incluso con otros flavivirus (reacción cruzada). Sin embargo, se ha observado que estos anticuerpos previenen solamente la reinfección con el mismo serotipo (homólogo) mientras que los individuos son aún susceptibles a infecciones secundarias con un serotipo heterólogo (5,30).

Respecto a la cinética de estos anticuerpos generados en infecciones naturales con DENV, se ha observado que los anticuerpos de clase IgM DENV-específicos aparecen tras 4-5 días del inicio de la fiebre y se han detectado hasta 3 meses después. Por otra parte, los anticuerpos de clase

IgG DENV-específicos aparecen alrededor de una semana después del inicio de la fiebre y alcanzan su pico después de varias semanas. Si bien los títulos de Abs IgG disminuyen con el paso del tiempo, se puede detectar persistencia de títulos bajos, varias décadas después de la infección. Esta respuesta de Abs es diferente en infecciones secundarias y esto es porque los anticuerpos se pueden producir -además de la activación de linfocitos B vírgenes- también a partir de linfocitos B de memoria que se generaron de una infección primaria. Esto ocasiona una aparición más rápida de Abs IgG DENV-específicos en el suero de los pacientes -incluso uno o dos días después del inicio de los síntomas. Además, los títulos en suero de IgG DENV-específicos son más altos comparados a los de infecciones primarias. La respuesta de Abs IgM en infecciones secundarias son más variables o incluso indetectables pero este fenómeno aún no se comprende completamente (31–33).

Los anticuerpos principales que se generan durante las infecciones con DENV reconocen principalmente a las proteínas estructurales más expuestas de las partículas virales, las proteínas E y prM. Interesantemente, la proteína NS1 es secretada por las células infectadas por lo que también es un blanco del sistema inmune (34–37). Los anticuerpos que reconocen a la proteína E han sido estudiados de manera importante ya que este antígeno se encuentra en la superficie de las partículas virales maduras infectivas y es el principal blanco de los anticuerpos neutralizantes (38–40). Avances recientes han permitido estudiar con más detalle a estos anticuerpos neutralizantes en humanos y ahora sabemos que reconocen principalmente a la región EDIII, o a epítopos cuaternarios que se forman cuando dímeros de proteína E (EDE, *E Dimer Epitope*) se empaquetan en la superficie del virión y también aquellos que reconocen a la región de bisagra entre EDI y EDII (29,38–40). Contrario a esto, los anticuerpos que reconocen a la región FL en el EDII y a la proteína prM tienen poca capacidad neutralizante y pueden favorecer la infección viral *in vitro*, por lo que se les ha llamado anticuerpos “facilitadores” (29,38,41–44). Además, se ha demostrado *in vitro* que todos los anticuerpos dirigidos contra cualquiera de los dominios de la proteína E pueden incrementar el índice de infección en concentraciones sub-neutralizantes (29,45).

### ***Incremento de la infección dependiente de Abs: ADE***

Diversos estudios epidemiológicos en diferentes partes del mundo han documentado que los individuos expuestos a infecciones secundarias con DENV tienen mayores probabilidades de



manifestar la enfermedad severa comparados con pacientes en infecciones primarias(6,7,46) . Si bien hay diversos factores que pueden contribuir a esto, desde hace varias décadas se sugirió que este fenómeno estaba ligado a la respuesta inmune que se genera en el hospedero, por ejemplo la hipótesis del ADE que sugiere que algunos Abs generados ante una infección primaria, de reacción cruzada, son capaces de reconocer al serotipo heterólogo de una infección secundaria. Estos anticuerpos son ineficientes para neutralizar a los viriones, pero pueden facilitar el proceso de infección. Por definición, estos Abs serían de memoria, originados durante la primera infección, los cuales habrían experimentado cambio de clase (es decir, a IgG). Durante la última década se ha demostrado la existencia de estos anticuerpos facilitadores y algunas de sus características. Se ha documentado que una gran proporción de estos anticuerpos no neutralizantes están dirigidos contra la proteína prM y son de clase IgG (38). Es importante mencionar que estos Abs anti-prM se generan en la gran mayoría de pacientes con infecciones primarias -similar a los Abs anti-E-, pueden facilitar la infección viral *in vitro* y además en infecciones secundarias sus concentraciones en suero son aún mayores prácticamente dominando la respuesta de Abs (29,38,45).

Respecto al mecanismo del facilitamiento de la infección, estos Abs promoverían la entrada de partículas inmaduras mediante el reconocimiento del serotipo heterólogo formando complejos inmunes infecciosos que son capaces de ingresar virtualmente en cualquier célula que exprese receptores de la porción Fc de los Abs IgG (receptores Fc gamma, Fc $\gamma$ R), como los monocitos, macrófagos y células dendríticas (DCs). Así, las partículas virales inmaduras completarían su proceso de maduración en el microambiente de los endosomas y durante su tránsito en la vía endocítica -aunque los detalles del mecanismo son un campo poco explorado al momento-, y de esta manera se amplificaría la frecuencia de células infectadas (28,38,43).

Además de los Abs facilitadores anti-prM, también se han descrito Abs dirigidos contra la proteína E que son capaces de facilitar la infección. Se ha mostrado que estos Abs reconocen a la región FL del EDII, mientras que los Abs neutralizantes está dirigidos contra el EDIII -como se mencionó anteriormente-. Aunado a esto, Abs dirigidos a epítomos cuaternarios de la proteína E que se exponen en partículas virales inmaduras también pueden facilitar la entrada de partículas que no son infectivas por sí mismas, promoviéndose la infección (43,47).

Sin embargo, en concentraciones sub-neutralizantes, todos los anticuerpos dirigidos contra la proteína E podrían ser potencialmente “facilitadores”. Si bien el fenómeno de *ADE* ha sido apoyado teórica- y experimentalmente (*in vitro*), esto se demostró recientemente en una extensa cohorte de pacientes pediátricos con dengue en Nicaragua (n= 8002) que tuvieron un seguimiento prolongado (12 años) y encontraron que la severidad del dengue en infecciones secundarias está asociada directamente con los niveles de anticuerpos heterólogos preexistentes (8). La importancia de estudiar la respuesta de Abs en dengue (y las enfermedades ocasionadas por otros flavivirus relacionados como el virus del Zika, *ZIKV*) ha tomado aún más importancia con la salida de Dengvaxia, una vacuna de virus atenuado y tetravalente desarrollado por Sanofi Pasteur y que al ser aplicada en sujetos seronegativos para DENV ha incrementado el riesgo de la enfermedad severa y la hospitalización comparado con sujetos no vacunados (48,49). Así, la vacuna parece incrementar la severidad a una infección subsecuente en pacientes seronegativos. Por lo cual, la OMS ahora recomienda que la vacuna sea aplicada sólo a sujetos que hayan atravesado previamente por una infección natural con DENV (50).

### ***Células plasmáticas y su origen***

Las CPs representan el último estadio de diferenciación de los linfocitos B y su función básica primordial es la síntesis y secreción de Abs (51). Dependiendo del tipo de reacción donde se indujo el proceso de diferenciación, las CPs pueden agruparse en dos categorías generales: CPs de reacción folicular (de GCs) y extrafoliculares. En ambos casos, para que la respuesta inmune humoral se inicie, se requiere que los linfocitos B entren en contacto con su antígeno a través de su inmunoglobulina de membrana denominada receptor de células B (BCR, *B-cell receptor*) dando lugar a un estado activado de linfocitos B proliferantes. El encuentro de los linfocitos B con los antígenos ocurre primordialmente en tejidos linfoides secundarios y/o periféricos (SLOs, *secondary lymphoid organs*) entre ellos los ganglios linfáticos (LNs), el bazo o las Placas de Peyer (PPs). Los SLOs son sitios especializados donde se filtran fluidos corporales -como la linfa, sangre y fluidos de mucosas-, y se capturan y exponen antígenos “extraños” promoviendo el encuentro con los linfocitos B ya que se mantiene el ingreso y flujo constante de linfocitos circulantes sanguíneos (52–55).

Las CPs derivadas de reacciones foliculares se generan a partir de los GCs que toman lugar en los SLOs dentro de estructuras microanatómicas llamadas folículos donde los componentes celulares principales son linfocitos B vírgenes. Después del reconocimiento específico del antígeno por el BCR, los linfocitos B (ahora activados) llevarán a cabo una expansión clonal. La formación del centro germinal se inicia cuando los linfocitos B2 (o foliculares) proliferan y llevan a cabo hipermutación somática (SHM) en las regiones variables de los genes de sus Abs, entre otros procesos. En estos folículos que contienen linfocitos B que han entrado en reacción de GC se observan dos compartimentos bien definidos histológicamente, la zona clara y la zona oscura, rodeadas por un manto de linfocitos B vírgenes. La zona oscura está próxima al área de linfocitos T y es donde se encuentra la mayor densidad de linfocitos B grandes proliferantes conocidos como centroblastos los cuales están experimentando SHM. En el extremo opuesto se encuentra la zona clara, donde la densidad de linfocitos B es menor debido a que es un sitio con menos proliferación y se observa una red amplia de células estromales llamadas células dendríticas foliculares (FDCs). Los linfocitos B de la zona clara -también llamados centrocitos- son pequeños y compiten por el Ag presente en las FDCs. Los centrocitos cuyos BCR mutados “nuevos” reconozcan con alta afinidad al Ag tendrán mayor probabilidad de internalizar, procesar y presentar estos antígenos a una población de linfocitos T altamente especializados que se encuentran dentro de los GCs denominados linfocitos T cooperadores foliculares (Tfh) y proveerán a estos linfocitos B de señales de coestimulación y sobrevivencia como CD40L, IL-21, IL-4 y CXCL13 (selección positiva) (55–61). Los GCs son sitios altamente dinámicos, y el movimiento de los linfocitos B depende de gradientes de quimiocinas, CXCL12 y CXCL13; y la expresión regulada de sus receptores CXCR4 y CXCR5 sobre centroblastos y centrocitos respectivamente. Así, los linfocitos B de GCs pueden llevar a cabo varias rondas de SHM y de selección por los linfocitos Tfh con la posibilidad de que las mutaciones en sus BCR ocasionen una mejora en la afinidad por el antígeno, a este proceso se le ha denominado maduración de la afinidad. Aquellos linfocitos B de GC cuyos BCRs dejen de reconocer al antígeno o que su afinidad baja no les permita competir con la de otras clonas, no serán “seleccionados” por los linfocitos Tfh, morirán por apoptosis, y serán eliminados por una población de macrófagos (TBMs, *Tingible body macrophages*) que se encuentran dentro de los GCs. Los linfocitos B seleccionados por los linfocitos Tfh podrán diferenciarse a CPs secretoras de anticuerpos o a

linfocitos B de memoria (MBC, *memory B cells*) y estos últimos podrán diferenciarse rápidamente a CPs ante un segundo encuentro antigénico (53,58,62,63).

Así, los GCs son la base de la inmunidad humoral dependiente de linfocitos T y su función primaria es generar CPs secretoras de Abs de alta afinidad y generar MBCs que proporcionarán una protección inmune sostenida y una respuesta rápida e inmediata ante encuentros subsecuentes con el mismo antígeno (memoria inmunológica) (53). Los GCs dan lugar a CPs de larga vida y muchas de ellas migran a otros nichos como la médula ósea (MO) donde permanecerán por varios meses o hasta años secretando anticuerpos. No se sabe aún a detalle qué factores determinan si una CP será de vida larga o corta. Aunque es bien aceptado que las CPs derivadas de respuestas extrafolículoares son de vida corta, algunos estudios sugieren que también pueden dar lugar a CPs de vida larga. En ambos tipos de respuesta las CPs migran a nichos dentro del SLO como los cordones medulares de los LNs donde reciben factores de sobrevivencia de células estromales y DCs. Sin embargo, muchas CPs son de vida corta y mueren por apoptosis durante la contracción de la respuesta, aunque las características que condicionan su vida transitoria son aún desconocidas (52,53,55,64–66).

Otra característica de los GCs es la diversificación de las funciones de los Abs mediante el proceso de cambio de clase (CSR, *class-switch recombination*). El CSR es un proceso de recombinación genética donde se reemplaza el gen de la región constante de la cadena pesada de los Abs ( $C_H$ ) por otro gen  $C_H$ , generando el cambio de clase de IgM ( $C_{\mu}$ ) a cualquiera de las otras clases -IgG, IgE o IgA. Tanto el CSR y la SHM requieren de la actividad de la enzima Deaminasa de citidina inducida por activación (AID), la cual se expresa predominantemente en la zona oscura de los GCs (67–70). Por esto, se creía que el CSR era un proceso llevado a cabo dentro de los GCs, sin embargo, se demostró recientemente que el CSR ocurre principalmente antes de la formación de los GCs, afuera de los folículos entre la zona de linfocitos T y B (borde T-B) y ocurre de manera muy infrecuente en los linfocitos B de GC (71).

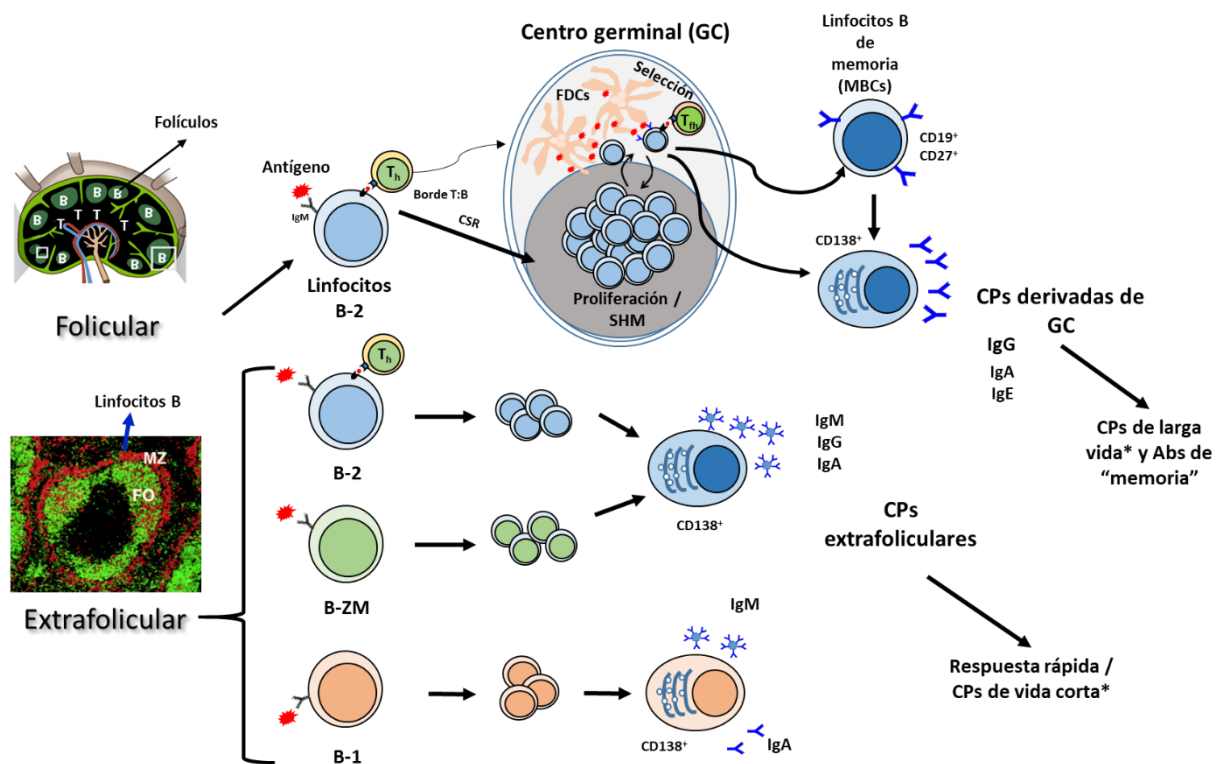
Cada vez es más evidente que las reacciones extrafolículoares también aportan a la respuesta de Abs que han hecho cambio de clase; sin embargo, es importante mencionar que estas respuestas han sido menos estudiadas, aunque es bien sabida su importancia ya que las CPs son generadas más rápidamente que aquellas de reacciones foliculoares y conceden una protección durante fases agudas de infección (55,72).

Las respuestas extrafoliulares son aquellas donde la activación y diferenciación de los linfocitos B no involucran la formación de GCs. Se conocen al menos dos subpoblaciones de linfocitos B (linfocitos B1 y linfocitos B de la zona marginal del bazo, MZBCs) que llevan a cabo estrictamente respuestas extrafoliulares y que han sido estudiadas más extensamente en ratones, sin embargo, existen subpoblaciones similares en humanos. Sus respuestas son de tipo “innato” ya que parecen ser independientes de la ayuda de los linfocitos T y su diferenciación ocurre muy rápido (1-2 días) después del encuentro con el Ag. Los linfocitos B1 se localizan principalmente en cavidades como el peritoneo y la pleura, sus BCRs pueden reconocer carbohidratos y lípidos, y contribuyen a la secreción de los llamados “Abs IgM naturales” y también de clase IgA generalmente de baja afinidad, cuya producción puede ser independiente de la inmunización y diversos estudios sugieren que esta respuesta está determinada por la microbiota (73,74). Sin embargo, estas dos poblaciones no están presentes o sólo en proporción muy baja (MZBCs y B1 respectivamente) en ganglios linfáticos donde también existen respuestas extrafoliulares. Se sabe que los linfocitos B2 también dan lugar a CPs rápidamente en reacciones extrafoliulares. Este proceso se inicia una vez que los linfocitos B son activados por el reconocimiento del Ag, sin embargo, en lugar de migrar al interior del folículo y comenzar la reacción de centro germinal, estos linfocitos B activados proliferan y se diferencian rápidamente a CPs en focos extrafoliulares. Estas respuestas extrafoliulares pueden ser dependientes o independientes de la cooperación de los linfocitos T. Respecto a los Abs que se generan a partir de las reacciones extrafoliulares, ahora sabemos que no solamente se generan CPs secretoras de IgM sino también puede llevar a cabo CSR por ejemplo a IgG e IgA (53,55,72). Este CSR es dependiente de la expresión de la enzima AID que se mencionó anteriormente y se ha demostrado que su expresión puede inducirse mediante la sinergia de la señalización del BCR y la de receptores innatos como los TLRs que pueden reconocer por ejemplo ARN viral (mediante TLR7) provocando el cambio de clase a IgG (75). Sin embargo, las cantidades de AID que se inducen no son suficientes para que se lleve a cabo SHM ni maduración de la afinidad, aunado a un nicho desfavorable para estos procesos comparado con el de los GCs (53,76).

Al final, las respuestas extrafoliulares darán lugar rápidamente a CPs productoras de anticuerpos generalmente de baja afinidad (comparado con aquellas derivadas de GCs), que han experimentado o no cambio de clase y principalmente de vida corta, aunque algunos estudios

sugieren la producción de CPs de vida larga e incluso de MBCs provenientes de estas reacciones (55,77–79). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, se desconocen aún los mecanismos celulares y moleculares que regulan la generación y función de estas respuestas.

Las CPs generadas tanto en reacciones foliculares como extrafoliculares tienen un fenotipo muy similar lo que ha dificultado el estudio de la magnitud de cada respuesta ante diferentes situaciones de exposición antigénica e infecciosas. Las CPs pueden ser detectadas y estudiadas en el tejido donde se generaron, en circulación e incluso en los tejidos a donde pudieron haber migrado. Una de las principales proteínas que nos permiten eso es CD138, que se encuentra en la membrana de las CPs y puede ser detectado mediante el marcaje con anticuerpos, ya sea por técnicas de análisis unicelular como la citometría de flujo o en cortes de tejido por inmunohistoquímica/fluorescencia (80). También se puede realizar el marcaje de la clase de Ab que está produciendo (por ejemplo, Abs anti-IgM o IgG) al cuál será específico sólo para uno de ellos. Durante el proceso de diferenciación, las CPs aún pueden proliferar y/o encontrarse en circulación y durante este estadio han sido llamados plasmablastos (PBs). La mayoría de los estudios de CPs no evalúan el estado ni capacidad proliferativa de estas células así que al expresar marcadores de CPs simplemente son llamadas células secretoras de Abs (ASCs, *antibody-secreting cells*) o CPs. En este trabajo serán llamadas CPs y en algunos casos específicos se hará la distinción con los PBs.



**Figura 1. El origen de las células plasmáticas.** Esquema representativo de las subpoblaciones de linfocitos B que al activarse pueden llevar a cabo reacciones foliculares o extrafolliculares para dar lugar a la generación de CPs productoras de Abs y también a linfocitos B de memoria. La información de los mecanismos se detalla en el apartado anterior.

## **Antecedentes directos**

### ***Generación de CPs en infecciones con DENV***

A pesar del importante papel de los Abs no solamente en la protección del hospedero sino también en la patogénesis del dengue -como se describió anteriormente-, las respuestas de las CPs y su dinámica de generación durante la infección no han sido bien caracterizadas.

En la última década se ha descrito que en etapas agudas de la infección con DENV hay una aparición rápida y masiva de plasmablastos circulantes que llegan a representar hasta el 80% del compartimento de los linfocitos B CD19+ circulantes de los pacientes (81–84). Además, se encontró que la infección con DENV desencadena una respuesta de PBs significativamente mayor comparado por ejemplo con sujetos que recibieron la vacuna de la influenza o de la fiebre amarilla (2-3% del total de linfocitos B CD19+ circulantes) (81). Los Abs producidos por la mayoría de estos PBs son de clase IgG y de reacción cruzada contra serotipos heterólogos del DENV, además esta respuesta exacerbada parece ser independiente de la severidad de la enfermedad (DF o SD). La evidencia también sugiere que el DENV es capaz de activar policlonalmente a los linfocitos B, es decir que reconocen a otros Ags, como el virus de la polio, ya que hubo un incremento significativo de Abs reactivos a este virus entre los días 15 y 25 del inicio de la fiebre comparado con sujetos control. Además, los números de PBs y CPs fueron mayores en pacientes con infecciones secundarias comparado con infecciones primarias, lo cual sugiere una reactivación de los linfocitos B de memoria que se generaron en la primer infección (82).

Es generalmente aceptado que las CPs que han hecho cambio de clase son generadas principalmente en los GCs, sin embargo ahora sabemos que una parte importante de esta respuesta también podrían generarse en reacciones extrafoliculares (55,85). A pesar de que el DENV desencadena una respuesta exacerbada de CPs en humanos, aún se desconoce con detalle el origen de estas células. Un estudio de 2016 por Godoy-Lozano *et al.* sugiere que los Abs generados en infecciones agudas provienen de reacciones independientes de los GCs, es decir de la activación y diferenciación de los linfocitos B a PBs en procesos extrafoliculares y que la respuesta es seguida por CPs provenientes de GCs (86). Esto se basa en el hallazgo de tasas bajas de hipermutación somática en los genes de Abs durante la etapa aguda de la infección en humanos. Sin embargo, se requieren más estudios para demostrar formalmente el sitio donde se



generan las CPs dengue y esto es una tarea complicada en humanos y se requiere el uso de modelos animales para completar la información.

Debido a la relevancia de los Abs en dengue y que además este virus desencadena una respuesta exacerbada de las CPs productoras de estos Abs, es de suma importancia estudiar y comprender la naturaleza de esta respuesta, y particularmente para el desarrollo de vacunas que sean seguras para los humanos.

### ***Infección en ratones inmunocompetentes***

Los modelos de infección en animales se han desarrollado con el fin de estudiar los mecanismos detrás de estas patologías y han sido de suma importancia para entender la patogénesis, la respuesta inmune, la evaluación preclínica de vacunas, fármacos, entre otros. Respecto al dengue, el modelo animal en el cual pueden reproducirse ciertas características de la infección es en ratones inmunodeficientes y por eso es ampliamente usado (87). Sin embargo, este modelo podría no ser el más indicado para evaluar de manera precisa la respuesta inmune contra el DENV ya que hay deficiencias de señalización de interleucinas que son importantes para un correcto establecimiento de la respuesta lo que incluso lleva a la muerte del ratón (88,89). Se han realizado diversos estudios en ratones inmunocompetentes, pero, debido a que estos no son hospederos naturales, se han usado dosis altas de virus y por rutas diferentes a la piel para poder mantener la replicación viral y que se reproduzcan diversos signos de la enfermedad (90–93).

En nuestro grupo de trabajo se ha propuesto y estudiado la infección cutánea con dosis bajas del DENV en ratones BALBC/c inmunocompetentes. Mediante la inoculación intradérmica de  $6 \times 10^4$  PFU -que se aproxima a lo que se ha calculado que los mosquitos inoculan en sus hospederos en la naturaleza- se ha reportado una infección activa y la presencia de Ags virales dentro de los ganglios linfáticos drenantes (DLNs). Además, se induce una respuesta robusta de linfocitos B con la formación de numerosos GCs y linfocitos B de centro germinal específicos tanto para la proteína E como para la proteína prM (94). En contraste con la rápida y fuerte respuesta de linfocitos B, las respuestas de linfocitos T están casi ausentes en este modelo (95).

Sin embargo, en este modelo las respuestas de CPs ni la dinámica con la que se generan han sido estudiadas, por lo que se quiere conocer si existe alguna relación entre la infección con el DENV y la inducción de esta respuesta. Conocer la respuesta de las CPs ayudará a entender los mecanismos iniciales en la producción de Abs durante la infección con el DENV y si el virus

desencadena alguna respuesta particular que pueda ser potencialmente favorable para el establecimiento de la infección.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Durante la infección aguda con DENV se induce un gran número de CPs en humanos. Los Abs que estas células producen no sólo participan en la protección del huésped sino se han visto implicados en la enfermedad severa. Sin embargo, las bases celulares de la respuesta inmune humoral inducida por el DENV están muy poco estudiadas. Por ello en este trabajo se estudió la dinámica en la generación de las CPs durante la infección cutánea con DENV en un modelo murino inmuno-competente.

## **3. HIPÓTESIS**

La inoculación cutánea con DENV en ratones inmunocompetentes inducirá la generación de CPs específicas para el virus y serán principalmente células con cambio de clase de Ab relacionados con memoria inmunológica (IgG).

## 4. OBJETIVOS

### General

Estudiar *in vivo* e *in situ* la dinámica de la generación (o no) y función de las CPs de los ganglios linfáticos drenantes ante la inoculación cutánea con DENV, y evaluar su especificidad hacia el DENV y dos Ags virales (proteínas E y prM).

### Específicos

1. Determinar en una cinética post-inoculación cutánea con DENV los porcentajes y números totales de CPs en los ganglios linfáticos drenantes (DLNs).
2. Analizar la distribución *in situ* de las CPs (CD138+, Igs+) post-inoculación cutánea con DENV.
3. Analizar si durante la infección con DENV las CPs generadas han hecho cambio de clase de anticuerpo; evaluando la expresión de IgM e IgG intracelular.
4. Evaluar la especificidad de las CPs contra el DENV y contra sus proteínas E y prM.
5. Analizar la capacidad de proliferación y el tránsito de las CPs por las diferentes fases del ciclo celular y evaluar la tasa de apoptosis.
6. Analizar si las CPs generadas llevan a cabo maduración de la afinidad de sus anticuerpos.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### **Ratones e inmunizaciones**

Ratones BALB/c machos adultos (6-8 semanas) libres de patógenos fueron obtenidos del bioterio del CINVESTAV-IPN y fueron inoculados vía intradérmica (i.d.) en la región inguinal con  $6 \times 10^4$  PFU de DENV2 con un re-estímulo al día 7. Los ratones control fueron inoculados con la misma dosis de DENV inactivado con luz UV (iDENV) o con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) estéril y libre de endotoxinas, bajo el mismo esquema de inmunización. Todos los experimentos fueron realizados en cumplimiento de la NOM-062-ZOO-1999, que contiene los lineamientos para el cuidado de animales de experimentación del CINVESTAV-IPN. Se llevaron a cabo cuatro experimentos independientes con dos ratones por grupo experimental y por tiempo de estudio (días 3, 7, 10, 14 y 21 post- inoculación), a menos que se indique de otra manera. En algunos experimentos se inoculó a los ratones con el antígeno modelo DNP-KLH (20ug) precipitado en Alum como control positivo de inducción de Abs de alta afinidad.

### **Preparación de los stock virales (DENV2 y ZIKV)**

Los stock de DENV2 y ZIKV fueron obtenidos mediante la infección de la línea celular C6/36 de mosquito o de la línea celular Vero, respectivamente, infectadas con extractos de cerebro de ratones neonatos infectados. Las células C6/36 o Vero fueron cultivadas en medio EMEM suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% (Gibco), anfotericina B, penicilina, estreptomina, piruvato, vitaminas y L-glutamina, a 34°C en botellas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (Corning). La infección se realizó cuando se alcanzó 95% de confluencia. Después de 48h de infección, las células infectadas se recuperaron junto con el medio de cultivo celular y con un homogeneizador Dounce se homogenizaron con 10 golpes. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C, durante 5 minutos. El sobrenadante se mezcló con polietilenglicol (PEG) en una proporción de 10 ml de PEG (PEG al 40 % en Cloruro de sodio 2M) por cada 40 mL de medio, y se dejó la mezcla a 4°C toda la noche. Después de esto, la mezcla se centrifugó a 10,000 rpm por 60 minutos a 4°C. La pastilla resultante se resuspendió en una proporción 1/15 del volumen original con amortiguador GNTTE (Tris 50 mM, glicina 200 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1mM). Nuevamente la mezcla se homogenizo con otros 5 golpes y finalmente se hicieron alícuotas de 100 µL del sobrenadante que contiene al virus y se almacenó a -70°C.

La cuantificación de los viriones infectivos se realizó mediante la técnica estándar de formación de placas en células Vero, como ha sido descrito (96). El título se determinó como unidades formadoras de placa (PFU)/ml.

### **Producción de las proteínas virales recombinantes**

Cultivos de cepas de *Escherichia coli* BL21 transformadas con el plásmido pGEX-4T para la expresión de las proteínas E (97) a partir de la secuencia del DENV2 se indujeron para la expresión de las proteínas mediante el estímulo con 1 mM de isopropil tiogalactopiranosido (IPTG). Se produjeron cuerpos de inclusión y las proteínas de fusión se purificaron a partir de geles preparativos SDS-PAGE al 10%, como ha sido descrito (98). La concentración del producto recombinante se determinó mediante lecturas a 280 nm de longitud de onda en NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). En el caso de la proteína prM (DENV2 cepa Nueva Guinea) se clonó en el plásmido pPROEX HTa. La secuencia de la proteína prM se amplificó por PCR a partir de los iniciadores: (forward) 5' (HindIII) ccggaattcttccatttaaccacacgt and 3' (XhoI) aagcggccgcaatgtcattgaagg (backward) 5'. El plásmido y el producto de PCR fueron digeridos enzimáticamente con HindIII y XhoI, purificados y unidos a los sitios de restricción del vector parental mencionado. El plásmido resultante se nombró como pPROEX/prM y codifica para la proteína completa prM seguida de una cola de histidinas. Este plásmido recombinante se purificó con un "kit" (Qiagen Inc., Chatsworth, CA) a partir de la cepa JM109 de *E. coli*. Las construcciones se verificaron por secuenciación automatizada. Finalmente, la expresión de la proteína recombinante se demostró por la presencia de una proteína con el peso molecular estimado (25 kDa).

### **Microscopía de inmunofluorescencia *in situ***

Los DLNs se obtuvieron a diferentes tiempos post-inoculación y se congelaron en medio de congelamiento (Leica) con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta su uso. Se realizaron criocortes de ~5 µm de grosor y se montaron en portaobjetos electroestáticamente cargados con poli-L-lisina, se fijaron en acetona fría por 20 min, se dejaron secar completamente a temperatura ambiente (TA) y se almacenaron a -20°C. Para su uso, las laminillas con los cortes fueron rehidratadas en solución de lavado (PBS 1X con saponina al

0.5% y azida de sodio al 0.01%), se bloquearon con BSA al 1% en PBS 1X y se incubaron por 1h a RT con los anticuerpos primarios o con anticuerpos conjugados a fluorocromos (ver Tabla 1 para detalles de los anticuerpos usados). Se realizaron dos lavados con solución amortiguadora de lavado y se incubaron los anticuerpos secundarios por 1h a TA. Se hicieron 3 lavados con la misma solución y se realizó el montaje de las laminillas con medio de montaje anti-decoloración (*antifade mounting medium*, ProLong Gold; Invitrogen). Las imágenes fueron adquiridas con un escáner de laminillas de alta resolución Zeiss Axio Scan.Z1 (Zeiss, Germany) usando un objetivo 20X y se analizaron con el software Zen 3.0 Blue edition (Carl Zeiss Microscopy, Germany).

### **Citometría de flujo y análisis del ciclo celular**

A partir de los DLNs obtenidos a diferentes tiempos post-inoculación, se generaron suspensiones unicelulares por disrupción mecánica y fueron pasadas a través de coladores celulares de 70  $\mu\text{m}$ . A excepción del análisis de ciclo celular, las suspensiones celulares fueron teñidas con el colorante de viabilidad Fixable Viability Dye eFluor 450 (eBioscience) para excluir del análisis a las células muertas. Las suspensiones celulares fueron bloqueadas con el reactivo Bloqueador Universal (*Power Block*, BioGenex) para reducir la unión inespecífica. Después se incubaron con los anticuerpos anti-ratón relevantes para detectar moléculas de membrana (Tabla 1) por 25 min a 4°C. Posterior se realizaron 2 lavados con Solución de FACS (BSA 1% y NaN<sub>3</sub> 0.01% en PBS 1X) y se realizó un tratamiento con el kit BD Cytofix/Cytoperm (San Jose, USA) de acuerdo a las especificaciones del fabricante para realizar una permeabilización de la membrana celular. Las suspensiones celulares permeabilizadas fueron incubadas con Abs anti-IgM FITC y anti-IgG APC o anti-Caspasa 3 activa FITC. Para el análisis del ciclo celular, después del marcaje de membrana se realizó un tratamiento de las suspensiones celulares con el kit “Foxp3/Transcription Factor Fixation/Permeabilization” (eBioscience) para la detección intracelular/intranuclear de Ki-67. Después de dos lavados, las suspensiones celulares fueron incubadas 10 min con el colorante fluorescente de ADN Hoechst 33258 (Polysciences). Finalmente se hizo una fijación con paraformaldehído al 1% (Sigma-Aldrich) y se realizó la lectura en el citómetro de flujo CytoFLEX LX usando el software CytExpert (Beckman Coulter). Los datos fueron analizados mediante el software FlowJo vX.0.7 (Ashland, OR).

**Tabla 1. Anticuerpos y colorantes utilizados para los ensayos de inmunofluorescencia *in situ* y para citometría de flujo**

Reactividad	Isotipo	Clona	Conjugado	Casa comercial	Uso
Active Caspase-3	Conejo IgG	C92-605	FITC	BD Pharmingen	CF/IF
CD4	Rata IgG2b, κ	RM4-4	PE	BioLegend	IF
CD4	Rata IgG2b, κ	GK1.5	APC	eBioscience	IF
CD138	Chivo IgG	Policlonal	Purificado	R&D Systems	IF
CD138	Rata IgG2a, κ	281-2	PE	BD Pharmingen	CF
IgG Chivo	Burro IgG	Policlonal	Alexa Fluor 488	Jackson Immunoresearch	IF
IgG Chivo	Burro IgG	Policlonal	Alexa Fluor 555	Invitrogen	IF
IgD	Rata IgG2a, κ	11-26c.2a	Brilliant Violet 421	BioLegend	IF
IgG	Chivo IgG F(ab') <sub>2</sub>	Policlonal	APC	eBioscience	IF/CF
IgM	Chivo IgG	Policlonal	FITC	Southern Biotech	IF/CF
Ki-67	Conejo IgG	Policlonal	Purificado	Abcam	IF
Ki-67	Mouse IgG1, κ	B56	Alexa Fluor 488	BD Pharmingen	CF
Ly-6G/Ly-6C	Rata IgG2b, κ	RB6-8C5	PerCP	BioLegend	CF



IgG Conejo	Burro IgG	Policlonal	Cy3	Jackson Immunoresearch	IF
Estreptavidina			PE-Texas Red	BD Pharmingen	CF
Hoechst 33258				Polysciences	CF
Fixable Viability Dye			eFluor 450	eBioscience	CF

### Ensayos de ELISPOT

Para determinar la especificidad de las CPs contra el DENV2 y las proteínas prM y E en el pico de la respuesta, se cubrieron las placas de ELISPOT (MultiScreen, Millipore) con  $5 \times 10^5$  PFU/pozo de DENV2 completo o 5  $\mu\text{g/ml}$  pozo de proteínas recombinante E o prM en un volumen de 50  $\mu\text{l}$ /pozo diluidos en solución amortiguadora de fosfatos ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.015 M  $\text{NaHCO}_3$  0.035 M en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada) y se incubaron a  $4^\circ\text{C}$  durante toda la noche. Después de dos lavados con PBS 1X, se realizó un bloqueo con BSA al 1% en PBS 1X por 1 h a  $37^\circ\text{C}$ . Se obtuvieron suspensiones celulares de DLNs al día 10 p.i como se detalló anteriormente y se añadieron  $3.5 \times 10^5$  células viables/pozo por duplicado. Las células fueron incubadas por 5 h a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente se realizaron tres lavados con PBST (Tween-20 al 0.05% en PBS 1X) y se añadieron diluciones óptimas de anticuerpos de detección conjugados a fosfatasa alcalina (anti-IgM-AP o anti-IgG-AP; Southern Biotech) incubando durante toda la noche a  $4^\circ\text{C}$ . Se realizaron tres lavados con PBS-T y un último con sólo PBS 1X. Posteriormente se visualizó la reacción de la fosfatasa alcalina añadiendo el sustrato Sigma Fast BCIP/NBT (Sigma Aldrich). Los puntos revelados fueron contados usando el lector automático AID ELISPOT Reader System (Autoimmune Diagnostika). Los datos se presentan como Unidades Formadoras de Puntos (UFP) ya sea de IgM o IgG por DLN (UFP/DLN).

### **Ensayos de ELISA de afinidad y evaluación de reacción cruzada**

Para evaluar la maduración de la afinidad de los Abs IgG producidos en la cinética y la reacción cruzada contra el ZIKV se colectaron los sueros de los ratones en las diferentes condiciones experimentales mediante punción cardíaca de ratones bajo anestesia terminal y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Las placas de 96 pozos (E.I.A./R.I.A. immunoplates, Costar 3590) se cubrieron con  $5 \times 10^5$  PFU/pozo de DENV2 completo o con 1 µg/ml de DNP-KLH diluidos en solución amortiguadora de carbonatos ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.015 M  $\text{NaHCO}_3$  0.035 M, pH 9.4) toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Después de 3 lavados con PBS-T, se bloquearon los sitios inespecíficos con Bloqueador Universal (Power Block, BioGenex) y se evaluaron dos diluciones seriadas de los sueros por duplicado durante 2 h a 37°C para evaluar a los Abs tanto en presencia como en ausencia de urea 7M, es decir en dos grupos diferentes. Después de tres lavados, se añadió urea 7M o PBS-T a cada grupo por 10 min a temperatura ambiente. Después de dos lavados con PBS-T, las placas se incubaron con diluciones óptimas de Ab secundario anti-ratón IgG acoplado a peroxidasa de rábano (anti-IgG/HRP, Vector PI-2000-1). La reacción fue revelada con la adición del sustrato ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, Sigma-Aldrich) por 30 min a 37°C.

Para la evaluación de la reacción cruzada, las placas de 96 pozos se recubrieron toda la noche a 4°C con  $2.5 \times 10^5$  PFU de DENV2 o ZIKV completos, o con 3 µg/ml de proteína recombinante RBD de virus SARS-CoV-2 como control negativo. El procedimiento se continuó como se mencionó arriba para evaluar a los Abs IgG en suero, pero sin la adición de urea 7M.

Para la evaluación de ambos procedimientos, se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de placas de ELISA. Las densidades ópticas (DO) fueron graficadas obteniéndose curvas de dilución para cada muestra evaluada. El índice de avidéz/afinidad fue calculado dividiendo el título relativo cuando se añadió la urea entre el título relativo sin el tratamiento de urea (99,100).

### **Ensayo de neutralización viral por citometría de flujo**

Para evaluar la capacidad de neutralización de los Abs generados en el modelo, los sueros de ratones infectados con DENV2 (día 28 p.i.) y de ratones inoculados con DNP-KLH (control negativo) se inactivaron por calor; incubándolos a 56°C por 30 min en baño maría. Se realizaron diluciones seriadas en 50 µl de medio RPMI suplementado con 2% (vol./vol.) de FBS y 1X de

antibióticos. El DENV2 se añadió a una MOI de 2.5 a cada dilución de suero y se incubaron por 1 h a 37°C. Las mezclas de suero-virus fueron usadas para infectar  $2.5 \times 10^4$  células Vero en placas de 96 pozos en un volumen final de 100  $\mu$ l por 2 h en triplicados. Los complejos fueron removidos y se lavaron las placas con PBS 1X para inmediatamente restablecer las placas con medio de cultivo fresco suplementado RPMI y se incubaron las células por 24 h a 37°C. Finalmente, las células fueron tratadas para el marcaje intracelular con el kit BD Cytotfix/Cytoperm para su análisis por citometría de flujo como se mencionó anteriormente. Las células fueron marcadas usando un anticuerpo pan-flavivirus 4G2 (anti-Flavivirus E protein, MAB10216, Sigma-Aldrich) por 30 min seguido por el anticuerpo secundario anti-ratón IgG Cy3 (A10521; Life Technologies) por 30 min. El porcentaje de células infectadas fue determinado mediante citometría de flujo y se definió como el porcentaje de células positivas para 4G2 (101,102).

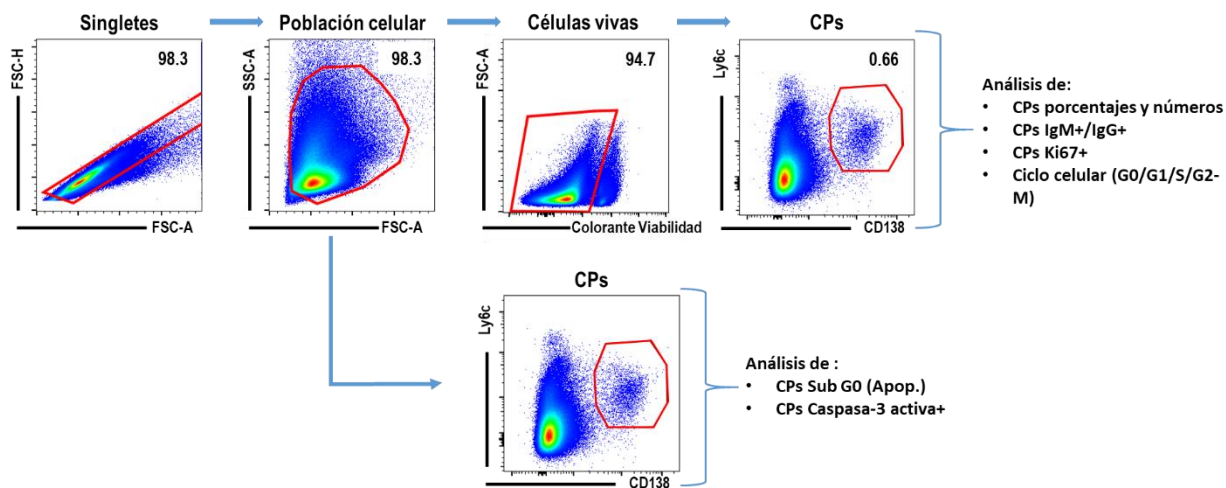
### **Ensayo de neutralización por reducción de placa**

Se cultivaron células Vero en placas de 24 pozos por triplicado hasta alcanzar 80-90% de confluencia. Enseguida se realizaron diluciones seriadas (1:20, 1:40 y 1:80) de suero de ratones al día 28 p.i. con DENV2 o con DNP-KLH (como control negativo) en un volumen de 50  $\mu$ l de medio RPMI con 2% de FBS (vol./vol.) y 1X de antibióticos. Se añadieron 50 PFU de DENV2 en un volumen de 50  $\mu$ l a cada dilución de suero y se incubaron por 1 h a 37°C. Los complejos de suero-virus se usaron para infectar a las células Vero en placas de 24 pozos en un volumen final de 100  $\mu$ l por 2 h en triplicados. Las células fueron cubiertas con DMEM que contenía metilcelulosa y se mantuvieron por 4 días a 37°C. Se removieron las cubiertas con lavados gentiles, se fijaron las placas con metanol al 80%, y se bloquearon las monocapas con leche al 5% en PBS 1X. Después de dos pasos de lavado, se incubaron las placas con el Ab de ratón anti-Flavivirus 4G2 a una dilución 1:2000 por 1 h. Después de dos lavados se incubó el Ab secundario anti-ratón IgG (H+L) acoplado a HRP (G-21040, Invitrogen) 1:2000 y se incubó por 1 h. Para revelar, se lavaron las placas y se añadió el sustrato de peroxidasa True Blue™. Finalmente, se contó el número de placas con ayuda de un microscopio estereoscópico.

### **Análisis estadístico**

Los valores expresados en las diferentes gráficas representan el promedio  $\pm$  el error medio estándar (SEM). La significancia estadística fue calculada usando el software GraphPad Prism

v.8.0.2 (San Diego, CA) empleando análisis de varianza de una vía o de dos vías (ANOVA) según se indique en los pies de figura y se aplicó la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. También se usó la prueba U de Mann-Whitney cuando se comparó a los grupos de DENV vs iDENV en los ensayos de ELISPOT. Los valores de  $P < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

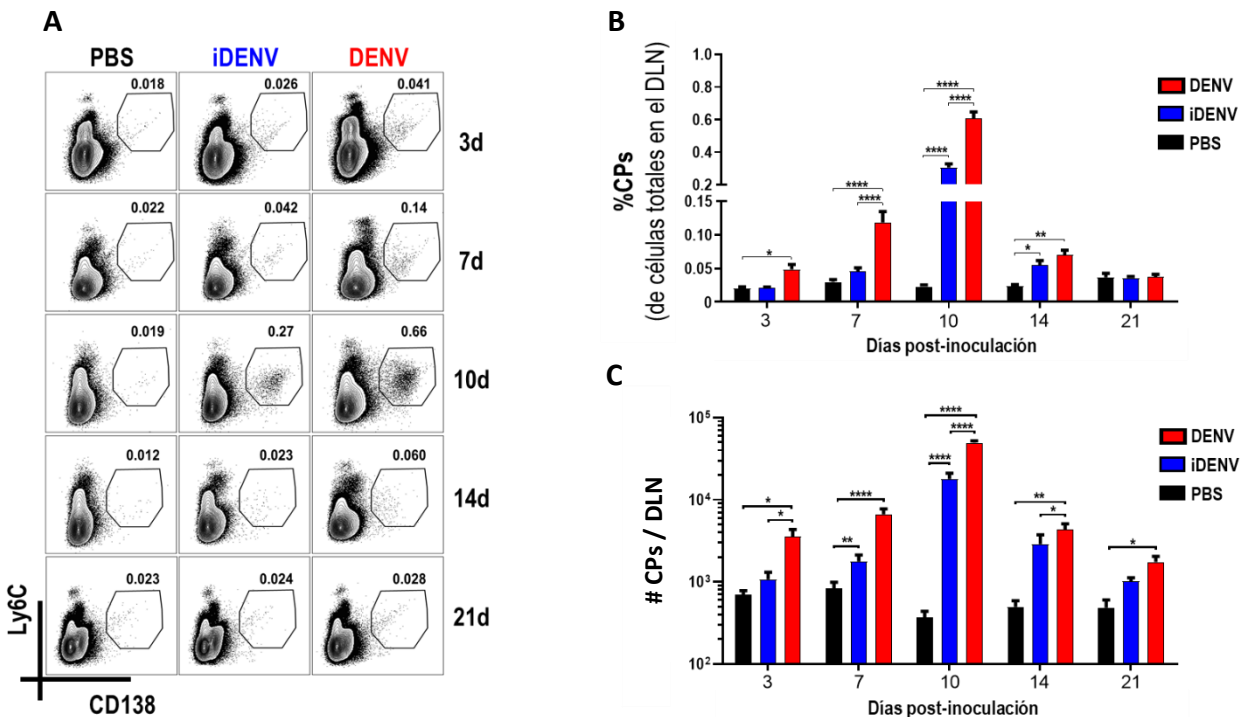


**Figura 2. Estrategia general de análisis de los datos de citometría de flujo para estudiar a la población de células plasmáticas.** Los gráficos de puntos muestran la secuencia usada para identificar a la población de CPs (CD138+Ly6C+) en los ganglios linfáticos drenantes (DLNs) y en el bazo. Para el análisis de apoptosis, las CPs fueron seleccionadas de la población total mientras que para los demás análisis se tomaron las CPs viables usando un colorante fluorescente de viabilidad.

## 6. RESULTADOS

### La inoculación cutánea del DENV induce una respuesta robusta de CPs en los ganglios linfáticos drenantes (DLNs)

Se ha reportado en este modelo que la inoculación cutánea del DENV induce un incremento en el tamaño de los DLNs, y dentro de ellos una respuesta fuerte de linfocitos B con la formación de grandes GCs (94,95). Para evaluar si el DENV desencadena una respuesta de CPs y su magnitud, analizamos los números y porcentajes de CPs de los DLNs mediante una cinética a los días 3, 7, 10, 14 y 21 post-inoculación (Figura 3A). Evaluamos por citometría de flujo a aquellas células positivas para CD138, que está bien reportado como marcador de CPs, concomitante con la molécula Ly6c que se ha reportado en CPs de ratón (80). La infección con DENV desencadenó un incremento significativo en los números y porcentajes de CPs desde el día 3 p.i., con el pico de respuesta al día 10 (~49533 células/DLN) para posteriormente mostrar una disminución significativa y progresiva al día 14 (~4356 células/DLN) (Figura 3B,C). Interesantemente, el DENV inactivado (iDENV), -el cual contiene todos los antígenos virales estructurales, pero es incapaz de infectar y replicarse-, también indujo una respuesta de CPs pero lo hizo de manera retardada y en una magnitud significativamente menor (~17893 células/DLN en el pico de la respuesta) comparado con el virus activo (Figura 3B,C).

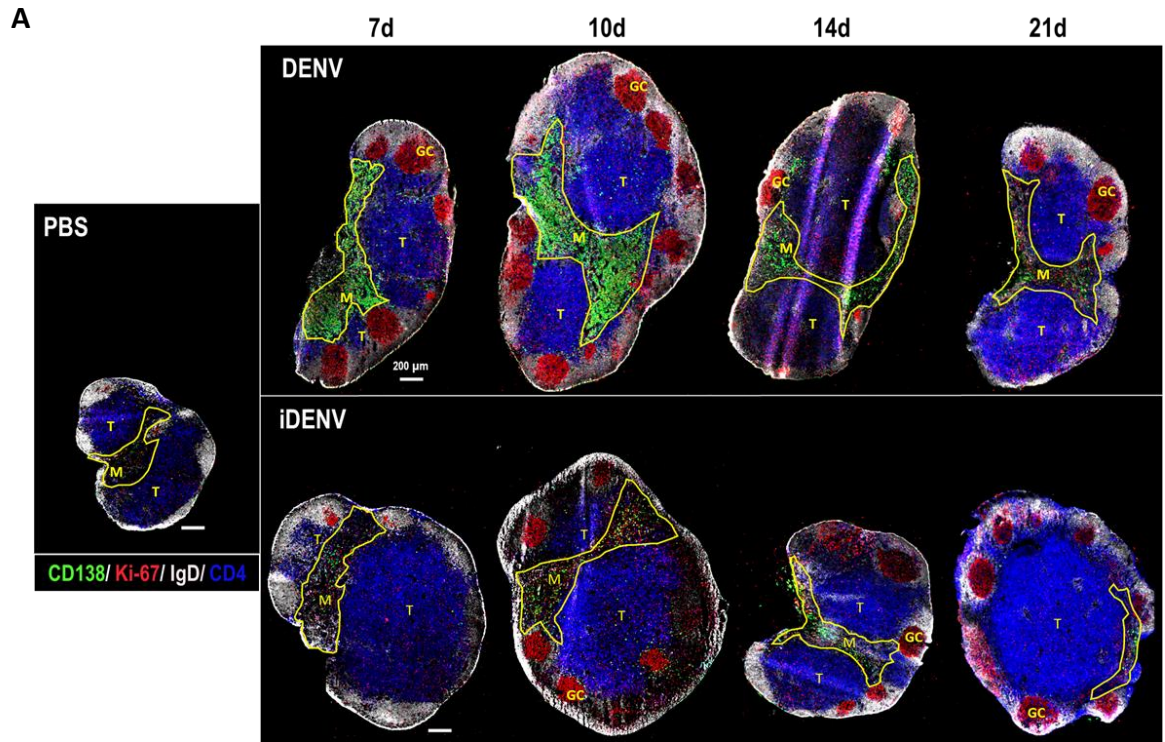


**Figura 3. Cinética de la generación de CPs en los ganglios linfáticos drenantes (DLNs) de ratones inmunocompetentes post-inoculación cutánea con DENV.** (A) Diagramas representativos de citometría durante la cinética mostrando los porcentajes de CPs (CD138+Ly6c+) con las diferentes condiciones. Los valores representan los porcentajes a partir de células vivas. Porcentajes (B) y números absolutos (C) de CPs a los días 3, 7, 10, 14 y 21 p.i.. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de al menos 4 experimentos independientes con dos ratones por grupo y por cada tiempo. Los datos fueron analizados estadísticamente con ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Bonferroni. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, y \*\*\*\*P<0.0001.

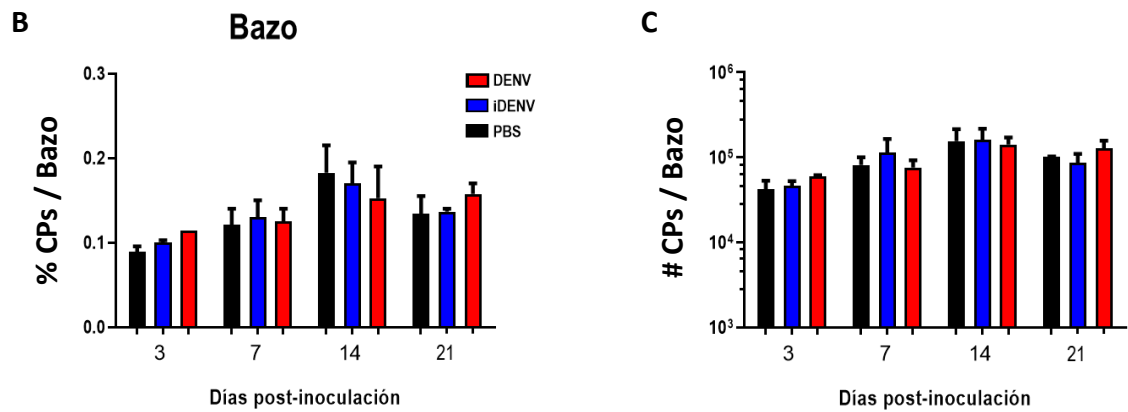
Para evaluar la distribución de las CPs en los DLNs y confirmar los resultados obtenidos por citometría de flujo, evaluamos *in situ* la presencia de las CPs (CD138+) a los días 7, 10, 14 y 21 p.i. mediante criocortes y marcajes por inmunofluorescencia (Figura 4A). Para poder visualizar los diferentes compartimentos de los DLNs, realizamos marcajes con anti-CD4 para identificar la zona de linfocitos T y con anti-IgD y el marcador de proliferación Ki-67 para identificar los folículos de linfocitos B y los GCs, respectivamente. Al día 7 p.i. con DENV, observamos que las CPs CD138+ estaban distribuidas principalmente en la médula de los DLNs. Este patrón de distribución se mantuvo al día 10, sin embargo, al día 14 la presencia de las CPs fue muy escasa confirmando los resultados observados por citometría de flujo. Respecto al grupo inoculado con iDENV, las CPs CD138+ estuvieron también localizadas principalmente en los cordones medulares, pero de nuevo se demostró que la respuesta que se desencadenó es menor comparada con el DENV (Figura 4A).

Para evaluar si se induce una respuesta de CPs en un órgano linfoide secundario de respuesta sistémica, se obtuvo el bazo de los ratones durante la cinética post-inoculación y se realizaron suspensiones celulares para analizar los números y porcentajes de las CPs. No se detectó ningún cambio en ninguno de los tiempos comparando con el grupo control de PBS (Figura 4B).

Estos resultados muestran que la inoculación intradérmica de dosis relativamente bajas de DENV induce una generación robusta y significativa de CPs en los DLNs de ratones inmunocompetentes, pero no en un órgano de respuesta inmunológica sistémica.



**CD138:** Células plasmáticas  
**Ki67:** Proliferación  
**IgD:** LcB vírgenes/Folículos de LcB  
**CD4:** Zona T (LcT CD4+)

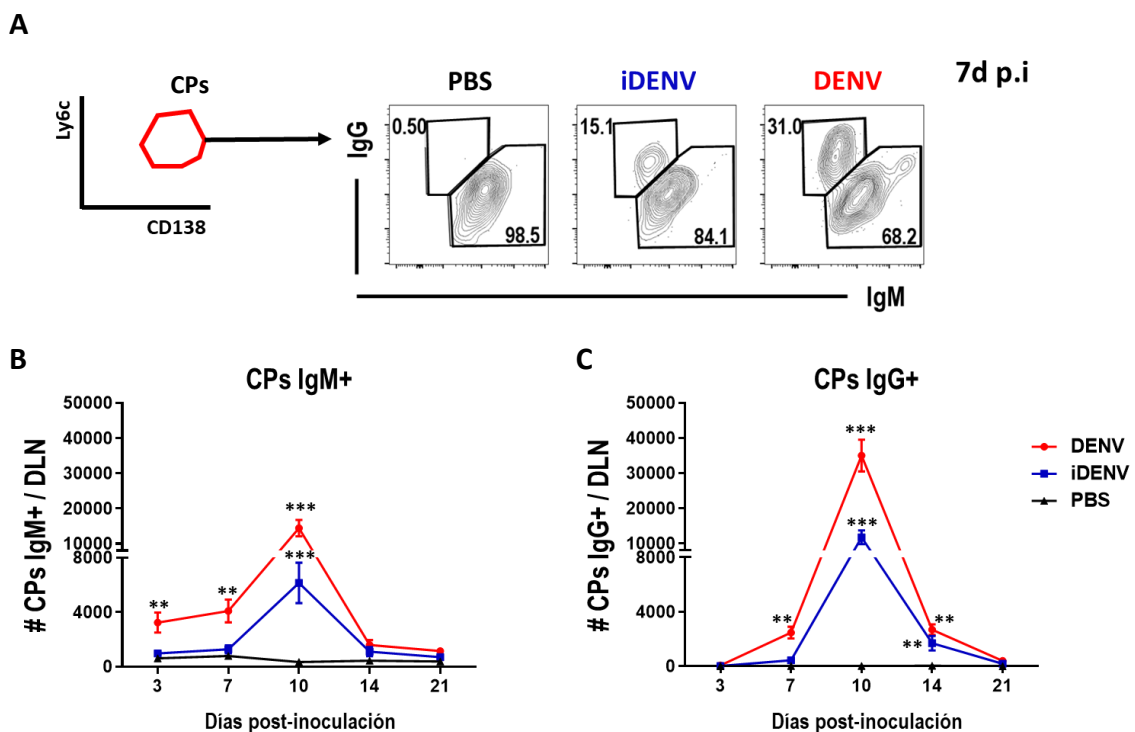


**Figura 4.** Análisis *in situ* de las CPs CD138+ en los ganglios linfáticos drenantes (DLNs) de ratones inmunocompetentes durante la cinética post-inoculación cutánea con DENV. (A) Criocortes de los DLNs marcados con anticuerpos para CD138 (verde), CD4 (azul) para identificar la zona T, IgD (blanco) para resaltar los folículos de linfocitos B y Ki-67 (rojo). Los GCs son Ki-67+ dentro de áreas IgD negativas. La médula está representada con la línea amarilla sólida. El panel superior representa el grupo inoculado con DENV y el inferior con iDENV, mientras que en el extremo izquierdo se muestra un DLN representativo de un ratón control. La barra de escala representa 200  $\mu$ m. Análisis por citometría de flujo del porcentaje (B) y números absolutos (C) de CPs (CD138+Ly6c+) en el bazo de ratones durante la cinética. Los resultados de citometría representan el promedio  $\pm$

SEM de al menos 4 experimentos independientes con dos ratones por grupo y por tiempo y de histología de dos experimentos independientes con 4 ratones por grupo y tiempo.

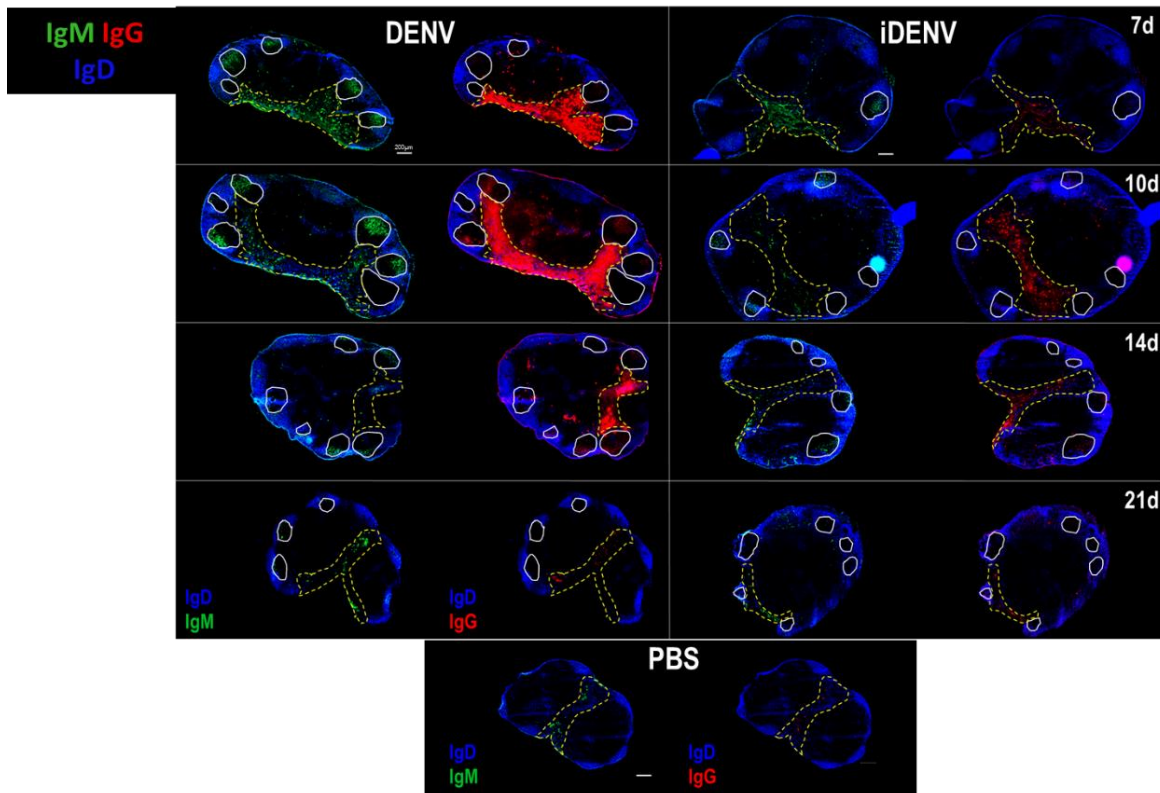
## Las CPs con cambio de clase a IgG dominan la respuesta ante la inoculación cutánea con DENV

Para determinar si las CPs que se están generando en nuestro modelo han hecho cambio de clase de Ab, analizamos la expresión de IgM e IgG en la población de CPs CD138+Ly6C+ en los DLNs por citometría de flujo (Figura 5A). Así, pudimos cuantificar a la poblaciones de CPs IgM+ e IgG+ durante la cinética post-inoculación y encontramos que las CPs IgM+ incrementaron rápidamente desde el día 3 con un pico máximo al día 10 p.i. (Figura 5B). Por otro lado, las CPs IgG+ incrementaron a partir del día 7 p.i. y su pico máximo fue también al día 10, sin embargo, el número de CPs IgG+ dobló al número de CPs IgM+ en el pico de la respuesta (~34983 vs ~14406, # células/DLN) (Figura 5C). El iDENV indujo una cinética con un comportamiento similar al DENV, pero la magnitud de la respuesta fue significativamente menor para ambas clases de Abs (Figura 5B,C). Las CPs IgG+ en el grupo PBS están casi ausentes como se ha reportado previamente en ganglios linfáticos periféricos de ratones en estado basal (103).





D



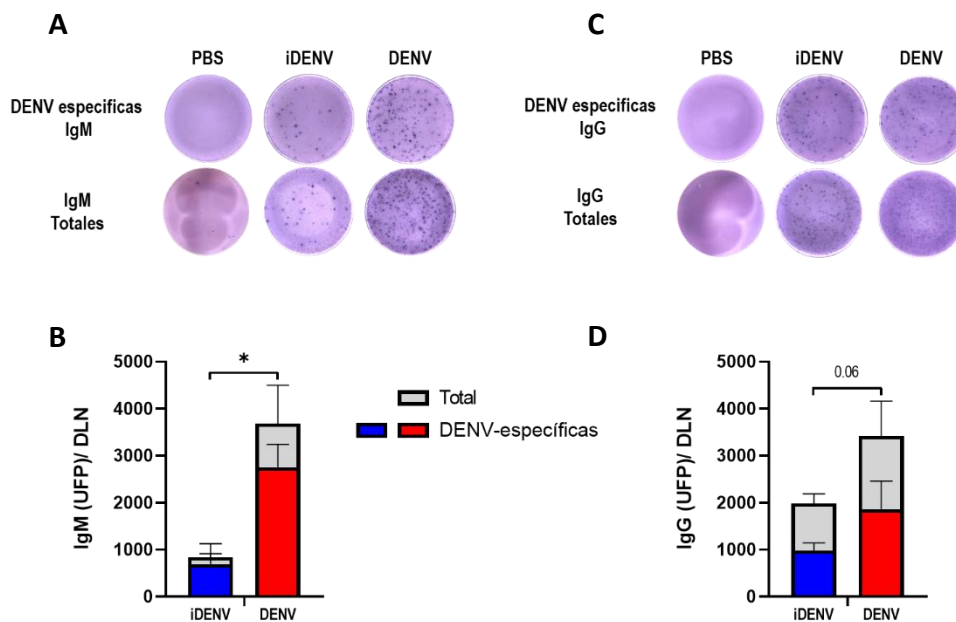
**Figura 5. La respuesta de CPs inducidas por el DENV está dominada por células que han hecho cambio de clase a IgG.** Se analizó a las CPs mediante marcajes intracelulares de Abs IgM e IgG por citometría de flujo a partir de los DLNs durante la cinética. (A) Diagramas de contorno representativos de las CPs (CD138+Ly6c+) IgM vs IgG al día 7 p.i.. Los números representan los porcentajes de CPs IgM o IgG. Números absolutos de CPs IgM+ (B) e IgG+ (C) a los diferentes tiempos post-inoculación. (D) Criocortes de los DLNs de ratones inoculados con DENV (panel izquierdo), iDENV (panel derecho), o PBS (panel inferior) mostrando la distribución de las células que expresan IgM (verde, izquierda) o IgG (rojo, derecha). La zona de los GCs y la médula están indicados con líneas blancas y líneas punteadas amarillas, respectivamente. La barra de escala representa 200  $\mu$ m. Los resultados de citometría representan el promedio  $\pm$  SEM de al menos 4 experimentos independientes con dos ratones por grupo y por tiempo y de histología de dos experimentos independientes con 4 ratones por grupo y tiempo. Los datos fueron analizados estadísticamente con ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Bonferroni. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . Los asteriscos arriba de la línea de DENV (rojo) representan la diferencia estadística vs iDENV, y los asteriscos debajo de la línea de iDENV (azul) representa la diferencia estadística vs el grupo control de PBS.

Para confirmar los resultados obtenidos por citometría de flujo, se evaluó la generación de células IgM<sup>+</sup> e IgG<sup>+</sup> por inmunofluorescencia *in situ* a partir de criocortes de DLNs durante la cinética. En los ratones inoculados con el DENV, se observó la aparición de células IgG<sup>+</sup> al día 7 p.i. ..y una mayor presencia al día 10 (Figura 5D). De nuevo se evidenció la contracción de la respuesta al día 14, la localización de las CPs en los cordones medulares del DLN y una

respuesta de menor magnitud en el grupo inoculado con iDENV (Figura 5D). Estos resultados muestran que la respuesta de CPs a la inoculación cutánea del DENV está dominada por CPs con cambio de clase a IgG (CPs IgG<sup>+</sup>).

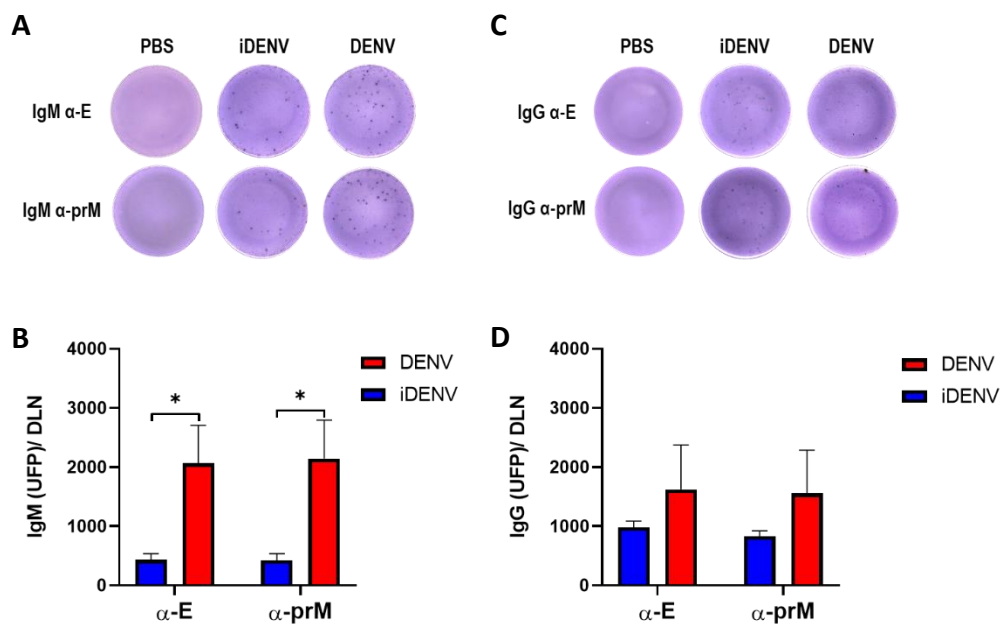
### La respuesta de CPs específicas para las proteínas virales E y prM es similar post-inoculación con DENV

Para confirmar la especificidad de las CPs al DENV en nuestro modelo, llevamos a cabo ensayos de ELISPOT usando al DENV2 como antígeno de captura en las placas y las suspensiones celulares de los DLNs de los diferentes grupos en el pico de la respuesta (10 días p.i.). Este ensayo nos permitió confirmar que el incremento en el número de CPs en el pico de la respuesta se debía a la generación de CPs IgM e IgG específicas para el DENV2 y para las proteínas virales. Interessantemente las respuestas específicas para el DENV, tanto de IgM como IgG, son más potentes contra el virus activo (Figura 6A-D).



**Figura 6. Análisis por ELISPOT de la especificidad de las CPs generadas en el pico de la respuesta.** Se realizaron ensayos de ELISPOT con suspensiones celulares de los DLNs al día 10 p.i. y se sensibilizaron las placas con DENV2 completo. Imágenes representativas de los pozos para la detección de UFPs (Unidades Formadoras de Puntos) IgM totales o DENV-específicas (A) e IgG totales o DENV-específicas (C). Las gráficas muestran los números de UFPs IgM totales o DENV-específicas (B) e IgG totales o DENV-específicas (D) por DLN. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SD de un experimento con 4 ratones por grupo. Los datos fueron analizados con la prueba U de Mann-Whitney. El resultado con diferencia estadísticamente significativa (\*) refiere a las UFP totales y DENV-específicas. \*P<0.05.

El estudio de la generación de Abs tanto neutralizantes y de reacción cruzada es relevante en dengue. Se ha descrito que los Abs con más capacidad neutralizante que se generan en pacientes con dengue están dirigidos a ciertos epítomos en la proteína E principalmente contra el dominio III, mientras que un gran porcentaje de los Abs anti-prM pueden tener un papel relevante en el facilitamiento de la infección (28,29,38,41). Para analizar con más detalle si las CPs que se están generando podrían estar produciendo Abs preferencialmente hacia las proteínas virales E o prM, evaluamos por ELISPOT las respuestas específicas de CPs IgM e IgG en el pico de la respuesta (10d p.i.). Para ello, se obtuvieron suspensiones celulares de los DLNs al día 10 p.i. y las placas de ELISPOT fueron sensibilizadas con las proteínas recombinantes. Encontramos un número muy similar de unidades formadoras de puntos/spots (UFPs) de IgM (Figura 7A,B) e IgG (Figura 7C,D) específicas para ambas proteínas en el grupo inoculado con DENV (IgM: ~2066 vs ~2144; IgG ~1622 vs ~1554, #UFPs anti-E vs anti-prM). Consistente con nuestros resultados anteriores, el iDENV indujo una respuesta de menor magnitud comparado con el DENV. Estos resultados muestran que la inoculación con DENV induce la generación de CPs específicas para el virus e importante no hay una diferencia significativa entre la respuesta específica hacia la proteína E y prM, similar a resultados observados previamente en suero de ratones y en linfocitos B de GC en este modelo (94).



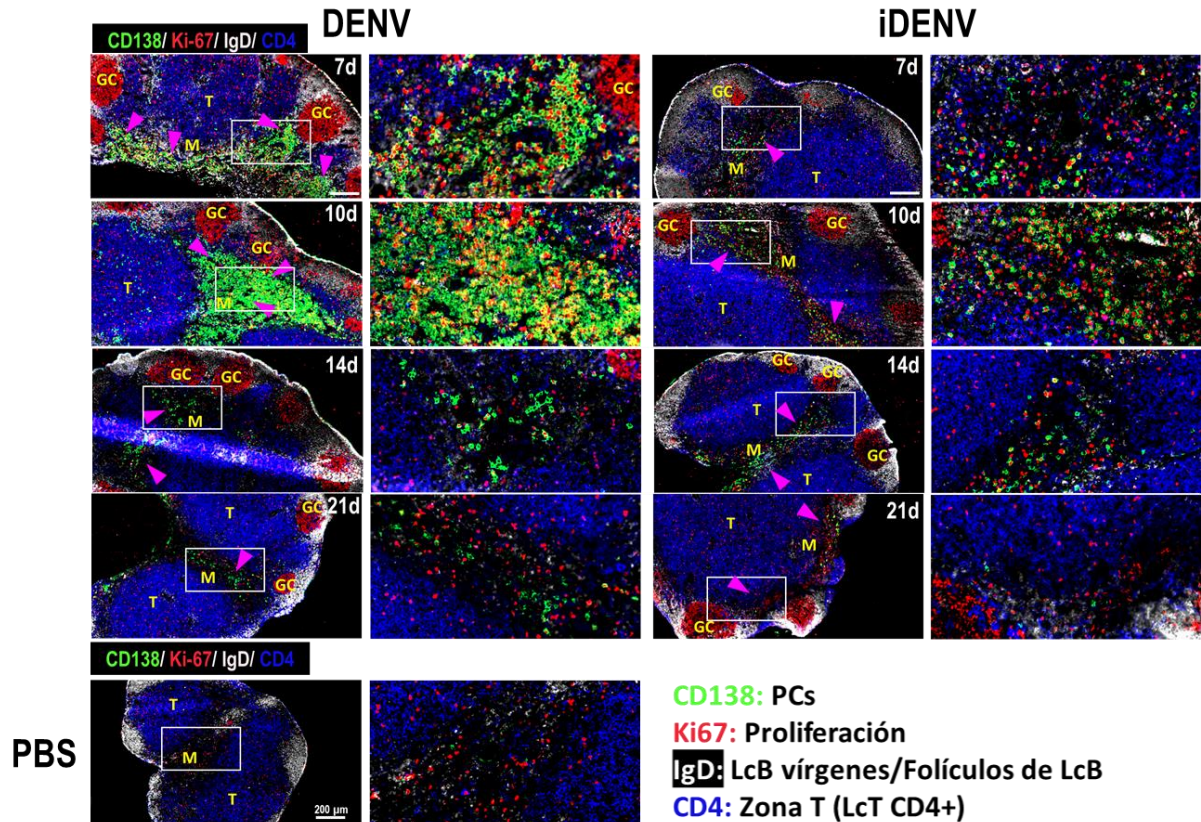
**Figura 7. Análisis de la especificidad de las CPs hacia las proteínas estructurales del DENV E y prM.** Se realizaron ensayos de ELISPOT con suspensiones celulares de los DLNs al día 10 p.i. y se sensibilizaron las placas con proteínas E o prM. Imágenes representativas de los pozos en los que se detectaron las UFPs (Unidades

Formadoras de Puntos) IgM específicas para E o prM (A) e IgG específicas para E o prM (C). Las gráficas muestran los números de UFPs IgM específicas para E o prM (B) e IgG específicas para E o prM (D) por DLN. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SD de un experimento con 4 ratones por grupo. Los datos fueron analizados con la prueba U de Mann-Whitney. \*P<0.05.

### **La localización de las CPs sugiere que derivan de respuestas tanto extrafoliculares como de GCs, y un gran porcentaje prolifera tempranamente durante la infección con DENV**

Durante las respuestas inmunes, la generación de plasmablastos extrafoliculares que han hecho cambio de clase (EFPBs, *extrafollicular plasmablasts*) pueden anteceder a la formación de los GCs (71,72,104,105). En el modelo de infección cutánea con DENV usado en este trabajo, la inducción de grandes y numerosos GCs (respuesta folicular) (94,95) y la aparición de CPs IgG+ (es decir, con cambio de clase) a tiempos más tardíos (Figura 5) sugiere que una gran parte de las CPs IgG+ son derivadas de GCs.

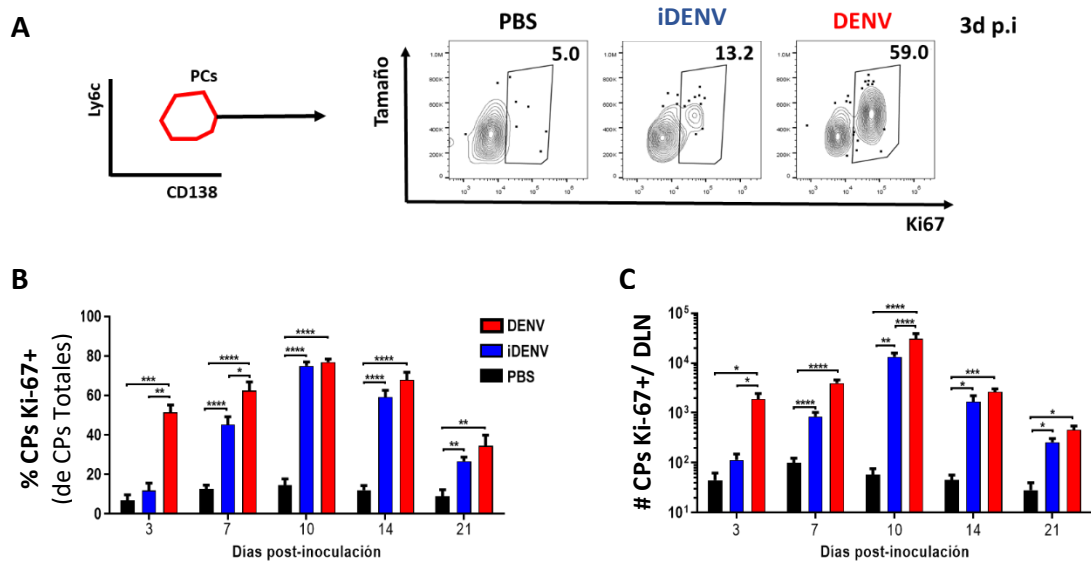
Para analizar con más detalle la distribución de las CPs en nuestro modelo, se tomaron micrografías de los DLNs a mayor aumento donde se observaban a las CPs y su distribución durante la cinética post-inoculación. Se observaron algunos *clusters* o grupos de CPs CD138+ en los cordones medulares desde el día 7 p.i. con DENV sugiriendo una respuesta extrafolicular (Figura 8). Además, también encontramos grupos de CPs adyacentes a los GCs (que son focos de proliferación Ki-67+ rodeados de linfocitos B IgD+) en el área perifolicular hacia la zona de linfocitos T llamada también zona de interfaz GC-T (GTI zone, *Germinal center-T interface zone*) (Figura 8) y este sitio se ha descrito como la zona donde los linfocitos B salen de los GCs y se diferencian a CPs (106). Esta observación fue consistente al día 10 mientras que al día 14 y 21, las CPs remanentes se distribuyeron principalmente en la zona de la médula (Figura 8). En el grupo inoculado con el iDENV, las CPs también se distribuyeron principalmente en la médula y sólo al día 10 p.i. algunas estaban adyacentes a los GCs (Figura 8). Interesantemente, este análisis mostró una frecuencia alta de CPs que expresaban también Ki-67+ (células CD138+ núcleo rojo Ki-67+ en Figura 8) en los grupos inoculados tanto con DENV y también con iDENV por lo que se realizó la cuantificación por citometría de flujo.



**Figura 8. Distribución de las CPs dentro de los DLNs durante la cinética de ratones inoculados por vía cutánea con DENV.** Se realizaron criocortes de los DLNs a los días 7, 10, 14 y 21 p.i. con DENV (panel izquierdo), iDENV (panel derecho) o PBS (Panel inferior). CPs (CD138, verde), Folículos Linfocitos B vírgenes (IgD, blanco), proliferación/GCs (Ki-67, rojo) y zona de linfocitos T (CD4, azul). Los paneles a la derecha de cada grupo corresponden a los rectángulos blancos indicados a la izquierda. La localización principal de las CPs para cada tiempo se indica con las cabezas de flecha moradas. Las micrografías mostradas son representativas de dos experimentos independientes con cuatro ratones por grupo y por tiempo.

Al cuantificar la expresión del marcador de proliferación Ki-67 en la población de CPs durante la cinética, encontramos que a los 3d p.i. en el grupo de ratones inoculados con DENV, más del 50% de las CPs totales fueron también positivos para Ki-67<sup>+</sup> (Figura 9A). Tanto el porcentaje como el número de las CPs Ki-67<sup>+</sup> alcanzaron su pico al día 10 (Figura 9B,C). Las CPs generadas ante la inoculación de iDENV también expresaron Ki-67 pero la respuesta fue retardada y de menor magnitud comparada con el grupo inoculado con DENV (Figura 9B,C). Estos resultados muestran que las CPs proliferan en los DLNs durante la infección con DENV, y algunas de ellas se localizan en el borde GTI sugiriendo un origen folicular (GCs).



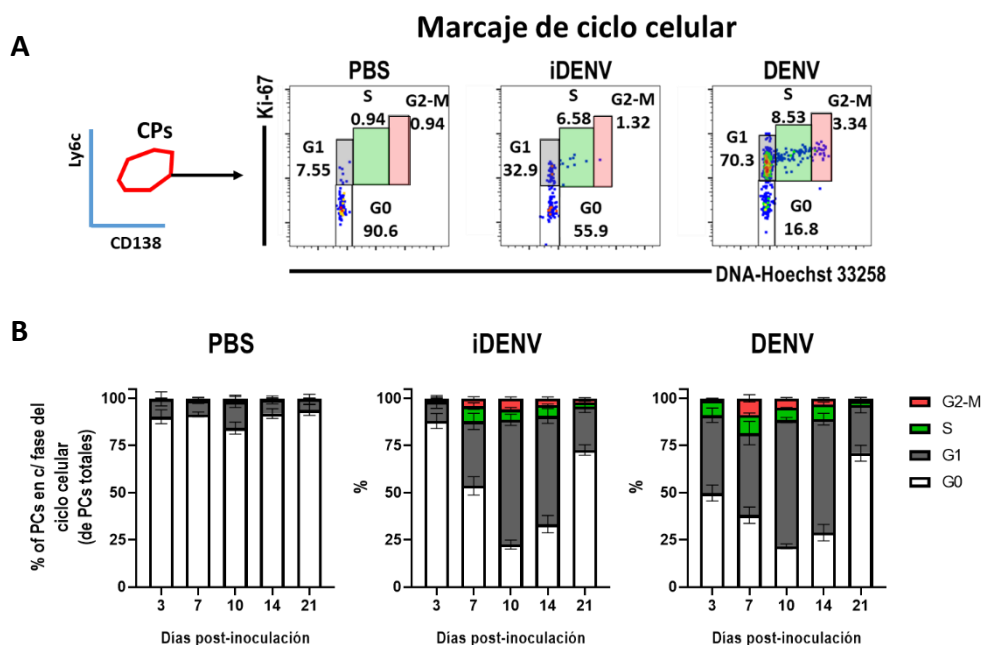


**Figura 9. Cuantificación de CPs proliferantes (Ki-67<sup>+</sup>) durante la cinética de ratones inoculados con DENV.** A partir de suspensiones celulares de los DLNs se realizaron marcajes de membrana e intracelulares para detectar a las CPs Ki67<sup>+</sup>. (A) Diagramas de contorno representativos al día 3 p.i. muestra la inducción de CPs proliferantes ante la inoculación cutánea con el DENV. Porcentajes (B) y números absolutos (C) de las CPs Ki-67<sup>+</sup> en los DLNs durante la cinética. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes con dos ratones por grupo y por tiempo. Los datos fueron analizados estadísticamente con ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Bonferroni. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001.

### Dinámica del ciclo celular en las CPs inducidas por la inoculación cutánea del DENV

Se ha sugerido que la proliferación declina progresivamente una vez que los linfocitos B emergen del GC y que estas células arrestan su ciclo celular en la fase G1 durante su diferenciación a CPs (107), pero no se ha estudiado a detalle la capacidad proliferativa de las CPs recién generadas ante respuestas *in vivo* en curso y aún menos ante antígenos provenientes de agentes infecciosos. Con nuestro modelo de infección cutánea, analizamos la expresión del marcador de proliferación Ki-67 y también analizamos el contenido celular de ADN para identificar todas las fases del ciclo celular y además poder separar a las células en fase G1 de aquellas en fase G0 (quiescentes) (108) (Figura 10A). Al día 3 p.i. con DENV, alrededor de 40% de las CPs totales estaban en fase G1 y ~9% estaban en fase S (Figura 10B). Para el día 7p.i. detectamos CPs en fase G2/M (~10%). Los porcentajes de CPs en fase S y G2/M disminuyeron al día 14 p.i. y regresaron a valores muy similares a los basales al día 21. La entrada de las CPs a la fase G1 y S en el grupo de ratones inmunizados con iDENV fue más tardado (hasta el día 7), y los números de CPs proliferantes (Ki-67<sup>+</sup>) fue significativamente

menor comparado con el grupo inmunizado con DENV durante la cinética (Figura 9C). Estos resultados muestran que las CPs pueden dividirse y expandir en su sitio de generación (DLNs) durante la infección cutánea con DENV.

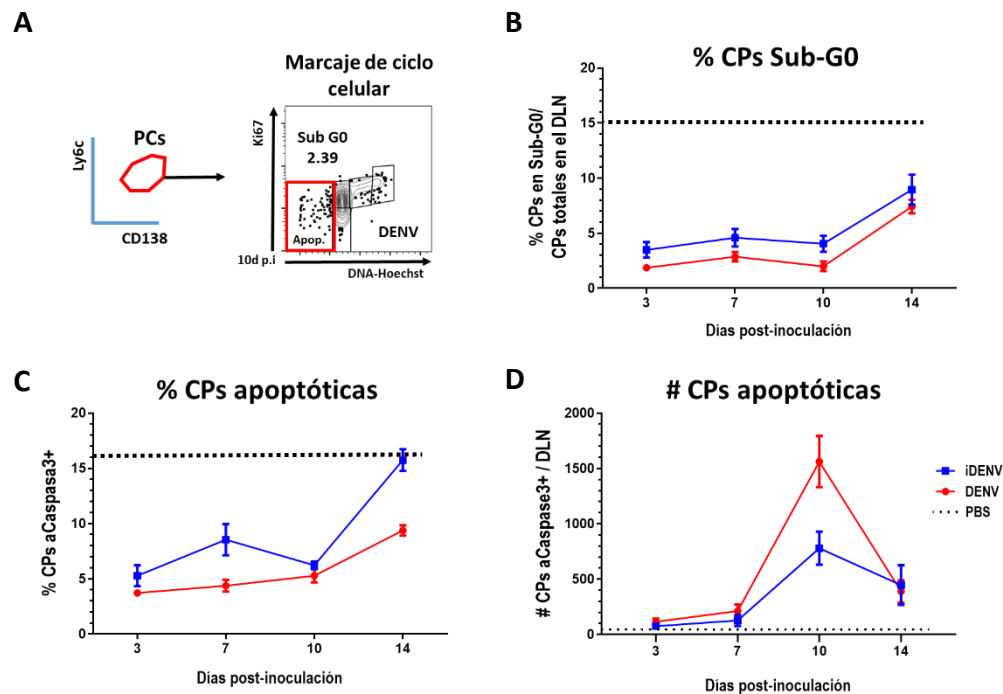


**Figura 10. La infección cutánea con DENV induce una entrada rápida de las CPs en ciclo celular.** A partir de suspensiones celulares de los DLNs se realizaron marcajes de membrana e intranucleares (Ki-67, y Hoechst 33258 para el ADN) para detectar a las CPs en las diferentes fases del ciclo celular. (A) Diagramas representativos de la estrategia de análisis usada para detectar todas las fases del ciclo celular sobre las CPs al día 7 p.i.. (B) Porcentajes de CPs en cada fase del ciclo celular durante la cinética post-inoculación. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes con dos ratones por grupo y por tiempo.

### La disminución en el número de CPs en los DLNs a partir del día 10 p.i en ratones inmunizados con DENV se debe parcialmente a muerte celular por apoptosis

Para determinar si la disminución significativa de las CPs al día 14 está asociada a muerte celular por apoptosis, como primer aproximación analizamos el porcentaje de CPs en la llamada región Sub-G0 en nuestro análisis de ciclo celular, que corresponde a una región hipodiploide compatible con células que están en fase apoptótica (Figura 11A). Observamos un incremento de CPs en esta fase al día 14 p.i. en los grupos inmunizados con DENV e iDENV (Figura 11B). Para confirmar estos resultados, analizamos por citometría de flujo la expresión de Caspasa-3 en su forma activa (aCaspase3) el cual es un mediador crucial de apoptosis. En ambos grupos,

la proporción de CPs aCaspase3+ se mantuvieron sin cambios del día 3 al día 10 p.i. (~5%) e incrementaron al día 14 (~10 y 15%, DENV e iDENV respectivamente) (Figura 11C). Sin embargo, al analizar los números totales de CPs aCaspase3+ por DLN, obtuvimos que el pico de apoptosis para ambos grupos fue al día 10 (Figura 11D) lo que sugiere que este proceso de muerte celular está contribuyendo significativamente a la contracción de la respuesta. Es interesante que en el grupo PBS, además de la baja frecuencia de CPs, la proporción de ellas en proceso de muerte celular siempre fue mayor comparado con los grupos inoculados con iDENV y DENV, aunque no fue mayor en números. Esto podría ser debido a la falta de un ambiente inflamatorio donde se estén generando los factores de sobrevivencia y proliferación para las CPs (65,109,110).

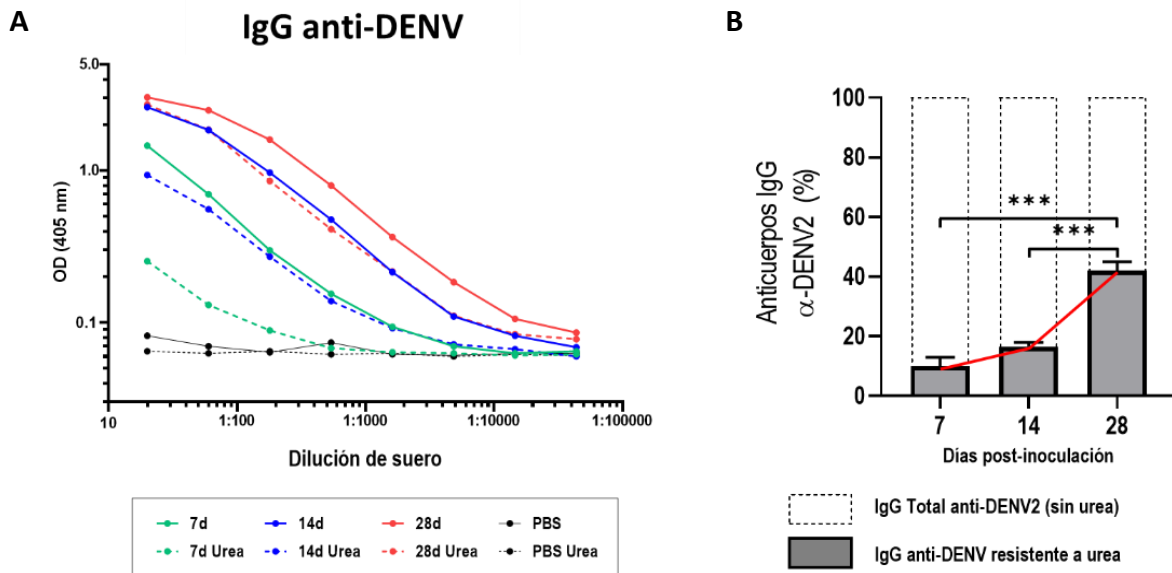


**Figura 11. Evaluación de la muerte celular por apoptosis de las CPs durante la cinética.** A partir de suspensiones celulares de los DLNs se realizaron marcajes de membrana e intranucleares (Ki-67 y Hoechst 33258 o Caspasa-3 activa) para detectar a las CPs en apoptosis. (A) Gráfico representativo de citometría de flujo del análisis de ciclo celular del cuál se seleccionó a la región Sub-G0 (recuadro rojo) para cuantificar a las CPs apoptóticas a partir de su contenido de ADN. (B) Porcentaje de CPs Sub-G0/apoptóticas durante la cinética. (C) Porcentajes y (D) Números absolutos de CPs aCaspase3+ durante la cinética. La línea roja punteada en C y D representan los niveles promedios del grupo PBS. Los datos mostrados representan el promedio  $\pm$  SEM y son representativos de cuatro experimentos independientes con dos ratones por grupo y tiempo.



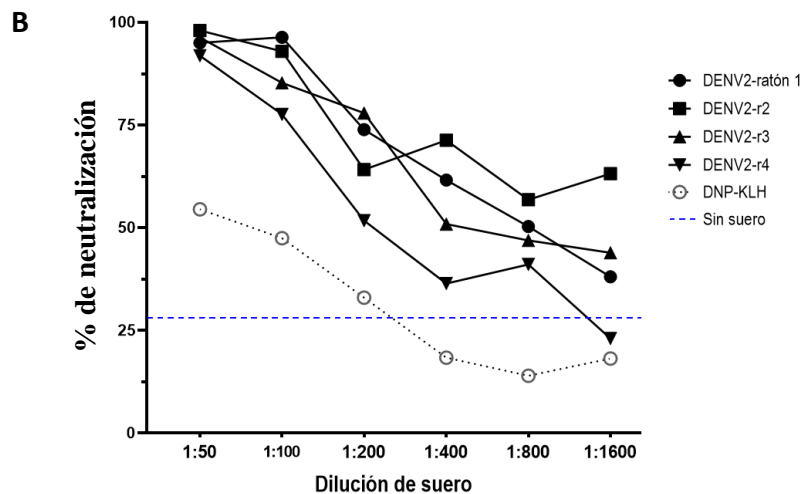
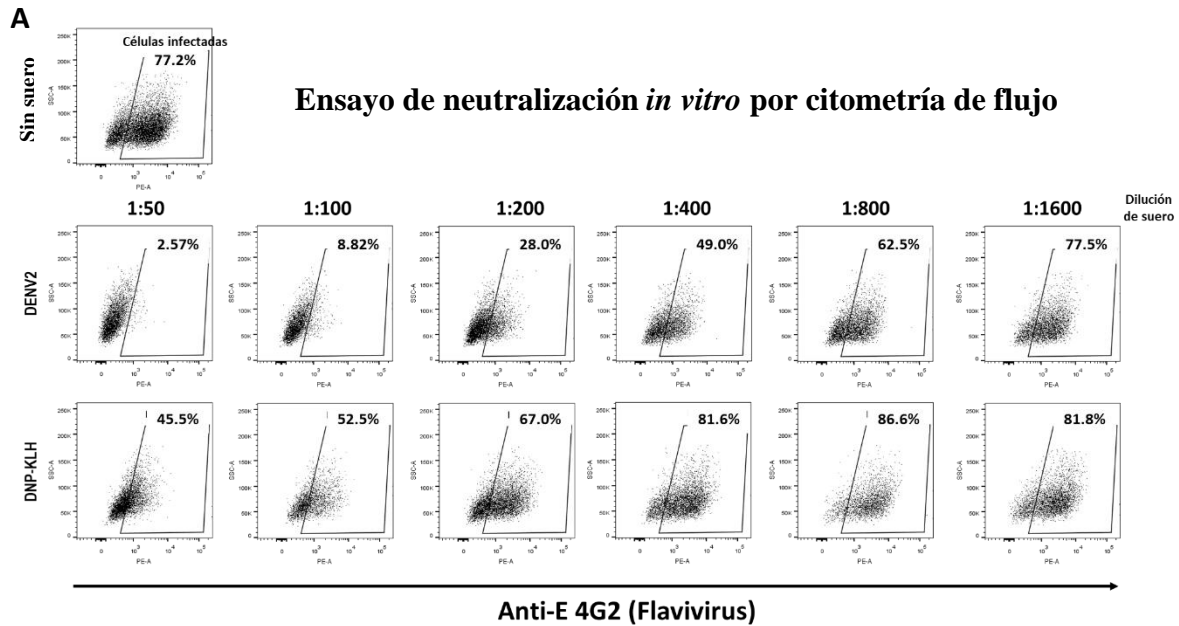
## **La afinidad de los Abs IgG anti-DENV incrementa progresivamente con el tiempo y tienen capacidad neutralizante**

La maduración de la afinidad es un proceso crucial para la producción de Abs de alta afinidad y este proceso toma lugar primordialmente en los GCs durante las respuestas inmunes (58,59,111,112). Para determinar si la inoculación cutánea con DENV induce Abs de alta afinidad en nuestro modelo, se llevaron a cabo ensayos de ELISA de afinidad con los cuales se detectan a los Abs IgG anti-DENV. En este ensayo se hace uso de urea 7M para descartar Abs de baja afinidad del sistema. Este ensayo es usado como prueba de la afinidad y avidéz de los Abs de suero tanto en investigación como en la clínica (99,100,113,114). La unión de los Abs de baja afinidad con el antígeno es interrumpida bajo la actividad caotrópica de la urea mientras que los Abs de más alta afinidad resisten a este efecto y permanecen unidos a su antígeno (control de estandarización de la técnica, Anexo 1). Obtuvimos y analizamos el suero de ratones inoculados con DENV a los días 7, 14 y 28 p.i. para determinar la proporción de Abs IgG anti-DENV de alta afinidad comparando con los Abs IgG anti-DENV totales (es decir, sin tratamiento de urea) y para esto se sensibilizaron las placas de ELISA con el DENV2 completo. En los sueros del día 7 p.i., el tratamiento con urea tuvo un impacto profundo en la unión de los Abs con el DENV2 como se puede observar en la reducción de la DO en la curva de dilución comparado con su contraparte sin urea mientras que este efecto fue menos evidente con el suero de los días 14 y 28 p.i. (Figura 12A). Para cuantificar este fenómeno, se realizó una relación entre los títulos relativos de Abs con y sin tratamiento de urea lo que nos permitió obtener gráficas de porcentajes de Abs de alta afinidad. Al día 7 p.i. solamente ~10% de los Abs IgG anti-DENV2 fueron resistentes a la urea con un ligero incremento al día 14 (~16.5%) mientras que al día 28p.i. el incremento fue significativo (~42%) (Figura 12B). La proporción de los Abs IgG anti-DENV2 resistentes a urea incrementó progresivamente con el tiempo indicando que en nuestro modelo de infección con DENV se están generando CPs productoras de Abs IgG anti-DENV2 y que son alta afinidad.



**Figura 12. La afinidad de los Abs IgG anti-DENV2 incrementa con el tiempo después de la infección cutánea.** Se obtuvieron los sueros de ratones a los días 7, 14 y 28 p.i. con DENV2 y se analizaron por ELISA específicos de Ag en presencia o ausencia de Urea 7 M. (A) Curvas de dilución de una muestra representativa por cada tiempo. Las líneas punteadas representan las muestras con el lavado de Urea 7 M. (B) Gráfica mostrando el porcentaje de Abs IgG anti-DENV2 resistente a urea (alta afinidad, barras grises) a partir de los Abs IgG anti-DENV2 totales (sin urea, barras punteadas). La línea roja continua representa el incremento progresivo en la afinidad de los Abs IgG anti-DENV. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de un experimento con cuatro ratones por tiempo. Los datos se analizaron con ANOVA de una vía seguido de la prueba de Bonferroni. \*\*\* $P < 0.001$ .

Para determinar si los Abs generados durante la infección en nuestro modelo de estudio son neutralizantes, analizamos esta capacidad a partir de diluciones seriadas de sueros de ratones 28d p.i. con DENV2 contra el virus homólogo *in vitro* en células Vero. Se evaluó el porcentaje de neutralización por citometría de flujo y se observó una reducción de la infectividad del DENV2 cercana al 100% con la dilución 1:50 y la capacidad neutralizante disminuyó al ~50% con la dilución de 1:400 (Figura 13A,B). Estos resultados fueron confirmados por ensayos de neutralización por reducción de placas (Anexo 2). Estos ensayos corroboraron que el suero de ratones al día 28 post-inoculación con DENV mostraron los títulos más elevados de Abs-neutralizantes contra infecciones homólogas *in vitro*.



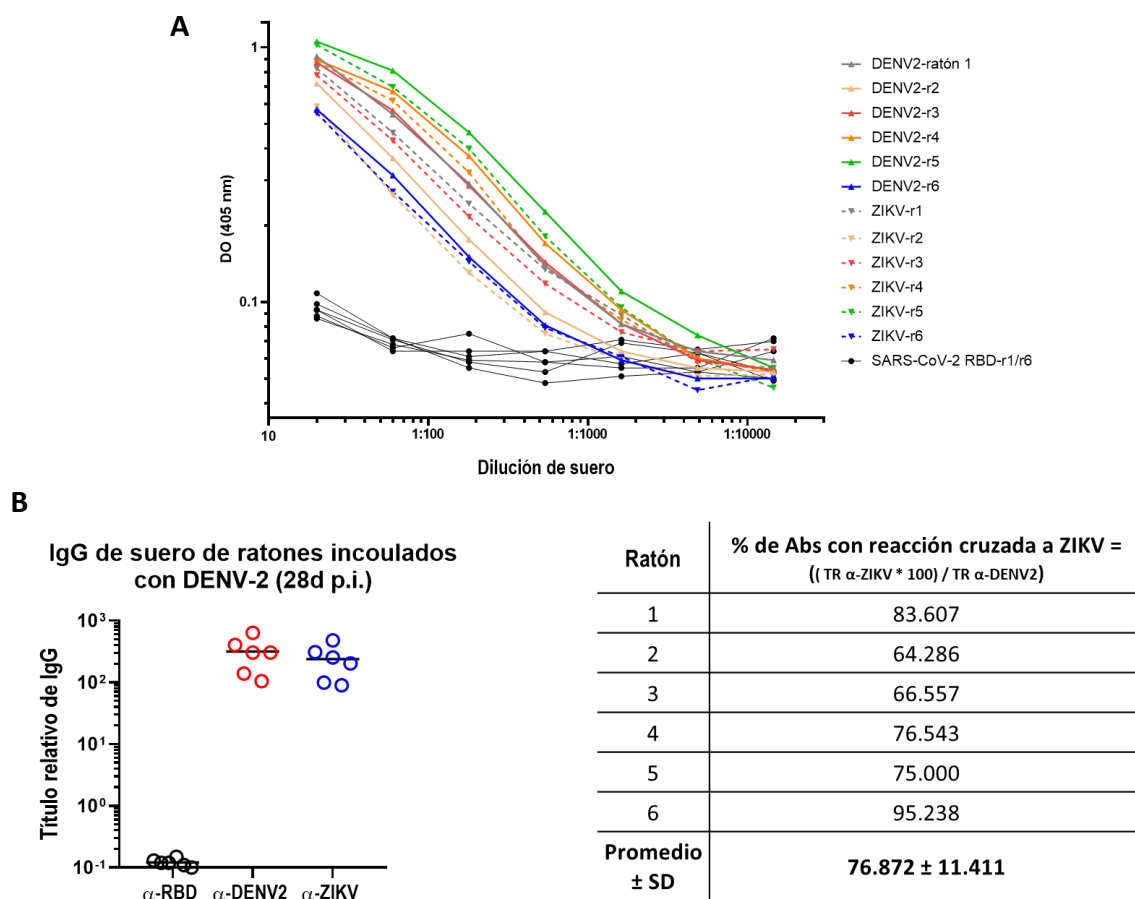
**Figura 13. Los Abs generados durante la infección cutánea con DENV tienen alta capacidad neutralizante.** A partir de sueros de ratones al día 28 p.i. con DENV2, se realizaron ensayos de neutralización *in vitro* sobre células Vero y se detectó el porcentaje de infección mediante citometría de flujo, en (A) se muestran los gráficos de puntos representativos mostrando el efecto de las diluciones seriadas de los sueros en la disminución de la infección. Se utilizó sueros de ratones inoculados con DNP-KLH (28d p.i.) como control negativo

(B) Porcentaje de neutralización del suero obtenido de ratones inoculados con DENV2 (Ratón 1 al 4, r1-r4) o de suero de ratones inoculados con DNP-KLH (línea negra punteada).

### Una gran proporción de los Abs IgG anti-DENV generados en el modelo murino muestran reacción cruzada con ZIKV

Diversos estudios han mostrado que las infecciones con DENV en humanos desencadenan la producción de una amplia gama de Abs con reacción cruzada a serotipos heterólogos e incluso a otros flavivirus que comparten una amplia homología a nivel de secuencia y estructura como el ZIKV (38,102,115–117). Por lo tanto, para determinar si este fenómeno ocurre en nuestro

modelo, llevamos a cabo ensayos de ELISA para detectar anticuerpos IgG anti-ZIKV a partir de suero de ratones inoculados con DENV2 (28d p.i.) y los comparamos con los títulos relativos de Abs anti-DENV2 (Figura 14A). Encontramos títulos relativos altos de Abs IgG anti-ZIKV y el porcentaje de reactividad cruzada fue de alrededor de 75% (Figura 14B). A pesar de la generación de Abs con reacción cruzada, estos Abs fueron específicos para flavivirus ya que no se detectaron Abs IgG contra un antígeno viral no relacionado (RBD recombinantes de SARS-CoV-2) (Figura 14B). Estos resultados muestran que un gran porcentaje de los Abs que se generan en nuestro modelo contra DENV2 también tienen reacción cruzada hacia otros flavivirus como el ZIKV.



**Figura 14. Los Abs IgG generados ante la inoculación cutánea con DENV tienen un porcentaje alto de reacción cruzada con ZIKV.** A partir de sueros de ratones al día 28 p.i. con DENV2, se realizaron ensayos de ELISA para la detección de Abs IgG anti-DENV2 y anti-ZIKV. Las placas fueron sensibilizadas con  $2.5 \times 10^5$  PFU de los virus completos para cada caso o con  $3 \mu\text{g/ml}$  de RBD de SARS-CoV-2 como control de especificidad. (A) Se muestran las curvas de dilución de suero del experimento. (B) Títulos relativos (TR) de IgG específicos para RBD, DENV2 y ZIKV (panel izquierdo) y porcentaje de anticuerpos con reacción cruzada para ZIKV. Los resultados mostrados representan los resultados de dos experimentos independientes con tres ratones (r1-r6) por experimento.

## 7. DISCUSIÓN

Los Abs generados durante las infecciones con DENV tienen un papel importante en la protección del hospedero pero también en la inmunopatología del dengue. La preexistencia de anticuerpos no neutralizantes y de reacción cruzada pueden estar involucrados en el desarrollo de la enfermedad severa durante infecciones secundarias heterólogas a través del incremento de la entrada del virus en aquellas células con receptores de la porción Fc de los Abs, FcγR (8,118,119). Además de esto, se ha reportado un gran número de células secretoras de Abs proliferantes (PBs), llegando a conformar hasta el 30% de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) durante la etapa aguda de infección en pacientes con dengue (81,83,84). Estas dos características de la respuesta inmune a DENV están íntimamente ligadas y revelan un papel importante de los linfocitos B, ya sea de protección o en la patogénesis, que aún no logramos entender a detalle.

Muy pocos estudios han explorado a las CPs (PBs o CPs) en pacientes con dengue, sin embargo, la evidencia hasta ahora demuestra que estas células alcanzan su pico máximo en sangre periférica entre los días 3 y 7 después del inicio de la fiebre y la respuesta declina súbitamente a los 30 días, aunque no se ha estudiado a detalle de esta cinética. Considerando que la fiebre se presenta alrededor de 4 a 10 días después de la transmisión por el vector, las CPs circulantes podrían aparecer entre 1 y 2 semanas después de la entrada del virus por la piel. Para poder desarrollar un estudio detallado de la dinámica de generación de las CPs, en este trabajo usamos un modelo establecido de infección cutánea con DENV en ratones inmunocompetentes (94).

En este trabajo, evaluamos por citometría de flujo e *in situ* los DLNs, donde ocurre la generación de CPs. Se encontró una respuesta robusta de CPs específicas contra DENV y que sólo se llevó a cabo de manera local observándose el pico máximo al día 10 p.i. y con una contracción significativa al día 14. Mediante ensayos de ELISPOT pudimos demostrar que la mayor parte de las CPs en respuesta al DENV son específicas del virus, especialmente de la clase IgM. Sin embargo, una parte sustancial de los Abs IgG que se están generando en el modelo podrían estar dirigidos hacia proteínas no estructurales como la NS1, como está documentado en humanos (34) y que no están presentes cuando las placas son sensibilizadas con el DENV completo.

El análisis histológico mostró que las CPs se distribuyeron sobre la zona de los cordones medulares. Esta distribución se ha demostrado previamente con antígenos modelos (por ejemplo

albúmina), y es el sitio donde las CPs recién generadas reciben señales de sobrevivencia y de migración a través de las DCs medulares, macrófagos y células estromales (109,110,120). La localización que observamos de las CPs en nuestro modelo sugiere que podrían estar iniciando el complejo proceso de migración a otros nichos, posiblemente a la médula ósea (54,64,66,77), pero esto aún necesita investigarse. Además se ha documentado que una parte de los PBs que son de vida corta llevan a cabo apoptosis y son eliminados por macrófagos dentro de los DLN y SLOs (63). En línea con esto, en este estudio se encontró un incremento de PBs/CPs CD138+ llevando a cabo este proceso de muerte celular al día 14p.i. durante la contracción de la respuesta.

Aún no está claro si las CPs que se generan durante la etapa aguda de la infección con DENV en humanos provienen de reacciones extrafoliulares o si son derivadas de GCs. Si bien es generalmente aceptado que las CPs IgG+ son generadas a partir de reacciones foliculares en los GCs, esta idea se ha modificado en los últimos años (55,71,121). En el caso de dengue, dos estudios en pacientes proponen que la respuesta rápida de CPs circulantes provienen de reacciones extrafoliulares. Uno de ellos sugiere la activación y diferenciación de linfocitos B IgG “naturales” y también la activación de clonas de linfocitos B poli-reactivas, es decir que no son necesariamente específicas para DENV (82). El segundo estudio sugiere la activación de linfocitos B vírgenes que hacen cambio de clase a IgG y que se diferencian de manera extrafoliular a través del reconocimiento del DENV mediado por el BCR y TLR7 y que esta respuesta se acompaña en tiempos más tardíos por CPs derivadas de GCs (86). Esto se basa en el hallazgo de tasas bajas de hipermutación somática en los genes de Abs durante la etapa aguda de la infección en humanos. En línea con esto, nuestros resultados mostraron que desde el día 3d p.i. ya existen CPs proliferantes que sugiere no solamente una respuesta extrafoliular sino también una activación policlonal/inespecífica desencadenada por la infección por DENV, como se sugiere en humanos. Esto podría investigarse con más detalle en nuestro modelo. Al día 7 p.i. las CPs IgG+ se distribuyeron principalmente sobre la zona medular, distantes de los folículos lo que sugiere también una generación extrafoliular. Se demostró recientemente por Roco *et al.* que el cambio de clase (CSR) antecede la formación de los GCs (71). Para que el CSR se lleve a cabo se necesita de la actividad de la enzima AID, la cual puede ser inducida por el reconocimiento de RNA viral a través de TLR7 en sinergia con la señalización a través del BCR (75). Nuestros resultados son compatibles con una primer ola de Abs de clase IgM e IgG

producidos a través de la expansión extrafolicular de CPs que han llevado a cabo, o no, cambio de clase. Con estudios más detallados se podría determinar el grado de respuesta extrafolicular comparado con las CPs provenientes de los GCs. Por ejemplo, el bloqueo de la interacción entre CD40 en los linfocitos B y CD40L en los linfocitos T cooperadores con un tratamiento de Abs anti-CD40L bloqueadores podría ayudarnos a evaluar la contribución de los GCs en la generación de CPs en este modelo (122,123).

En nuestro modelo de estudio, la respuesta más temprana parece ser previa a la generación de CPs de GCs como lo sugiere nuestro análisis *in situ* donde encontramos grupos de CPs adyacentes a los GCs en el borde GTI a los días 7 y 10 p.i. (pico de la respuesta). A pesar de que se ha reportado que las CPs salen de los GCs a través del borde GTI ante la respuesta a antígenos modelo como NP-CGG o SRBC (eritrocitos de cordero), hasta donde sabemos, esto no se ha reportado con microorganismos complejos infecciosos como el DENV. Además, importante, la aparición progresiva en suero de Abs de alta afinidad IgG DENV-específicos como lo demostramos por ELISAs de afinidad, apoyan un origen folicular (GCs). Sin embargo, la generación de Abs de alta afinidad podría ser parte también de la diferenciación extrafolicular (85). La medición de la tasa de SHM sobre las CPs en nuestro modelo podría ser de gran utilidad para caracterizar la proporción de respuesta extrafolicular vs la respuesta de GC. En general, la importancia de la replicación viral para potenciar tanto las respuestas de CPs extrafoliculares y foliculares está resaltada en nuestro trabajo por la respuesta baja y generación de CPs cuando el DENV está inactivado y es incapaz de replicarse.

Es importante destacar que encontramos números similares de CPs específicas para las proteínas virales E y prM en el pico de la respuesta, lo cual es consistente con los títulos de Abs para ambas proteínas encontradas en suero previamente en este modelo (94). Una gran parte de los Abs con reacción cruzada que se generan durante infecciones naturales con DENV en humanos están dirigidos a ambas proteínas estructurales. La proteína E es el principal blanco de los anticuerpos neutralizantes. Estudios detallados han mostrado que estos anticuerpos están dirigidos al dominio III (EDIII), o a epítomos cuaternarios cuando los dímeros o trímeros de proteínas E se empaquetan en la superficie del virión y también aquellos dirigidos a la región de “bisagra” entre el EDI y EDII (29,38–40). Sin embargo, también se generan Abs que reconocen regiones inmuno-dominantes y conservadas del DENV como el asa de fusión en el EDII o la proteína prM y que se ha demostrado que tienen poca capacidad neutralizante y a la

vez son capaces de facilitar la infección *in vitro* (29,38,41,43,44). La modulación del DENV sobre la respuesta inmune humoral hacia la proteína prM no ha sido estudiada, pero es posible desde el punto de vista evolutivo ya que otorga una ventaja al virus de incrementar su replicación a través de partículas virales inmaduras no infecciosas. La relevancia de esto ha sido resaltada por la confirmación del fenómeno ADE en la enfermedad severa del dengue en humanos (8). Claramente se necesita elucidar cómo el DENV y otros virus como SARS-CoV-2 inducen una respuesta mixta de CPs, algunas de ellas produciendo anticuerpos facilitadores incrementando la probabilidad de infecciones subsecuentes (124–126). Una limitación en nuestro modelo para evaluar esto podría ser que los ratones inmunocompetentes parecen controlar y/o limitar muy bien la replicación viral y la infección del DENV. Sin embargo, la respuesta inmune y las consecuencias en el ratón después de una infección secundaria heteróloga es algo que aún no se ha estudiado.

Estudios previos en ratones inmunodeficientes de receptores para IFN- $\alpha/\beta$  e IFN- $\gamma$  (cepa AG129) infectados con DENV presentan características clínicas importantes del dengue. Incluso, infecciones secuenciales en este modelo han mostrado una protección a infecciones secundarias letales a través de la generación de Abs con reacción cruzada tanto por la respuesta de linfocitos B de memoria y de CPs de larga vida en el bazo y en la médula ósea (127). Algunas diferencias relevantes con nuestro trabajo es que nosotros usamos ratones inmunocompetentes, infectados con una dosis relativamente baja de DENV a través de la ruta de entrada natural del virus (piel) y la evaluación de los DLNs como el sitio principal de la respuesta. Si bien los ratones no son hospederos naturales ni permisivos a la infección por DENV, la respuesta fuerte de CPs y Abs mostrada en este modelo plantea preguntas importantes que podrían ser estudiadas. Una de ellas es acerca de la respuesta a infecciones secundarias heterólogas. Demostramos que en este modelo se generan Abs con alta capacidad neutralizante *in vitro* para el serotipo homólogo pero también se generaron Abs con reacción cruzada para el ZIKV que comparte homología con el DENV. El posible papel de los Abs anti-DENV con reacción cruzada al ZIKV se ha propuesto en la patogénesis del Zika y sigue aún en estudio en humanos (102,115,116). Sería sumamente interesante evaluar si los ratones en nuestro modelo desarrollan el fenómeno de ADE en infecciones heterólogas. Y también se podría evaluar el impacto de estas infecciones secundarias en la fisiología del ratón (señales de enfermedad).



Finalmente, con este modelo se podrían evaluar los mecanismos detrás de la diferenciación de los linfocitos B de memoria (que son relevantes para las respuestas a infecciones subsecuentes) y analizar la tasa de SHM y las respuestas de linfocitos B a infecciones secundarias heterólogas. Además, debe considerarse que se podrían estudiar las respuestas inmunes detalladas a prospectos vacunales antes de pasar a estudios en primates no humanos o en humanos.

## **8. CONCLUSIÓN**

En conjunto, nuestros resultados muestran una respuesta robusta de CPs a la inoculación cutánea con DENV a dosis bajas en ratones inmunocompetentes sugiriendo un origen extrafolicular y de GCs. Aunque los ratones no muestran señales fisiológicas de la enfermedad, la respuesta fuerte de linfocitos B permitió el estudio de la respuesta humoral en condiciones inmunes no alteradas, durante las fases de inducción y resolución de la infección.

## **9. PERSPECTIVAS**

1. Analizar y caracterizar el número de CPs específicas para el DENV en médula ósea como probable sitio de migración (“homing”) de estas células.
2. Determinar si la maduración de la afinidad de los Abs está favorecida hacia alguna de las proteínas virales (E y prM) o hacia alguna proteína no estructural.
3. Analizar la respuesta de GCs, CPs y Abs en este modelo ante infecciones heterólogas subsecuentes de DENV.
4. Determinar si el DENV actúa como un activador policlonal (generación de PCs no específicos para DENV) en ratones previamente inoculados con un antígeno modelo.

## 10. Referencias

1. World Health Organization. Dengue and severe dengue. (2019)
2. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature* (2013) **496**:504–507. doi:10.1038/nature12060
3. Weaver SC, Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol* (2009) **9**:523–540. doi:10.1016/j.meegid.2009.02.003
4. Halstead SB, Nimmannitya S, Cohen SN. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale J Biol Med* (1970) **42**:311–28. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5419206>
5. Sabin AB. Research on Dengue during World War II 1. *Am J Trop Med Hyg* (1952) **1**:30–50. doi:10.4269/ajtmh.1952.1.30
6. Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S, Salitul V, Phanthumachinda B, Halstead SB. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol* (1984) **120**:653–69. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a113932
7. Halstead SB. Dengue. *Lancet* (2007) **370**:1644–1652. doi:10.1016/S0140-6736(07)61687-0
8. Katzelnick LC, Harris E, Gresh L, Halloran ME, Mercado JC, Balmaseda A, Kuan G, Gordon A. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science (80- )* (2017) **358**:929–932. doi:10.1126/science.aan6836
9. Duangchanda S, Tanaka M, Morita K, Rojanasuphot S, Igarashi A. Comparative nucleotide and deduced amino acid sequence of the envelope glycoprotein gene among three dengue virus type 2 strains isolated from patients with different disease severities in Maha Sarakham, northeast Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* (1994) **25**:243–251. Available at: <http://europepmc.org/abstract/MED/7855635>
10. Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol* (2003) **3**:19–28. doi:10.1016/S1567-1348(03)00004-2
11. Van Der Schaar HM, Rust MJ, Chen, Van Der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Zhuang X, Smit JM. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathog* (2008) **4**: doi:10.1371/journal.ppat.1000244
12. Li L, Lok SM, Yu IM, Zhang Y, Kuhn RJ, Chen J, Rossmann MG. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: Structure and maturation. *Science (80- )* (2008) **319**:1830–1834. doi:10.1126/science.1153263

13. Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and their antigenic structure. *J Clin Virol* (2012) **55**:289–295. doi:10.1016/j.jcv.2012.08.024
14. Urcuqui-Inchima S, Patiño C, Torres S, Haenni AL, Díaz FJ. Recent developments in understanding dengue virus replication. *Adv Virus Res* (2010) **77**:1–39. doi:10.1016/B978-0-12-385034-8.00001-6
15. Bressanelli S, Stiasny K, Allison SL, Stura EA, Duquerroy S, Lescar J, Heinz FX, Rey FA. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO J* (2004) **23**:728–738. doi:10.1038/sj.emboj.7600064
16. Zhang Y, Zhang W, Ogata S, Clements D, Strauss JH, Baker TS, Kuhn RJ, Rossmann MG. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. *Structure* (2004) **12**:1607–1618. doi:10.1016/j.str.2004.06.019
17. Miller S, Kastner S, Krijnse-Locker J, Bühler S, Bartenschlager R. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J Biol Chem* (2007) **282**:8873–8882. doi:10.1074/jbc.M609919200
18. Wilder-Smith A, Ooi EE, Horstick O, Wills B. Dengue. *Lancet* (2019) **393**:350–363. doi:10.1016/S0140-6736(18)32560-1
19. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev S V., Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, et al. Structure of Dengue Virus. *Cell* (2002) **108**:717–725. doi:10.1016/S0092-8674(02)00660-8
20. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Variable Surface Epitopes in the Crystal Structure of Dengue Virus Type 3 Envelope Glycoprotein. *J Virol* (2005) **79**:1223–1231. doi:10.1128/jvi.79.2.1223-1231.2005
21. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the Flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* (2005) **3**:13–22. doi:10.1038/nrmicro1067
22. Messer WB, de Alwis R, Yount BL, Royal SR, Huynh JP, Smith SA, Crowe JE, Doranz BJ, Kahle KM, Pfaff JM, et al. Dengue virus envelope protein domain I/II hinge determines long-lived serotype-specific dengue immunity. *Proc Natl Acad Sci* (2014) **111**:1939–1944. doi:10.1073/pnas.1317350111
23. Yu IM, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG, Chen J. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science (80- )* (2008) **319**:1834–1837. doi:10.1126/science.1153264
24. Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol* (2008) **11**:369–377. doi:10.1016/j.mib.2008.06.004
25. Zheng A, Umashankar M, Kielian M. In Vitro and In vivo studies identify important features of dengue virus pr-E protein interactions. *PLoS Pathog* (2010) **6**: doi:10.1371/journal.ppat.1001157
26. Zybert IA, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Smit JM. Functional importance of dengue virus maturation: Infectious properties of immature virions. *J Gen Virol* (2008)

89:3047–3051. doi:10.1099/vir.0.2008/002535-0

27. Zicari S, Arakelyan A, Fitzgerald W, Zaitseva E, Chernomordik L V., Margolis L, Grivel JC. Evaluation of the maturation of individual Dengue virions with flow virometry. *Virology* (2016) **488**:20–27. doi:10.1016/j.virol.2015.10.021
28. Rodenhuis-Zybert IA, Van Der Schaar HM, Da Silva Voorham JM, Van Der Ende-Metselaar H, Lei HY, Wilschut J, Smit JM. Immature dengue virus: A veiled pathogen? *PLoS Pathog* (2010) **6**: doi:10.1371/journal.ppat.1000718
29. Beltramello M, Williams KL, Simmons CP, MacAgno A, Simonelli L, Quyen NTH, Sukupolvi-Petty S, Navarro-Sanchez E, Young PR, De Silva AM, et al. The human immune response to dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. *Cell Host Microbe* (2010) **8**:271–283. doi:10.1016/j.chom.2010.08.007
30. Imrie A, Meeks J, Gurary A, Sukhbaatar M, Truong TT, Cropp CB, Effler P. Antibody to dengue 1 detected more than 60 years after infection. *Viral Immunol* (2007) **20**:672–675. doi:10.1089/vim.2007.0050
31. Wahala WMPB, de Silva AM. The human antibody response to dengue virus infection. *Viruses* (2011) **3**:2374–2395. doi:10.3390/v3122374
32. Koraka P, Suharti C, Setiati TE, Mairuhu ATA, Van Gorp E, Hach CE, Juffrie M, Sutaryo J, Van Der Meer GM, Groen J, et al. Kinetics of dengue virus-specific serum immunoglobulin classes and subclasses correlate with clinical outcome of infection. *J Clin Microbiol* (2001) **39**:4332–4338. doi:10.1128/JCM.39.12.4332-4338.2001
33. Thein S, Aaskov J, Myint TT, Shwe TN, Saw TT, Zaw A. Changes in levels of anti-dengue virus IgG subclasses in patients with disease of varying severity. *J Med Virol* (1993) **40**:102–106. doi:10.1002/jmv.1890400205
34. Valdes K, Alvarez M, Pupo M, Vazquez S, Rodriguez R, Guzman MG. Human dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. *Clin Diagn Lab Immunol* (2000) **7**:856–857. doi:10.1128/CDLI.7.5.856-857.2000
35. Churdboonchart V, Bhamarapravati N, Peampramprecha S, Sirinavin S. Antibodies against Dengue Viral Proteins in Primary and Secondary Dengue Hemorrhagic Fever. *Am J Trop Med Hyg* **44**:481–493. doi:10.4269/ajtmh.1991.44.481
36. Lazaro-Olán L, Mellado-Sánchez G, García-Cordero J, Escobar-Gutiérrez A, Santos-Argumedo L, Gutiérrez-Castañeda B, Cedillo-Barrón L. Analysis of antibody response in human dengue patients from the Mexican coast using recombinant antigens. *Vector-Borne Zoonotic Dis* (2008) **8**:69–79. doi:10.1089/vbz.2007.0117
37. AbuBakar S, Azmi A, Mohamed-Saad N, Shafee N, Chee HY. Antibody responses of dengue fever patients to dengue 2 (New Guinea C strain) viral proteins. *Malays J Pathol* (1997) **19**:41–51.
38. Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Onsirisakul N, Fitton P, Vasanawathana S, Limpitikul W, Puttikhunt C, Edwards C, Duangchinda T, Supasa S, et al. Cross-Reacting Antibodies

- Enhance Dengue Virus Infection in Humans. *Science* (80- ) (2010) **328**:745–748. doi:10.1126/science.1185181
39. De Alwis R, Smith SA, Olivarez NP, Messer WB, Huynh JP, Wahala WMPB, White LJ, Diamond MS, Baric RS, Crowe JE, et al. Identification of human neutralizing antibodies that bind to complex epitopes on dengue virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2012) **109**:7439–7444. doi:10.1073/pnas.1200566109
  40. Nivarthi UK, Kose N, Sapparapu G, Widman D, Gallichotte E, Pfaff JM, Doranz BJ, Weiskopf D, Sette A, Durbin AP, et al. Mapping the Human Memory B Cell and Serum Neutralizing Antibody Responses to Dengue Virus Serotype 4 Infection and Vaccination. *J Virol* (2017) **91**:1–14. doi:10.1128/JVI.02041-16
  41. Smith SA, Nivarthi UK, de Alwis R, Kose N, Sapparapu G, Bombardi R, Kahle KM, Pfaff JM, Lieberman S, Doranz BJ, et al. Dengue Virus prM-Specific Human Monoclonal Antibodies with Virus Replication-Enhancing Properties Recognize a Single Immunodominant Antigenic Site. *J Virol* (2016) **90**:780–789. doi:10.1128/jvi.01805-15
  42. Smith SA, Zhou Y, Olivarez NP, Broadwater AH, de Silva AM, Crowe JE. Persistence of Circulating Memory B Cell Clones with Potential for Dengue Virus Disease Enhancement for Decades following Infection. *J Virol* (2012) **86**:2665–2675. doi:10.1128/jvi.06335-11
  43. Rodenhuis-Zybert IA, Moesker B, da Silva Voorham JM, van der Ende-Metselaar H, Diamond MS, Wilschut J, Smit JM. A Fusion-Loop Antibody Enhances the Infectious Properties of Immature Flavivirus Particles. *J Virol* (2011) **85**:11800–11808. doi:10.1128/jvi.05237-11
  44. Rouvinski A, Dejnirattisai W, Guardado-Calvo P, Vaney MC, Sharma A, Duquerroy S, Supasa P, Wongwiwat W, Haouz A, Barba-Spaeth G, et al. Covalently linked dengue virus envelope glycoprotein dimers reduce exposure of the immunodominant fusion loop epitope. *Nat Commun* (2017) **8**: doi:10.1038/ncomms15411
  45. de Alwis R, Beltramello M, Messer WB, Sukupolvi-Petty S, Wahala WMPB, Kraus A, Olivarez NP, Pham Q, Brian J, Tsai WY, et al. In-depth analysis of the antibody response of individuals exposed to primary dengue virus infection. *PLoS Negl Trop Dis* (2011) **5**:1–8. doi:10.1371/journal.pntd.0001188
  46. Halstead SB. Neutralization and Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Viruses. *Adv Virus Res* (2003) **60**:421–467. doi:10.1016/S0065-3527(03)60011-4
  47. da Silva Voorham JM, Rodenhuis-Zybert IA, Nuñez NVA, Colpitts TM, van der Ende-Metselaar H, Fikrig E, Diamond MS, Wilschut J, Smit JM. Antibodies against the envelope glycoprotein promote infectivity of immature dengue virus serotype 2. *PLoS One* (2012) **7**:1–10. doi:10.1371/journal.pone.0029957
  48. Aguiar M. Dengue vaccination: a more ethical approach is needed. *Lancet* (2018) **391**:1769–1770. doi:10.1016/S0140-6736(18)30865-1
  49. The Lancet Infectious Diseases. The dengue vaccine dilemma. *Lancet Infect Dis* (2018) **18**:123. doi:10.1016/S1473-3099(18)30023-9

50. WHO WHO. Vacuna contra el dengue. Documento de posición – septiembre de 2018. (2018)80. Available at: [https://www.who.int/immunization/policy/position\\_papers/PP\\_dengue\\_2018\\_SP.pdf?ua=1](https://www.who.int/immunization/policy/position_papers/PP_dengue_2018_SP.pdf?ua=1)
51. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol* (2015) **15**:160–171. doi:10.1038/nri3795
52. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol* (2015) **15**:160–171. doi:10.1038/nri3795
53. Cyster JG, Allen CDC. B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell* (2019) **177**:524–540. doi:10.1016/j.cell.2019.03.016
54. Oracki SA, Walker JA, Hibbs ML, Corcoran LM, Tarlinton DM. Plasma cell development and survival. *Immunol Rev* (2010) **237**:140–159. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00940.x
55. Elsner RA, Shlomchik MJ. Germinal Center and Extrafollicular B Cell Responses in Vaccination, Immunity, and Autoimmunity. *Immunity* (2020) **53**:1136–1150. doi:10.1016/j.immuni.2020.11.006
56. Nieuwenhuis P, Opstelten D. Functional anatomy of germinal centers. *Am J Anat* (1984) **170**:421–435. doi:10.1002/aja.1001700315
57. Gatto D, Brink R. The germinal center reaction. *J Allergy Clin Immunol* (2010) **126**:898–907. doi:10.1016/j.jaci.2010.09.007
58. Tas JMJ, Mesin L, Pasqual G, Targ S, Jacobsen JT, Mano YM, Chen CS, Weill JC, Reynaud CA, Browne EP, et al. Visualizing antibody affinity maturation in germinal centers. *Science (80- )* (2016) **351**:1048–1054. doi:10.1126/science.aad3439
59. MacLennan ICM. Germinal Centers. *Annu Rev Immunol* (1994) **12**:117–139. doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.001001
60. Jacob J, Kelsoe G, Rajewsky K, Weiss U. Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* (1991) **354**:389–392. doi:10.1038/354389a0
61. Yam-Puc JC, Cedillo-Barrón L, Aguilar-Medina EM, Ramos-Payán R, Escobar-Gutiérrez A, Flores-Romo L. The cellular bases of antibody responses during dengue virus infection. *Front Immunol* (2016) **7**:1–12. doi:10.3389/fimmu.2016.00218
62. De Silva NS, Klein U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol* (2015) **15**:137–148. doi:10.1038/nri3804
63. Gray EE, Cyster JG. Lymph node macrophages. *J Innate Immun* (2012) **4**:424–436. doi:10.1159/000337007
64. Sze DMY, Toellner KM, De Vinuesa CG, Taylor DR, MacLennan ICM. Intrinsic constraint on plasmablast growth and extrinsic limits of plasma cell survival. *J Exp Med* (2000) **192**:813–821. doi:10.1084/jem.192.6.813
65. García De Vinuesa C, Gulbranson-Judge A, Khan M, O’Leary P, Cascalho M, Wabl M, Klaus GGB, Owen MJ, MacLennan ICM. Dendritic cells associated with plasmablast



- survival. *Eur J Immunol* (1999) **29**:3712–3721. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199911)29:11<3712::AID-IMMU3712>3.0.CO;2-P
66. Roth K, Oehme L, Zehentmeier S, Zhang Y, Niesner R, Hauser AE. Tracking plasma cell differentiation and survival. *Cytom Part A* (2014) **85**:15–24. doi:10.1002/cyto.a.22355
  67. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* (2000) **102**:553–563. doi:10.1016/S0092-8674(00)00078-7
  68. Luo Z, Ronai D, Scharff MD. The role of activation-induced cytidine deaminase in antibody diversification, immunodeficiency, and B-cell malignancies. *J Allergy Clin Immunol* (2004) **114**:726–735. doi:10.1016/j.jaci.2004.07.049
  69. Honjo T, Muramatsu M, Fagarasan S. Aid: How does it aid antibody diversity? *Immunity* (2004) **20**:659–668. doi:10.1016/j.immuni.2004.05.011
  70. Wagner SD, Neuberger MS. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Annu Rev Immunol* (1996) **14**:441–457. doi:10.1146/annurev.immunol.14.1.441
  71. Roco JA, Mesin L, Binder SC, Nefzger C, Gonzalez-Figueroa P, Canete PF, Ellyard J, Shen Q, Robert PA, Cappello J, et al. Class-Switch Recombination Occurs Infrequently in Germinal Centers. *Immunity* (2019) **51**:337-350.e7. doi:10.1016/j.immuni.2019.07.001
  72. MacLennan ICM, Toellner K-M, Cunningham AF, Serre K, Sze DM-Y, Zuniga E, Cook MC, Vinuesa CG. Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev* (2003) **194**:8–18. doi:10.1034/j.1600-065X.2003.00058.x
  73. Allman D, Wilmore JR, Gaudette BT. The continuing story of T-cell independent antibodies. *Immunol Rev* (2019) **288**:128–135. doi:10.1111/imr.12754
  74. Kearney JF, Patel P, Stefanov EK, King RG. Natural antibody repertoires: Development and functional role in inhibiting allergic airway disease. *Annu Rev Immunol* (2015) **33**:475–504. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120140
  75. Pone EJ, Zhang J, Mai T, White CA, Li G, Sakakura JK, Patel PJ, Al-Qahtani A, Zan H, Xu Z, et al. BCR-signalling synergizes with TLR-signalling for induction of AID and immunoglobulin class-switching through the non-canonical NF-κB pathway. *Nat Commun* (2012) **3**: doi:10.1038/ncomms1769
  76. Yeap LS, Hwang JK, Du Z, Meyers RM, Meng FL, Jakubauskaite A, Liu M, Mani V, Neuberger D, Kepler TB, et al. Sequence-Intrinsic Mechanisms that Target AID Mutational Outcomes on Antibody Genes. *Cell* (2015) **163**:1124–1137. doi:10.1016/j.cell.2015.10.042
  77. Bortnick A, Chernova I, Quinn WJ, Mugnier M, Cancro MP, Allman D. Long-Lived Bone Marrow Plasma Cells Are Induced Early in Response to T Cell-Independent or T Cell-Dependent Antigens. *J Immunol* (2012) **188**:5389–5396. doi:10.4049/jimmunol.1102808
  78. Yates JL, Racine R, McBride KM, Winslow GM. T Cell-Dependent IgM Memory B Cells

- Generated during Bacterial Infection Are Required for IgG Responses to Antigen Challenge. *J Immunol* (2013) **191**:1240–1249. doi:10.4049/jimmunol.1300062
79. Krishnamurthy AT, Thouvenel CD, Portugal S, Keitany GJ, Kim KS, Holder A, Crompton PD, Rawlings DJ, Pepper M. Somatic Hypermutated Plasmodium-Specific IgM+ Memory B Cells Are Rapid, Plastic, Early Responders upon Malaria Rechallenge. *Immunity* (2016) **45**:402–414. doi:10.1016/j.immuni.2016.06.014
80. Tellier J, Nutt SL. Standing out from the crowd: How to identify plasma cells. *Eur J Immunol* (2017) **47**:1276–1279. doi:10.1002/eji.201747168
81. Wrammert J, Akondy RS, Perng GC, Chandele A, Kwissa M, Pulendran B, Ahmed R, Onlamoon N, Polsrila K, Pattanapanyasat K, et al. Rapid and massive virus-specific plasmablast responses during acute Dengue virus infection in humans. *J Virol* (2012) **86**:2911–2918. doi:10.1128/JVI.06075-11
82. Balakrishnan T, Bela-Ong DB, Toh YX, Flamand M, Devi S, Koh MB, Hibberd ML, Ooi EE, Low JG, Leo YS, et al. Dengue virus activates polyreactive, natural IgG B cells after primary and secondary infection. *PLoS One* (2011) **6**: doi:10.1371/journal.pone.0029430
83. Gawoski JM, Ooi WW, J.M G, W.W O, Gawoski JM, Ooi WW. Dengue fever mimicking plasma cell leukemia. *Arch Pathol Lab Med* (2003) **127**:1026–7. doi:10.1043/1543-2165(2003)127<1026:DFMPCL>2.0.CO;2
84. Thai KTDTD, Wismeijer JAA, Zumpolle C, de Jong MDD, Kersten MJJ, de Vries PJJ. High incidence of peripheral blood plasmacytosis in patients with dengue virus infection. *Clin Microbiol Infect* (2011) **17**:1823–1828. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03434.x
85. Paus D, Tri GP, Chan TD, Gardam S, Basten A, Brink R. Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J Exp Med* (2006) **203**:1081–1091. doi:10.1084/jem.20060087
86. Godoy-Lozano EE, Téllez-Sosa J, Sánchez-González G, Sámano-Sánchez H, Aguilar-Salgado A, Salinas-Rodríguez A, Cortina-Ceballos B, Vivanco-Cid H, Hernández-Flores K, Pfaff JM, et al. Lower IgG somatic hypermutation rates during acute dengue virus infection is compatible with a germinal center-independent B cell response. *Genome Med* (2016) **8**:1–19. doi:10.1186/s13073-016-0276-1
87. Zompi S, Harris E. Animal Models of Dengue Virus Infection. *Viruses* (2012) **4**:62–82. doi:10.3390/v4010062
88. Johnson AJ, Roehrig JT. New Mouse Model for Dengue Virus Vaccine Testing. *J Virol* (1999) **73**:783–786. doi:10.1128/jvi.73.1.783-786.1999
89. Yauch LE, Shresta S. Mouse models of dengue virus infection and disease. (2008) **80**:87–93. doi:10.1016/j.antiviral.2008.06.010
90. Boonpucknavig S, Vuttiviroj O, Boonpucknavig V. Infection of young adult mice with dengue virus type 2. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1981) **75**:647–653. doi:10.1016/0035-9203(81)90142-5
91. Huang KJ, Li SYJ, Chen SC, Liu HS, Lin YS, Yeh TM, Liu CC, Lei HY. Manifestation of

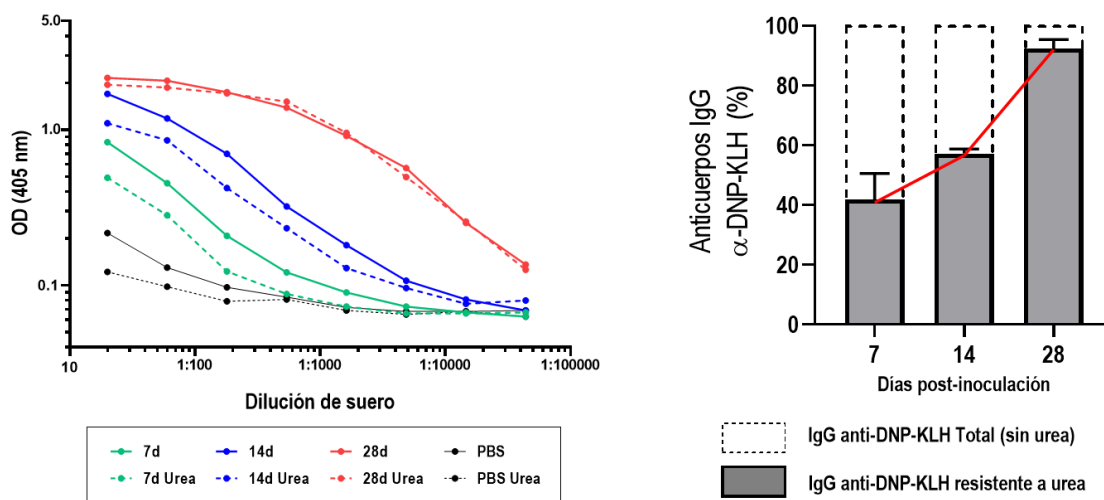
- thrombocytopenia in dengue-2-virus-infected mice. *J Gen Virol* (2000) **81**:2177–2182. doi:10.1099/0022-1317-81-9-2177
92. Paes M V., Pinhão AT, Barreto DF, Costa SM, Oliveira MP, Nogueira AC, Takiya CM, Farias-Filho JC, Schatzmayr HG, Alves AMB, et al. Liver injury and viremia in mice infected with dengue-2 virus. *Virology* (2005) **338**:236–246. doi:10.1016/j.virol.2005.04.042
  93. Raut CG, Deolankar RP, Kolhapure RM, Goverdhan MK. Susceptibility of laboratory-bred rodents to the experimental infection with dengue virus type 2. *Acta Virol* (1996) **40**:143–146.
  94. Yam-Puc JC, García-Cordero J, Calderón-Amador J, Donis-Maturano L, Cedillo-Barrón L, Flores-Romo L. Germinal center reaction following cutaneous dengue virus infection in immune-competent mice. *Front Immunol* (2015) **6**:1–9. doi:10.3389/fimmu.2015.00188
  95. Marcial-Juárez E, García-Cordero J, Maqueda-Alfaro RA, Saucedo-López RE, Sánchez-Torres LE, Cedillo-Barrón L, Flores-Romo L. Cutaneous Dengue Virus Inoculation Triggers Strong B Cell Reactions but Contrastingly Poor T Cell Responses. *Virol Sin* (2020) **12250**: doi:10.1007/s12250-020-00213-6
  96. Russell PK, Nisalak A. Dengue Virus Identification by the Plaque Reduction Neutralization Test. *J Immunol* (1967) **99**:291 LP – 296. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/99/2/291.abstract>
  97. Mellado-Sánchez G, García-Machorro J, Sandoval-Montes C, Gutiérrez-Castañeda B, Rojo-Domínguez A, García-Cordero J, Santos-Argumedo L, Cedillo-Barrón L. A plasmid encoding parts of the dengue virus E and NS1 proteins induces an immune response in a mouse model. *Arch Virol* (2010) **155**:847–856. doi:10.1007/s00705-010-0652-x
  98. Katrak K, Mahon BP, Jones WC, Bräutigam S, Mills KHG. Preparative separation of foreign antigens for highly efficient presentation to T cells in vitro. *J Immunol Methods* (1992) **156**:247–254. doi:10.1016/0022-1759(92)90032-O
  99. Puschnik A, Lau L, Cromwell EA, Balmaseda A, Zompi S, Harris E. Correlation between Dengue-Specific Neutralizing Antibodies and Serum Avidity in Primary and Secondary Dengue Virus 3 Natural Infections in Humans. *PLoS Negl Trop Dis* (2013) **7**:1–8. doi:10.1371/journal.pntd.0002274
  100. Tsai WY, Youn HH, Tyson J, Brites C, Tsai JJ, Pedroso C, Drexler JF, Balmaseda A, Harris E, Wang WK. Use of urea wash ELISA to distinguish zika and dengue virus infections. *Emerg Infect Dis* (2018) **24**:1355–1359. doi:10.3201/eid2407.1711170
  101. Konishi E, Tabuchi Y, Yamanaka A. A simple assay system for infection-enhancing and -neutralizing antibodies to dengue type 2 virus using layers of semi-adherent K562 cells. *J Virol Methods* (2010) **163**:360–367. doi:10.1016/j.jviromet.2009.10.026
  102. Montecillo-Aguado MR, Montes-Gómez AE, García-Cordero J, Corzo-Gómez J, Vivanco-Cid H, Mellado-Sánchez G, Muñoz-Medina JE, Gutiérrez-Castañeda B, Santos-Argumedo L, González-Bonilla C, et al. Cross-reaction, enhancement, and neutralization activity of

- dengue virus antibodies against zika virus: A study in the mexican population. *J Immunol Res* (2019) **2019**: doi:10.1155/2019/7239347
103. Pabst O, Peters T, Czeloth N, Bernhardt G, Scharffetter-Kochanek K, Förster R. Cutting Edge: Egress of Newly Generated Plasma Cells from Peripheral Lymph Nodes Depends on  $\beta$  2 Integrin . *J Immunol* (2005) **174**:7492–7495. doi:10.4049/jimmunol.174.12.7492
  104. 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) **197**:1677–1687. doi:10.1084/jem.20012065
  105. Toellner KM, Gulbranson-Judge A, Taylor DR, Sze DMY, MacLennan ICM. Immunoglobulin switch transcript production in vivo related to the site and time of antigen-specific B cell activation. *J Exp Med* (1996) **183**:2303–2312. doi:10.1084/jem.183.5.2303
  106. Zhang Y, Tech L, George LA, Acs A, Durrett RE, Hess H, Walker LSK, Tarlinton DM, Fletcher AL, Hauser AE, et al. Plasma cell output from germinal centers is regulated by signals from Tfh and stromal cells. *J Exp Med* (2018) **215**:1227–1243. doi:10.1084/jem.20160832
  107. Chen-Kiang S. Cell-cycle control of plasma cell differentiation and tumorigenesis. *Immunol Rev* (2003) **194**:39–47. doi:10.1034/j.1600-065X.2003.00065.x
  108. Kim KH, Sederstrom JM. Assaying cell cycle status using flow cytometry. *Curr Protoc Mol Biol* (2015) **2015**:28.6.1-28.6.11. doi:10.1002/0471142727.mb2806s111
  109. Mohr E, Serre K, Manz RA, Cunningham AF, Khan M, Hardie DL, Bird R, MacLennan ICM. Dendritic Cells and Monocyte/Macrophages That Create the IL-6/APRIL-Rich Lymph Node Microenvironments Where Plasmablasts Mature. *J Immunol* (2009) **182**:2113–2123. doi:10.4049/jimmunol.0802771
  110. Huang HY, Rivas-Caicedo A, Renevey F, Cannelle H, Peranzoni E, Scarpellino L, Hardie DL, Pommier A, Schaeuble K, Favre S, et al. Identification of a new subset of lymph node stromal cells involved in regulating plasma cell homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2018) **115**:E6826–E6835. doi:10.1073/pnas.1712628115
  111. Zhang Y, Meyer-Hermann M, George LA, Figge MT, Khan M, Goodall M, Young SP, Reynolds A, Falciani F, Waisman A, et al. Germinal center B cells govern their own fate via antibody feedback. *J Exp Med* (2013) **210**:457–464. doi:10.1084/jem.20120150
  112. Eisen HN. Affinity enhancement of antibodies: how low-affinity antibodies produced early in immune responses are followed by high-affinity antibodies later and in memory B-cell responses. *Cancer Immunol Res* (2014) **2**:381–392. doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0029
  113. Burton BR, Tennant RK, Love J, Titball RW, Wraith DC, White HN. Variant proteins stimulate more IgM+ GC B-cells revealing a mechanism of cross-reactive recognition by antibody memory. *Elife* (2018) **7**:1–14. doi:10.7554/eLife.26832

114. Wong-Baeza C, Reséndiz-Mora A, Donis-Maturano L, Wong-Baeza I, Zárata-Neira L, Yam-Puc JC, Calderón-Amador J, Medina Y, Wong C, Baeza I, et al. Anti-lipid IgG antibodies are produced via germinal centers in a murine model resembling human lupus. *Front Immunol* (2016) **7**:1–13. doi:10.3389/fimmu.2016.00396
115. Langerak T, Mumtaz N, Tolk VI, van Gorp ECM, Martina BE, Rockx B, Koopmans MPG. The possible role of cross-reactive dengue virus antibodies in Zika virus pathogenesis. *PLOS Pathog* (2019) **15**:e1007640. doi:10.1371/journal.ppat.1007640
116. Zimmerman MG, Wrammert J, Suthar MS. Cross-Reactive Antibodies during Zika Virus Infection: Protection, Pathogenesis, and Placental Seeding. *Cell Host Microbe* (2020) **27**:14–24. doi:10.1016/j.chom.2019.12.003
117. Cedillo-Barrón L, García-Cordero J, Bustos-Arriaga J, León-Juárez M, Gutiérrez-Castañeda B. Antibody response to dengue virus. *Microbes Infect* (2014) **16**:711–720. doi:10.1016/j.micinf.2014.07.011
118. Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: An historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol* (2013) **158**:1445–1459. doi:10.1007/s00705-013-1645-3
119. Garcia-Bates TM, Cordeiro MT, Nascimento EJM, Smith AP, Soares de Melo KM, McBurney SP, Evans JD, Marques ETA, Barratt-Boyes SM. Association between Magnitude of the Virus-Specific Plasmablast Response and Disease Severity in Dengue Patients. *J Immunol* (2013) **190**:80–87. doi:10.4049/jimmunol.1103350
120. Fooksman DR, Schwickert TA, Victora GD, Dustin ML, Nussenzweig MC, Skokos D. Development and migration of plasma cells in the mouse lymph node. *Immunity* (2010) **33**:118–127. doi:10.1016/j.immuni.2010.06.015
121. Cunningham AF, Gaspal F, Serre K, Mohr E, Henderson IR, Scott-Tucker A, Kenny SM, Khan M, Toellner K-M, Lane PJJ, et al. Salmonella Induces a Switched Antibody Response without Germinal Centers That Impedes the Extracellular Spread of Infection. *J Immunol* (2007) **178**:6200–6207. doi:https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.10.6200
122. Han S, Hathcock K, Zheng B, Kepler TB, Hodes R, Kelsoe G. Cellular interaction in germinal centers. Roles of CD40 ligand and B7-2 in established germinal centers. *J Immunol* (1995) **155**:556 LP – 567. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/155/2/556.abstract>
123. Takahashi Y, Dutta PR, Cerasoli DM, Kelsoe G. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3- nitrophenyl)acetyl. v. affinity maturation develops in two stages of clonal selection. *J Exp Med* (1998) **187**:885–895. doi:10.1084/jem.187.6.885
124. Wang J, Zand MS. The Potential for Antibody-Dependent Enhancement of SARS-CoV-2 Infection: Translational Implications for Vaccine Development. *J Clin Transl Sci* (2020)1–11. doi:10.1017/cts.2020.39
125. Negro F. Is antibody-dependent enhancement playing a role in COVID-19 pathogenesis?

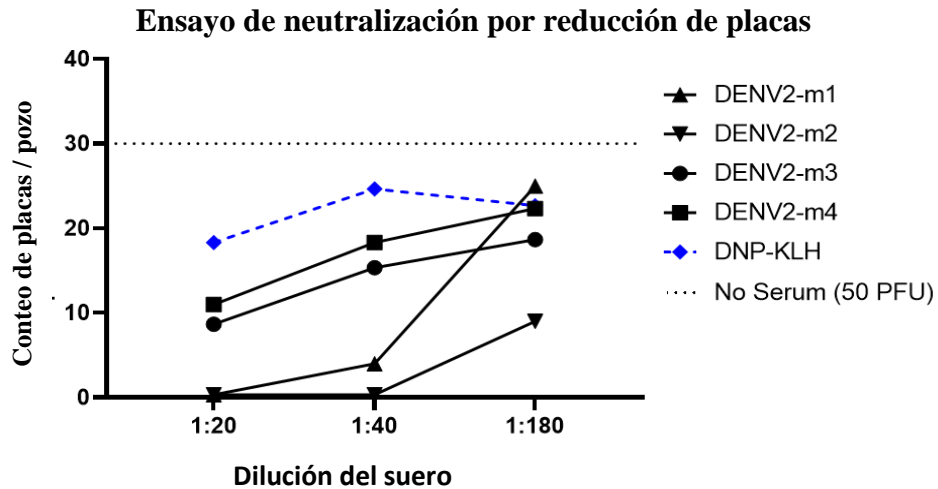
126. Eroshenko N, Gill T, Keaveney MK, Church GM, Trevejo JM, Rajaniemi H. Implications of antibody-dependent enhancement of infection for SARS-CoV-2 countermeasures. *Nat Biotechnol* (2020) 38:789–791. doi:10.1038/s41587-020-0577-1
127. Zompi S, Santich BH, Beatty PR, Harris E. Protection from Secondary Dengue Virus Infection in a Mouse Model Reveals the Role of Serotype Cross-Reactive B and T Cells. *J Immunol* (2012) 188:404–416. doi:10.4049/jimmunol.1102124

## 11. ANEXOS



### Anexo 1. La afinidad de los Abs anti-DNP-KLH aumenta con el tiempo post-inmunización.

Se obtuvo el suero de ratones inoculados con DNP-KLH a los días 7, 14 y 28 p.i. y fueron analizados por ELISA específica de Ag en presencia o ausencia de urea 7 M. (A) Gráfica con las curvas de dilución de una muestra representativa por tiempo. Las líneas punteadas representan las muestras con el lavado de urea 7 M. (B) Representación gráfica del porcentaje de Abs IgG anti-DNP-KLH resistentes a urea (alta afinidad, barras grises) a partir del total de Abs IgG anti-DNP-KLH (barras con líneas punteadas). La línea roja representa el incremento progresivo de la afinidad. Los datos mostrados representan el promedio  $\pm$  SEM de un experimento con cuatro ratones por tiempo.



**Anexo 2. Ensayo de neutralización por reducción de placas.** Se cultivaron células vero en placas de 24 pozos hasta alcanzar 80-90% de confluencia. Se realizaron diluciones seriadas del suero de ratones con 28d p.i. con DENV y se añadieron 50 PFU de DENV2 a cada dilución y se incubaron por 1 h a 37°C. El complejo suero-virus fue usado para infectar a las células Vero por 2 h por triplicado. El suero de ratones inoculados con DNP-KLH fue usado como control negativo de neutralización mientras que células Vero sin incubación con suero fueron usadas para mostrar los niveles basales de infección (50 PFU).

### **Anexo 3. Publicaciones asociadas a este proyecto de investigación**

Raúl A. Maqueda-Alfaro, Edith Marcial-Juárez, Juana Calderón-Amador, Julio García-Cordero, Mariana Orozco-Uribe, Felipe Hernández-Cázares, Uziel Medina-Pérez, Luvia E. Sánchez-Torres, Adriana Flores-Langarica, Leticia Cedillo-Barrón, Juan C. Yam-Puc, Leopoldo Flores-Romo, "Robust Plasma Cell Response to Skin-Inoculated Dengue Virus in Mice", *Journal of Immunology Research*, vol. 2021, Article ID 5511841, 17 pages, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5511841>